



Imaging P-glycoprotein-mediated efflux transport at the blood-brain barrier as a biomarker of drug-resistant epilepsy

Louise Breuil

► To cite this version:

Louise Breuil. Imaging P-glycoprotein-mediated efflux transport at the blood-brain barrier as a biomarker of drug-resistant epilepsy. Pharmacology. Université Paris-Saclay, 2023. English. NNT : 2023UPASQ039 . tel-04420168

HAL Id: tel-04420168

<https://theses.hal.science/tel-04420168>

Submitted on 26 Jan 2024

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

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

Imagerie du transport d'efflux par la P-glycoprotéine au niveau de la barrière hémato-encéphalique : vers un biomarqueur de l'épilepsie pharmaco-résistante

*Imaging P-glycoprotein-mediated efflux transport at the blood-brain
barrier as a biomarker of drug-resistant epilepsy*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Sciences pharmacologiques
Graduate School : Health and Drugs Sciences. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche Laboratoire d'Imagerie Biomédicale
Multimodale (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm),
sous la direction de **Nicolas TOURNIER**, Directeur de Recherche.

Thèse soutenue à Orsay, le 25 septembre 2023, par

Louise BREUIL

Composition du Jury

Delphine JOSEPH Professeure, Université Paris-Saclay	Présidente
Valérie BESSON CORDONNIER Professeure, Université Paris-Cité	Rapporteur & Examinatrice
Luc ZIMMER PU-PH, Université de Lyon	Rapporteur & Examineur
Nicolas ARLICOT PU-PH, Université de Tours	Examineur

Titre : Imagerie du transport d'efflux par la P-glycoprotéine au niveau de la barrière hémato-encéphalique : vers un biomarqueur de l'épilepsie pharmaco-résistante

Mots clés : P-glycoprotéine, imagerie TEP, radiopharmaceutiques, épilepsie pharmaco-résistante, transporteurs ABC, pharmacocinétique

Résumé : La P-glycoprotéine (P-gp) est un transporteur d'efflux exprimé au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui limite le passage cérébral de nombreux médicaments. Ce travail de thèse a eu pour objectif d'étudier, de valider puis d'optimiser l'utilisation de l'imagerie TEP (tomographie par émission de positons) au [^{11}C]métoclopramide, un nouveau radiopharmaceutique pour l'imagerie quantitative de la P-gp. Ce projet translationnel a eu pour finalité de permettre l'évaluation de l'imagerie TEP au [^{11}C]métoclopramide en tant que biomarqueur de l'épilepsie pharmaco-résistante (EPR), dans le cadre d'un protocole clinique.

Dans un premier temps, une comparaison *in vitro* et *in vivo* a été réalisée pour évaluer la sensibilité des sondes d'imagerie TEP actuellement disponibles pour usage clinique à détecter de faibles changements d'activité de la P-gp. Les résultats ont révélé que le [^{11}C]métoclopramide a présenté une plus grande vulnérabilité à l'inhibition que les autres radiotraceurs étudiés ([^{11}C]vérapamil, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide et [^{11}C]dompéridone). L'inhibition ou la déplétion partielle de la P-gp au niveau de la BHE est une situation clinique plus probable qu'une inhibition totale. La vulnérabilité à l'inhibition a donc été proposée comme nouveau critère d'évaluation des performances de substrats de la P-gp radiomarqués afin d'anticiper leur capacité à détecter des changements physiologiquement pertinents de la fonction du transporteur *in vivo*.

Dans un deuxième temps, afin d'anticiper les répercussions d'éventuelles interactions médicamenteuses inhérentes à une étude clinique chez des patients atteints d'épilepsie, l'impact de puissants modulateurs des cytochromes (CYPs) sur la cinétique plasmatique et cérébrale du [^{11}C]métoclopramide a été étudié. Les résultats obtenus soutiennent l'utilisation du [^{11}C]métoclopramide pour des études chez les patients traités par des inducteurs de CYPs.

Enfin, la constante d'élimination cérébrale ($K_{E,\text{brain}}$), dérivée des images TEP dynamiques, a été évaluée comme paramètre pour l'interprétation des données TEP au [^{11}C]métoclopramide. Le paramètre $K_{E,\text{brain}}$, qui peut être calculé sans prélèvement sanguin artériel, a permis d'estimer l'activité fonctionnelle de la P-gp et de mettre en évidence les répercussions de l'inhibition sur l'activité d'efflux chez l'animal et chez l'Homme.

Ce travail souligne l'importance de développer des critères d'évaluations pertinents, qui prennent en compte la pharmacologie des transporteurs et le contexte clinique, pour développer et évaluer les performances de radiotraceurs destinés à l'imagerie de transporteurs comme la P-gp. Les résultats renforcent l'intérêt du [^{11}C]métoclopramide et justifient son utilisation pour l'étude fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE dans un protocole clinique recrutant des patients atteints d'EPR.

Title : Imaging P-glycoprotein-mediated efflux transport at the blood-brain barrier as a biomarker of drug-resistant epilepsy

Keywords : P-glycoprotein, PET imaging, radiopharmaceuticals, drug-resistant epilepsy, ABC transporters, pharmacokinetics

Abstract : The P-glycoprotein (P-gp), an efflux transporter expressed at the blood-brain barrier (BBB), limits the cerebral passage of many drugs. This thesis aimed to study, validate, and optimize positron emission tomography (PET) imaging with [^{11}C]metoclopramide, a novel radiopharmaceutical for quantitative imaging of P-gp. This translational project aimed to enable the evaluation of [^{11}C]metoclopramide PET imaging as a biomarker for pharmacoresistant epilepsy (DRE) in a clinical protocol.

An *in vitro* and *in vivo* comparison was initially performed to assess the sensitivity of currently available PET imaging probes for clinical use in detecting small changes in P-gp activity. The results revealed that [^{11}C]metoclopramide showed greater vulnerability to inhibition than other studied radiotracers ([^{11}C]verapamil, [^{11}C]N-desmethyloperamide, and [^{11}C]domperidone). Considering that partial inhibition or depletion of P-gp at the BBB is a more likely clinical situation than total inhibition, vulnerability to inhibition was proposed as a new criterion for evaluating the performance of P-gp radiolabeled substrates to anticipate their ability to detect physiologically relevant changes in transporter function *in vivo*.

Next, to anticipate the impact of potential drug interactions inherent in a clinical study in patients with epilepsy, the effect of potent cytochromes (CYPs) modulators on the plasma and brain kinetics of [^{11}C]metoclopramide was studied. The results supported using [^{11}C]metoclopramide for studies in patients treated with CYPs inducers.

Subsequently, the brain elimination rate constant ($K_{E, \text{brain}}$), derived from dynamic PET images, was evaluated as a parameter for interpreting [^{11}C]metoclopramide PET data. The $K_{E, \text{brain}}$ parameter, which can be calculated without arterial blood sampling, allowed the estimation of P-gp functional activity and highlighted the effects of inhibition on efflux activity in animals and humans.

This work emphasizes the importance of developing relevant evaluation criteria that consider the pharmacology of transporters and the clinical context to develop and assess the performance of radiotracers intended for imaging transporters like P-gp. The results strengthen the interest in [^{11}C]metoclopramide and justify its use for the functional study of P-gp at the BBB in a clinical protocol recruiting patients with DRE.

1 REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

A Madame la Professeure Valérie Besson Cordonnier et à Monsieur le Professeur Luc Zimmer pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail de thèse. A Madame la Professeure Delphine Joseph pour avoir accepté de présider ce jury et à Monsieur le Professeur Nicolas Arlicot pour sa participation au comité de suivi de cette thèse. Je souhaite vous exprimer ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de consacrer du temps et votre expertise à l'évaluation de ce travail. Vos commentaires et vos suggestions sont extrêmement précieux pour moi.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Dr Nicolas Tournier

Pour m'avoir accueillie en Master et m'avoir proposé ce projet. Ton encadrement bienveillant a rendu cette expérience de travail véritablement enrichissante et agréable. Je mesure ma chance d'avoir pu bénéficier d'un directeur de thèse aussi exceptionnel et inspirant, alliant une remarquable expertise de chercheur à des qualités humaines hors du commun. Tu as toute mon admiration.

Aux membres de l'unité BioMaps

Pour votre soutien et votre aide tout au long de ce projet de thèse. Vous seriez trop nombreux à nommer individuellement mais soyez tous assurés de ma reconnaissance. Je tiens tout de même à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Vincent Lebon, directeur de l'unité, pour son accueil et son soutien depuis mon arrivée au laboratoire, Monsieur le Dr Phillipe Gervais qui m'a accueillie en tant qu'interne en radiopharmacie au SHFJ, Madame la Professeure Viviane Bouilleret et Monsieur le Docteur Sebastian Rodrigo pour leur collaboration sur le projet EPIFLUX, Madame Maud Goislard et Monsieur Sébastien Goutal qui m'ont énormément appris et soutenue. Sans votre participation, ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Je tiens également à exprimer ma tendre gratitude envers Madame la Dr Solène Marie pour m'avoir guidée tout au long de mon parcours. C'était un véritable plaisir d'évoluer à tes côtés et de bénéficier de ta sagesse et de ton expertise.

A mes collègues de l'université de Vienne

En particulier Monsieur le Dr Oliver Langer pour ses remarques constructives, pertinentes et encourageantes sur chacun des travaux qui composent cette thèse et à Madame la Dr Myriam El Biali pour notre tandem très agréable sur le protocole EPIFLUX.

A ma famille

Pour leurs encouragements et leur confiance.

Mon Totono, merci pour ton soutien inconditionnel et inestimable depuis toutes ces années. Avec Suzanne, vous êtes une source de bonheur et d'épanouissement quotidien qui participe à ma réalisation professionnelle.

Aux amis

Radiopharmaciens, pharmaciens et à tous les autres pour m'avoir entouré pendant toutes ces années d'étude.

Une pensée pour Monsieur le Professeur Jean-Michel Scherrmann, une personnalité éminente de la recherche dans mon domaine. J'aurais souhaité lui faire part de mon travail.

2 TABLE DES MATIERES

1	Remerciements.....	5
2	Table des matières	7
3	Table des Figures.....	9
4	Liste des tableaux.....	10
5	Liste des abréviations	11
6	Préambule	13
7	Etude Bibliographique.....	15
7.1	La barrière hémato-encéphalique	15
7.1.1	Barrière physique.....	16
7.1.1.1	Cellules endothéliales	16
7.1.1.2	Jonctions serrées et adhérentes	16
7.1.1.3	Lame basale	17
7.1.1.4	Péricytes	18
7.1.1.5	Astrocytes	18
7.1.2	Barrière fonctionnelle.....	18
7.1.2.1	Diffusion passive.....	19
7.1.2.2	Transporteurs membranaires	19
7.1.2.3	Transcytose	20
7.2	Les transporteurs au niveau de la BHE.....	21
7.2.1	Transporteurs SLC	21
7.2.2	Transporteurs ABC	22
7.2.3	La P-glycoprotéine au niveau de la BHE	24
7.2.4	Régulation de la P-gp au niveau de la BHE	26
7.3	Implication de la P-gp dans la neuropharmacocinétique des médicaments	28
7.3.1	Substrats de la P-gp	28
7.3.2	Inhibiteurs de la P-gp	28
7.3.3	Interactions médicamenteuses médiées par la P-gp	29
7.4	Implication de la P-gp dans la physiopathologie des maladies neurologiques.....	31
7.4.1	Tumeurs cérébrales.....	31
7.4.2	Encéphalite du VIH.....	32
7.4.3	Maladies psychiatriques.....	32
7.4.4	Sclérose en plaques.....	33
7.4.5	Maladie de Parkinson.....	33
7.4.6	Maladie d'Alzheimer.....	33
7.4.7	Epilepsie pharmaco-résistante	33
7.4.8	Vers un biomarqueur de suivi des pathologies neuropsychiatriques ?	34
7.5	Modalités d'étude fonctionnelle de la P-gp.....	34
7.5.1	Modèles de rongeur déficients.....	35
7.5.2	Biodistribution après injection intraveineuse de substrats de la P-gp.....	35
7.5.3	Autoradiographie et imagerie par spectrométrie de masse	36
7.5.4	Perfusion cérébrale <i>in situ</i>	36
7.5.5	Microdialyse cérébrale.....	36
7.5.6	Imagerie.....	37
7.5.7	Tomographie par émission de positons.....	39
7.6	Modélisation des données d'imagerie en TEP	40
7.6.1	Modèles compartimentaux.....	40
7.6.1.1	La fonction d'entrée artérielle	42

7.6.2	Modèles non-compartimentaux.....	43
7.6.2.1	Méthodes avec région de référence.....	43
7.6.2.2	Normalisation par tissus de référence.....	44
7.6.2.3	Méthodes graphiques.....	44
7.7	Imagerie translationnelle de la P-gp.....	44
7.7.1	[¹¹ C]vérapamil.....	45
7.7.2	[¹¹ C]N-desmethyl-lopéramide.....	46
7.7.3	[¹¹ C]métoclopramide.....	47
7.7.4	[¹⁸ F]MC225.....	48
7.8	L'épilepsie pharmaco-résistante : des hypothèses moléculaires à l'imagerie clinique.....	48
7.9	Objectifs du travail de thèse.....	63
8	Etudes Expérimentales	65
8.1	Contexte général.....	65
8.2	Partie 1 : Comparaison des radiopharmaceutiques pour l'étude fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE.....	69
8.2.1	Hypothèses et objectifs.....	69
8.2.2	Article 1.....	73
8.2.3	Article 2.....	85
8.2.4	Lettre à l'éditeur.....	99
8.2.5	Données complémentaires.....	101
8.2.5.1	Choix de la voie d'administration du tariquidar.....	101
8.2.5.2	Etude avec un autre inhibiteur.....	104
8.2.6	Synthèse et perspectives.....	106
8.3	Partie II : Influence des comédications sur l'utilisation de l'imagerie TEP au [¹¹ C]métoclopramide dans l'étude de l'épilepsie pharmaco-résistante.....	111
8.3.1	Hypothèses et objectifs.....	111
8.3.2	Article 3.....	113
8.3.3	Données complémentaires.....	125
8.3.3.1	Fonctions d'entrée artérielles du protocole EPIFLUX.....	125
8.3.4	Conclusions et perspectives.....	126
8.4	Partie III : Méthode de quantification de l'activité fonctionnelle de la P-gp par imagerie TEP au [¹¹ C]métoclopramide chez l'Homme.....	128
8.4.1	Hypothèses et objectifs.....	128
8.4.2	Article 4.....	130
8.4.3	Données complémentaires.....	144
8.4.3.1	Évaluation du muscle temporal comme région de référence.....	144
8.4.3.2	Réalisation de cartes paramétriques de K _{E,brain} sur les images du protocole EPIFLUX.....	145
8.4.4	Conclusions et perspectives.....	146
9	Discussion générale.....	150
10	Conclusion générale.....	159
11	Bibliographie	160
12	Publications	180

3 TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de l'unité neuro-vasculaire. D'après N. Abbott et al., 2006.....	16
Figure 2 : Schéma des jonctions serrées et adhérentes au niveau de la BHE. D'après R. Pandit et al., 2019.....	17
Figure 3 : Schéma des mécanismes de transport au niveau de la BHE. D'après R. Pandit et al., 2019.....	19
Figure 4 : Illustration des différents mécanismes de transport au travers de la BHE. D'après N. Abbott et al., 2006.....	20
Figure 5 : Localisation des différents transporteurs au niveau de la BHE et le sens de passage de leurs substrats. D'après M. Zamek-Gliszczynski et al., 2018.....	21
Figure 6 : Les localisations de la P-gp au niveau des différents organes et le sens d'efflux de ses substrats. D'après P. Kannan et al., 2009.....	25
Figure 7 : Schéma simplifié de la P-gp au niveau de la BHE. D'après S. Syvänen et al., 2012.....	26
Figure 8 : Structure, localisation et régulation de la P-gp au niveau de la BHE. D'après A. B. Chai et al., International journal of molecular science, 2022	27
Figure 9 : Distribution cérébrale du lopéramide en fonction du niveau d'expression de la P-gp chez la souris. D'après J.C. Kalvass et al., Clin Pharm Ther, 2013.....	30
Figure 10 : Propriétés et avantages des différentes techniques d'imagerie pour l'étude des transporteurs de xénobiotiques. D'après N. Tournier et al., Pharmacology & Therapeutics, 2018.	38
Figure 11 : Principe de la tomographie par émission de positons. D'après I. Jens Maus, domaine public.....	39
Figure 12 : Modèles compartimentaux, d'après le logiciel Pmod®	42
Figure 13 : Modèle avec région de référence, d'après le logiciel Pmod®	43
Figure 14 : Image obtenue après injection de [¹¹ C]vérapamil chez l'Homme. D'après S. Eyal et al., 2009. En absence (A) et en présence (B) d'une inhibition de la P-gp par la ciclosporine.....	46
Figure 15 : Image obtenue après injection de [¹¹ C]NdLop chez l'Homme. D'après W. Kreils et al., 2015. En absence (A) et en présence (B) d'une inhibition de la P-gp par le tariquidar	47
Figure 16 : Image obtenue après injection [¹¹ C]métoclopramide chez l'Homme. D'après N. Tournier et al., 2019 En absence (A) et en présence (B) d'une inhibition de la P-gp par la ciclosporine.....	48
Figure 17: Hypothèses de l'EPR. D'après Tingting Hu et al., Journal of medicinal chemistry 2023	50
Figure 18: Hypothèse des transporteurs. D'après W. Loscher et al., Curr Pharm Des, 2011	51
Figure 19 : Schéma des mécanismes supposés liés aux crises d'épilepsie dans l'augmentation de l'expression de la P-gp dans les tissus cérébraux affectés par l'épilepsie. D'après Taggi et al., Pharmaceutics, 2022.....	52
Figure 20: Schéma des mécanismes de la neuroinflammation impliqués dans l'augmentation de l'expression de la P-gp au niveau du tissu cérébral atteint par	

l'épilepsie. D'après Löscher et al., Pharmacological Reviews, 2020.....	54
Figure 21 : Arbre décisionnel pour statuer sur le statut substrat de la P-gp d'un antiépileptique en fonction des données in vitro et in vivo de la littérature. D'après Zhang et al., Advanced drug delivery review, 2012	58
Figure 22 : Atténuation de l'inhibition de la P-gp sur la constante d'influx K_1 du (R)- $[^{11}\text{C}]$ vérapamil chez les patients atteints d'EPR du lobe temporal et chez les témoins sains. D'après M. Feldmann et al., Lancet neurology, 2013.	61
Figure 23 : Design de l'étude EPIFLUX. Les groupes sont précisés dans les bulles bleues. Les hypothèses associées au choix des différents groupes sont précisées dans les bulles jaunes.....	66
Figure 24 : Etude de l'injection intra péritonéale de tariquidar.....	102
Figure 25 : Etude de l'injection par voie intraveineuse du tariquidar. Sont représentés, les concentrations plasmatiques en tariquidar (nM) en fonction de la dose injectée en IV (mg/kg) et le modèle non linéaire de Hill appliqué (ligne noire).	103
Figure 26 : Pénétration intracellulaire du $[^{11}\text{C}]$ vérapamil, $[^{11}\text{C}]$ N-desmethyl-lopéramide, $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide et $[^{11}\text{C}]$ dompéridone dans les cellules MDCKII-MDR1 en présence de doses croissantes de ciclosporine A.....	105
Figure 27 : Comparaison in vitro des radiopharmaceutiques pour l'étude de la fonction P-gp au niveau de la BHE.	108
Figure 28 : Cinétique plasmatique et métabolisme du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide chez les patients et les volontaires sains de l'étude EPIFLUX.....	126
Figure 29 : Etude du muscle temporal comme région de référence chez l'Homme ..	145
Figure 30 : $K_{E, \text{brain}}$ -maps chez deux sujets de l'étude EPIFLUX.....	146

4 LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: liste non exhaustive des inhibiteurs de la P-gp	29
Tableau 2 : Statut substrat de la P-gp des antiépileptiques selon l'arbre décisionnel de Zhang et al., Advanced drug delivery review, 2012	58
Tableau 3 : Evaluation des radiotraceurs cliniques concernant les critères d'un bon radiotraceur substrat de la P-gp, d'après Kannan et al. 2009	70
Tableau 4 : Critères du radiopharmaceutique idéal pour l'étude fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE adaptés de Kannan et al., 2009 et appliqués au $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide mettant en évidence les avantages (+) et les inconvénients (-) du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide dans l'imagerie fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE chez des patients atteints d'EPR.....	157

5 LISTE DES ABREVIATIONS

ABC: Adenosine-triphosphate Binding cassette
ATP : Adénosine triphosphate
BCRP: Breast cancer resistant protein
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
CYP : Cytochrome P450
EPR : Epilepsie pharmaco-résistante
IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50%
IP : Intra péritonéale
IRM : Imagerie par résonance magnétique
IV : Intra veineuse
IP : intrapéritonéale
MDR : Multi drug resistance
MRP : Multi drug resistant protein
P-gp : P-glycoprotéine
PNH : Primate non humain
SNC : Système nerveux central
SLC: Solute carrier
SUV: Standardized uptake value
TAC : Courbe temps-activité
TEP : Tomographie par émission de positrons
VOI : Volume d'intérêt

6 PREAMBULE

Au cours des dernières décennies, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans les maladies humaines. Cependant, il subsiste encore de nombreux défis pour améliorer le diagnostic précoce, la prédiction de l'évolution et la surveillance thérapeutique des pathologies. C'est dans ce contexte que les biomarqueurs jouent un rôle déterminant, en permettant une évaluation plus objective et quantitative de certaines pathologies, tout en offrant la possibilité d'une meilleure personnalisation des soins. Dans ce cadre, l'imagerie moléculaire, et particulièrement l'imagerie par tomographie à émission de positon (TEP), offre d'immenses perspectives de développement de biomarqueurs spécifiques, pour de nombreuses pathologies. Grâce à la haute sensibilité de détection des caméras, les molécules radiomarquées, ou radiopharmaceutiques, sont généralement administrées sous forme de "microdoses" ($<100\mu\text{g}$). Cette particularité présente l'avantage d'un excellent profil toxicologique qui permet d'envisager la réalisation d'études cliniques assez précoces. Aussi, la prise en compte du contexte clinique et physiopathologique pour le développement de radiopharmaceutiques innovants est essentielle à l'intégration de l'imagerie moléculaire à la recherche clinique, notamment en neurologie. Ainsi, ce que l'on pourrait qualifier de « radiopharmacologie translationnelle et clinique », illustre un des rôles du radiopharmacien hospitalier dans le développement de l'imagerie moléculaire, au sein d'un paysage multidisciplinaire.

Ce travail de thèse a porté sur l'étude d'un déterminant pharmacocinétique bien connu des pharmacologues, la P-glycoprotéine, que nous avons souhaité repositionner comme biomarqueur d'une maladie neurologique, l'épilepsie pharmaco-résistante (EPR). Ce paramètre a pu être étudié grâce à une approche d'imagerie moléculaire innovante que nous avons dû évaluer et optimiser afin qu'elle puisse être utilisée spécifiquement chez les patients atteints d'EPR. Ce travail comporte une première partie bibliographique dont l'objectif est de présenter le contexte scientifique et pharmacologique de l'étude avec un chapitre dédié à l'EPR. Ensuite, une partie expérimentale présente les travaux de recherche translationnelle mis en œuvre pour permettre l'utilisation de cette approche d'imagerie chez les patients atteints d'EPR. Ces deux sections sont suivies d'une discussion générale et d'une conclusion.

7 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

7.1 LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

La barrière hémato-encéphalique (BHE) constitue la principale surface d'échange entre le sang et le cerveau. C'est une interface dynamique et le lieu de nombreux échanges moléculaires dont l'objectif est d'assurer l'homéostasie du tissu cérébral en permettant d'approvisionner le cerveau en nutriments essentiels à son bon fonctionnement. Aussi, la BHE protège le cerveau de l'entrée de certains composés potentiellement toxiques issus de la circulation (N. Joan Abbott et al. 2010).

La BHE est principalement constituée par les cellules endothéliales qui tapissent les micro-vaisseaux cérébraux (Rubin et al. 1999). Les cellules endothéliales de la BHE reposent sur une lame basale, dans laquelle sont enchâssés des péricytes. Sur cette lame basale viennent se projeter des pieds astrocytaires ainsi que des terminaisons neuronales. L'ensemble de ces cellules interagit étroitement et forme ce que l'on appelle l'unité neuro-vasculaire (Figure 1). Les cellules endothéliales sont particulièrement jointives et s'opposent au passage de nombreuses molécules. Ces propriétés constituent le phénotype de « barrière physique » de la BHE.

D'autre part, de nombreux systèmes de transport assurent la régulation du passage de composés endogènes et de xénobiotiques de part et d'autre de la BHE (N. Joan Abbott et al. 2010). Ces systèmes constituent le phénotype de « barrière fonctionnelle ».

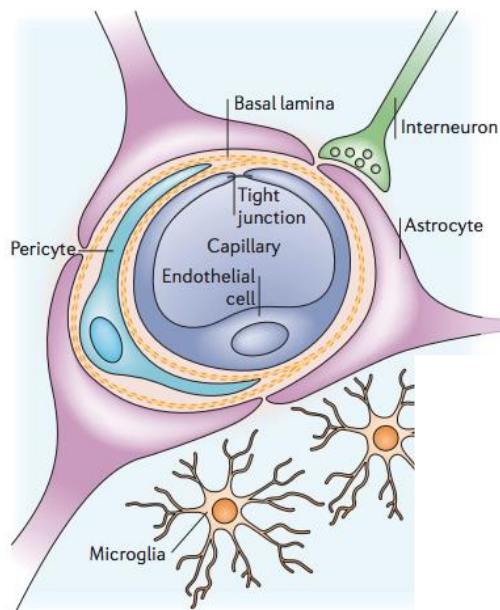


Figure 1 : Schéma de l'unité neuro-vasculaire. D'après N. Abbott et al., 2006.

7.1.1 Barrière physique

7.1.1.1 Cellules endothéliales

Les capillaires cérébraux sont composés d'une couche de cellules endothéliales qui se replient sur elles même pour former un vaisseau. Ces cellules non-fenestrées sont reliées entre elles par un complexe de jonctions qui empêche la diffusion paracellulaire (entre les cellules) des molécules de part et d'autre de la barrière (Castro Dias et al. 2019). De plus, la face luminale de l'endothélium cérébral est recouverte d'un glycocalyx qui pourrait agir comme une première barrière physique entre le sang et la paroi vasculaire cérébrale (Castro Dias et al. 2019).

7.1.1.2 Jonctions serrées et adhérentes

Les cellules endothéliales sont liées entre elles par des liaisons, appelées les jonctions serrées du côté apical et les jonctions adhérentes du côté basal. Ces jonctions rendent imperméable l'espace entre cellules. L'étanchéité des jonctions serrées est assurée par plusieurs types de protéines transmembranaires : l'occludine, et les claudines -3 et -5. Ces protéines sont reliées au cytosquelette d'actine par des protéines accessoires : ZO-1 et ZO-2 (Brooks et al. 2005). Ce type de jonctions restreint la perméabilité de la BHE aux xénobiotiques. Un composé de poids moléculaire élevé ne bénéficiant pas d'un système de transport facilité ne pourra atteindre le

parenchyme cérébral que par voie transcellulaire (à travers la cellule endothéliale).

Au pôle basal des cellules endothéliales, les jonctions adhérentes renforcent l'adhésion des cellules entre elles. L'adhésion cellulaire est assurée par des filaments d'actine impliquant principalement la cadhérine VE (vascular endothelial) et la caténine. Ces deux familles de protéines assurent le développement et l'intégrité des tissus. L'altération des jonctions adhérentes peut entraîner une augmentation de la perméabilité mais on considère que ce sont principalement les protéines de jonctions serrées qui limitent la perméabilité paracellulaire de la BHE (Bazzoni et al. 2004) (Figure 2).

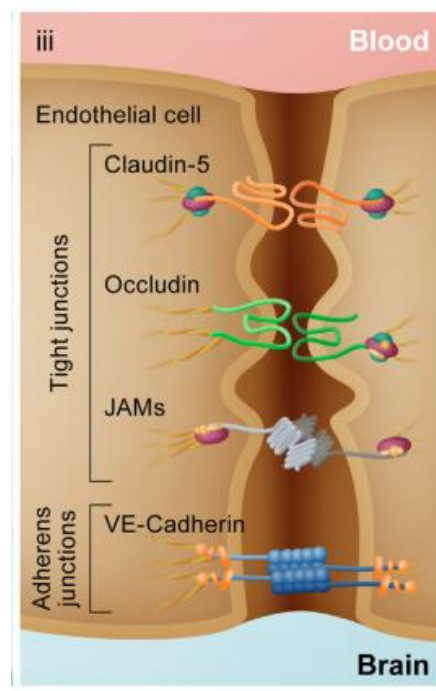


Figure 2 : Schéma des jonctions serrées et adhérentes au niveau de la BHE. D'après R. Pandit et al., 2019.

7.1.1.3 Lame basale

La lame basale sur laquelle repose les cellules endothéliales des microvaisseaux possède une structure bi-lamellaire. La lame basale endothéliale est séparée de la lame basale parenchymateuse par les péricytes (Figure 1) (Xu et al. 2018). Elle est constituée de protéines structurales, collagène et élastine, de protéines spécialisées, fibronectine et laminine et de protéoglycanes de type héparane sulfate (Daneman et al. 2015). L'altération de cette matrice extracellulaire dans certaines conditions pathologiques mène à une modification de la perméabilité cérébrale et conditionne la possibilité de migration cellulaire (Rascher et al. 2002).

7.1.1.4 Péricytes

Les péricytes sont de petites cellules enchâssées dans la lame basale qui recouvrent 20 à 30 % de la surface des capillaires cérébraux (Kim et al. 2006) (Figure 1). Elles synthétisent certains composants de la lame basale tels que le collagène, les protéoglycanes et les laminines. Les péricytes jouent un rôle important dans le maintien des fonctions de la BHE et son phénotype de barrière (C.-H. Lai et al. 2005). Ils semblent aussi jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes codant pour certains transporteurs exprimés au niveau de la BHE (Berezowski et al. 2004). Cependant, le profil des transporteurs exprimés spécifiquement au niveau des péricytes eux-mêmes est encore mal connu (C.-H. Lai et al. 2005).

7.1.1.5 Astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales dont les pieds recouvrent l'extérieur de la membrane basale (N. J. Abbott et al. 2006). Ces cellules jouent un rôle déterminant pour le fonctionnement des cellules neuronales et des vaisseaux sanguins cérébraux. Elles sont attachées à la lame basale par un complexe (le dystroglycan-dystrophin) qui permet leurs interactions réciproques (Noell et al. 2011). Les astrocytes permettent le maintien et la régulation du microenvironnement de la BHE. Ils régulent l'activité électrochimique, l'immunité et les flux d'eau et de métabolites (Rodríguez-Arellano et al. 2016). Toutes ces fonctions participent à l'intégrité de la BHE.

7.1.2 Barrière fonctionnelle

Physiquement, la fonction de barrière de la BHE est assurée par les caractéristiques histologiques des cellules qui la composent. Cependant, de nombreux mécanismes biologiques viennent renforcer son phénotype de barrière. Ces mécanismes sont indispensables pour assurer l'homéostasie du cerveau et subvenir à ses besoins métaboliques. La régulation des échanges se fait à travers le cytoplasme des cellules et de nombreux mécanismes de transport ont été identifiés au niveau de la BHE (Figure 3). Les cellules endothéliales de la BHE possèdent plus de mitochondries que les cellules endothéliales de la circulation artérielle périphérique (Sharif et al. 2018), ce qui correspond à leur rôle de barrière impliquant souvent des mouvements de composés contre leur gradient de concentration, qui

requiert l'énergie de l'ATP (adénosine triphosphate). Elles possèdent aussi peu de vésicules de pinocytose (invagination de la membrane cellulaire formant une vacuole permettant le transport de nutriments au travers de la cellule) (Reese et al. 1967). Ces particularités, par rapport aux autres endothéliums de l'organisme, confèrent aux cellules endothéliales cérébrales la capacité de réguler sélectivement les échanges moléculaires par l'intermédiaire de systèmes de transport dédiés.

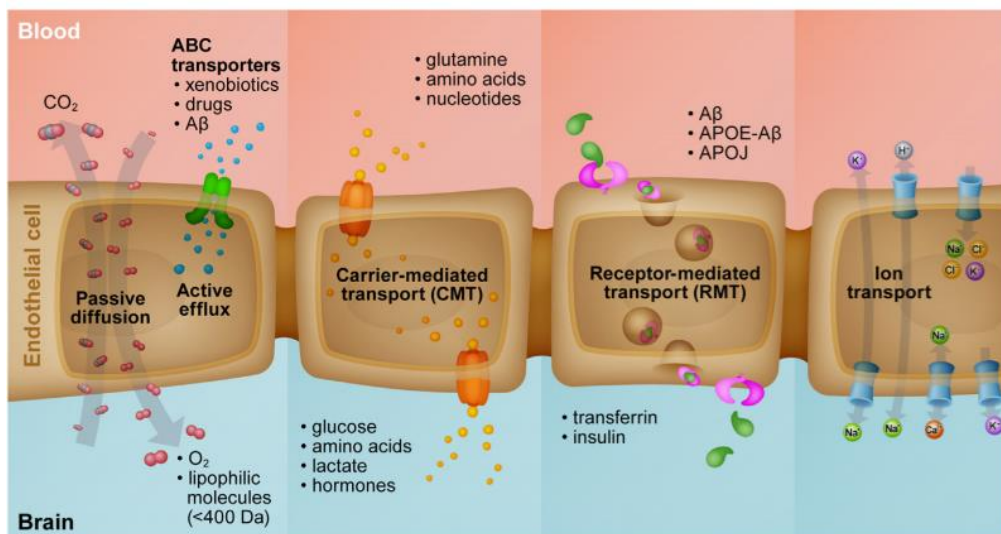


Figure 3 : Schéma des mécanismes de transport au niveau de la BHE. D'après R. Pandit et al., 2019.

7.1.2.1 Diffusion passive

La diffusion passive est un phénomène simple, ne nécessitant pas d'énergie, qui permet le passage d'un soluté au travers d'une membrane. Le déplacement des molécules s'effectue dans le sens du gradient de concentration, d'un compartiment à l'autre. La capacité de diffusion passive dépend essentiellement des propriétés physico-chimiques des solutés comme la polarité, la masse molaire, la charge électrique ou le taux de liaison aux protéines plasmatiques des composés (Pardridge 2012). Ainsi, certains gaz (oxygène, dioxyde de carbone), des molécules liposolubles de petite taille et des petits composés hydrophobes peuvent franchir très librement l'endothélium cérébral (Sweeney et al. 2019).

7.1.2.2 Transporteurs membranaires

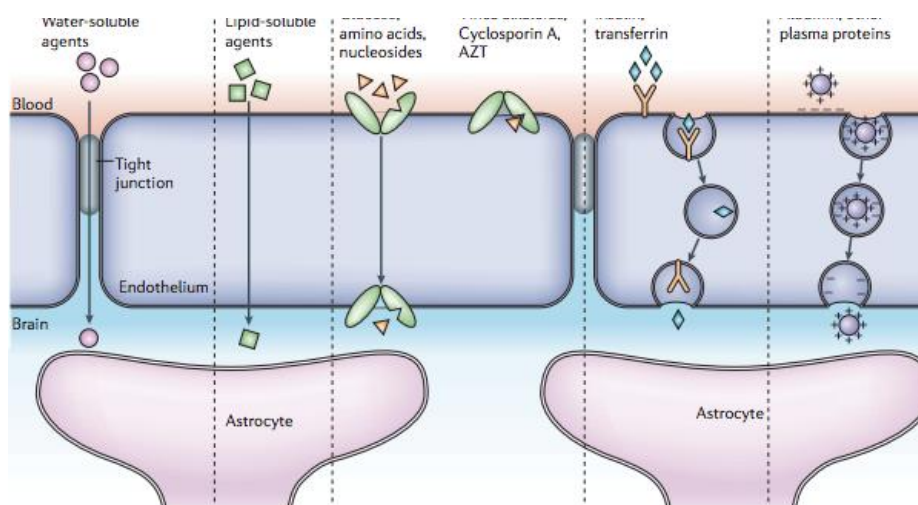
La pénétration cérébrale d'un composé dépend à priori de ses caractéristiques physico-

chimiques. Cependant, ces propriétés ne permettent pas de prédire avec une bonne certitude le passage de la BHE. Un grand nombre de composés franchissent la BHE alors qu'ils ne possèdent pas les caractéristiques physico-chimiques adéquates. A l'inverse, d'autres molécules présentent un passage cérébral plus faible malgré des propriétés physico-chimiques favorables (N. J. Abbott 2013). Ces molécules sont en fait respectivement des substrats de transporteurs d'influx ou d'efflux, présents au niveau des membranes des cellules endothéliales, qui régulent sélectivement le passage au travers du parenchyme cérébral. Au niveau de la BHE il existe principalement deux super familles de transporteurs (Löscher et al. 2005b), la super famille des transporteurs SLC (Solute Carrier Family) et la super famille des transporteurs ABC (Adenosine triphosphate Binding Cassette) (Figure 4 c).

7.1.2.3 Transcytose

Certaines macromolécules comme les polypeptides empruntent la voie de la transcytose qui permet de les transporter au travers de la BHE par voie vésiculaire. Deux mécanismes ont été identifiés. Le premier est la transcytose médiée par un récepteur ; la molécule est internalisée par endocytose après liaison spécifique à un récepteur puis traverse la cellule. Le second est la transcytose par adsorption ; la molécule se lie aux charges négatives de l'endothélium ce qui permet l'invagination de la membrane puis l'internalisation et le passage de la molécule (Figure 4 d et e).

Figure 4 : Illustration des différents mécanismes de transport au travers de la BHE. D'après N. Abbott et al., 2006.



a) les jonctions serrées restreignent le passage des molécules hydrosolubles et des molécules polaires b) cependant, la membrane lipidique de l'endothélium offre une large surface permettant

le passage des molécules liposolubles. c) L'endothélium contient des transporteurs de protéines. Certains nécessitent de l'énergie et agissent comme transporteur d'efflux. d) Certaines protéines sont prises en charges via transcytose médiée par des récepteurs spécifiques. e) Les protéines endogènes plasmatiques sont peu transportées mais leur cationisation augmente leur passage via transcytose médiée par adsorption.

7.2 LES TRANSPORTEURS AU NIVEAU DE LA BHE

Environ 10 à 15% des protéines de l'unité neurovasculaire sont des transporteurs (Enerson et al. 2006). Les protéines de transport sont retrouvées aussi bien à la face luminale (côté sang) qu'à la face abluminale (côté cerveau) des cellules endothéliales pour permettre le passage de nutriments, peptides, ions, mais aussi le transport de métabolites et de certains médicaments et toxiques (Saidijam et al. 2018). En règle générale, le passage des molécules du sang vers le cerveau est effectué par les membres de la super famille des transporteurs SLC, tandis que l'efflux unidirectionnel du cerveau vers le sang, qui peut se produire contre un gradient de concentration, par les membres de la super famille des transporteurs ABC. Cependant, certains transporteurs SLC fonctionnent de manière bidirectionnelle (Stieger et al. 2015) (Figure 5).

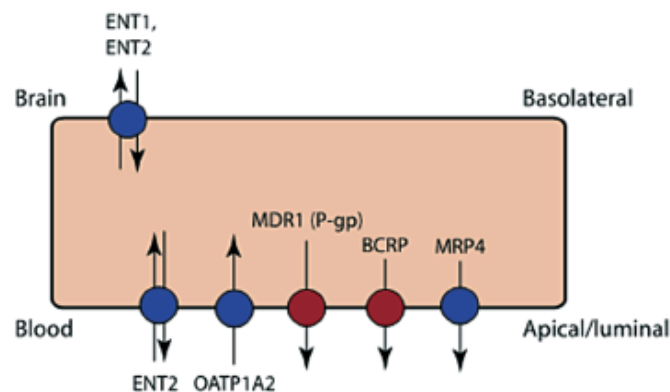


Figure 5 : Localisation des différents transporteurs au niveau de la BHE et le sens de passage de leurs substrats. D'après M. Zamek-Gliszczyński et al., 2018.

7.2.1 Transporteurs SLC

Les transporteurs SLC assurent le transport d'une très grande variété de substrats (par exemple, ions, métabolites inorganiques et organiques, peptides, médicaments, xénobiotiques) à travers la BHE en utilisant divers mécanismes (transport facilité, symport, antiport). Environ 400 gènes de transporteurs SLC humains ont été identifiés. Ils incluent environ 50 familles différentes qui peuvent être regroupées selon des similitudes de séquences (Lin et al. 2015). Un certain nombre de transporteurs SLC ayant une fonction d'efflux actif à la BHE ont été identifiés

(Kusuhara et al. 2005). Les principaux transporteurs SLC connus de la BHE sont les transporteurs OATP (Organic Anion Transporter Polypeptide), OAT (Organic Anion Transporters), EAAT (Excitatory Amino Acid Transporters), PMAT (Plasmic Membrane of Monoamin Transporters) et MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion). Les répercussions fonctionnelles de ces SLC sur le transport cérébral de médicaments, métabolites et toxiques restent encore mal connues et font l'objet d'importantes recherches en neuropharmacologie (Lin et al. 2015). D'autres systèmes de transport qui conditionnent le passage cérébral de molécules cationiques ont été identifiés au niveau de la BHE. On en connaît les répercussions fonctionnelles et l'importance sur la distribution cérébrale de nombreux composés comme la clonidine, la nicotine, la cocaïne ou la diphenhydramine. Cependant, l'identification moléculaire de ces systèmes de transport n'a pas encore été parfaitement établie à ce jour (Chapy, André, et al. 2015; Chapy, Goracci, et al. 2015; Chapy et al. 2014; Cisternino et al. 2012)

7.2.2 Transporteurs ABC

Chez l'homme, une cinquantaine de gènes codant pour les transporteurs ABC ont été identifiés (Dean et al. 2005). Ces transporteurs sont répartis en sous-familles (de ABCA à ABCG) sur la base de similitudes de séquences. Ils s'expriment au niveau de nombreux organes comme le foie, l'intestin, la BHE, le placenta ou le rein (Schinkel et al. 2003). Ces transporteurs utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour effluer activement les substrats de la cellule vers le sang, indépendamment de leur gradient de concentration (Kannan et al. 2009). On sait aujourd'hui que cette fonction d'efflux est essentielle à la protection du système nerveux central (SNC) vis-à-vis de la pénétration de xénobiotiques ou de composés endogènes potentiellement neurotoxiques. Parmi ces transporteurs, au moins 11 représentants sont impliqués dans le phénomène de Multi Drug Resistance (MDR) dont les MRPs (Multidrug Resistance-associated proteins/ABCCs), la BCRP (Breast Cancer resistance Protein/ABCG2) et la P-glycoprotéine (P-gp/ABCB1) (X. Liu 2019a).

La sous famille des transporteurs ABCC est codée par 13 gènes dont 9 sont en relation avec les transporteurs MRP. Chaque MRP possède un profil de substrat spécifique, bien qu'il existe des composés substrats de plusieurs MRPs (Gomez-Zepeda et al. 2019). Chez l'Homme, il a été montré l'expression de MRP4 et MRP5 au niveau de la membrane luminale de l'endothélium cérébral (Nies et al. 2004). Il reste cependant encore de nombreuses interrogations quant à

l'expression et au rôle effectif de ces transporteurs au niveau de la BHE (Gomez-Zepeda et al. 2019).

La BCRP est une protéine d'efflux formée par un homo-oligomère de 72 KDa et codée par le gène ABCG2 (Kage et al. 2005). Ce transporteur est connu pour son implication dans la résistance des cancers aux traitements. La liste de ses substrats est très large et inclut de nombreuses substances cytotoxiques (Mo et al. 2011). La plupart de ses substrats sont communs avec les MRPs et la P-gp (Agarwal et al. 2011). La BCRP est majoritairement localisée à la face luminale de l'endothélium des microvaisseaux et est souvent exprimée dans les mêmes tissus que la P-gp (Stacy et al. 2013) à l'exception par exemple des cellules souches et des glandes mammaires (J. W. Jonker et al. 2005; Zhou et al. 2001). Plusieurs études ont montré une action synergique entre la BCRP et la P-gp pour limiter le passage de leurs substrats communs au niveau cérébral (de Vries et al. 2007; Joseph W. Polli et al. 2009).

La P-gp (aussi nommée ABCB1 ou MDR1) a été le premier transporteur à être associé au phénomène MDR (Juliano et al. 1976). Il reste aujourd'hui le transporteur le plus étudié, du fait de son rôle déterminant dans la pharmacocinétique de nombreux médicaments et les implications cliniques qui en découlent. Structuellement, la protéine de 170 kDa est constituée de deux régions transmembranaires qui contiennent chacune 6 hélices transmembranaires et un site intracellulaire de liaison à l'ATP (Aller et al. 2009). L'hélice transmembranaire permet la liaison du substrat au transporteur et son efflux vers l'extérieur de la cellule. La P-gp régule ainsi le transport de nombreuses molécules biologiques, nutriments, hormones et médicaments (Ambudkar et al. 1999).

Ainsi, la compréhension des mécanismes sous-jacents à la régulation de la P-gp est essentielle pour i) comprendre les réponses de la BHE aux changements environnementaux, tels que l'exposition aux médicaments, pour ii) relier le dysfonctionnement des transporteurs à certains troubles du SNC et à l'inefficacité des médicaments thérapeutiques, pour iii) réaliser comment le stress inflammatoire et oxydatif influencent l'expression de la P-gp, comme ils sont impliqués dans de nombreuses maladies du SNC, et pour iv) identifier les voies de signalisation qui modulent les transporteurs ABC, ce qui pourrait être utile pour développer des solutions thérapeutiques efficaces pour le traitement de maladies du SNC (Cox et al. 2023).

Dans ce contexte, il apparaît nécessaire de développer des marqueurs permettant d'apprécier l'activité fonctionnelle de la BHE (Harris et al. 2023). La P-gp, transporteur dont le rôle, la régulation et les substrats ont été particulièrement bien étudiés, présente de nombreux atouts pour

permettre d'apprécier les modulations physiopathologiques de la BHE. Aussi, il convient de comprendre les mécanismes qui régissent son expression et sa signalisation afin d'envisager l'étude des propriétés fonctionnelles de la BHE par le prisme de l'activité de la P-gp.

7.2.3 La P-glycoprotéine au niveau de la BHE

La P-gp est exprimée à l'interface de nombreux organes du corps humain (Figure 6) où elle joue un rôle déterminant sur la pharmacocinétique de médicaments. En pharmacocinétique clinique, l'importance de la P-gp au niveau de l'épithélium intestinal est bien décrite et il est possible de quantifier les répercussions fonctionnelles de ce transporteur sur la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale (Giacomini et al. 2010). La P-gp est également impliquée dans l'élimination rénale et hépatobiliaire de nombreux composés où, là encore, il est souvent possible de mettre en évidence les répercussions fonctionnelles de ce transporteur sur les concentrations plasmatiques et la clairance des médicaments substrats (X. Liu 2019b). Il est aujourd'hui parfaitement admis que l'association de médicaments inhibiteurs de la P-gp avec un médicament substrat expose à un risque d'interaction médicamenteuse lié aux modifications pharmacocinétiques du substrat « victime » (Giacomini et al. 2010). A ce titre, il est recommandé d'étudier le potentiel inhibiteur ou substrat de la P-gp pour tout nouveau candidat médicament lors de son développement afin d'anticiper le risque d'interaction médicamenteuse d'origine pharmacocinétique liée à ce transporteur (Feng et al. 2008; Giacomini et al. 2010).

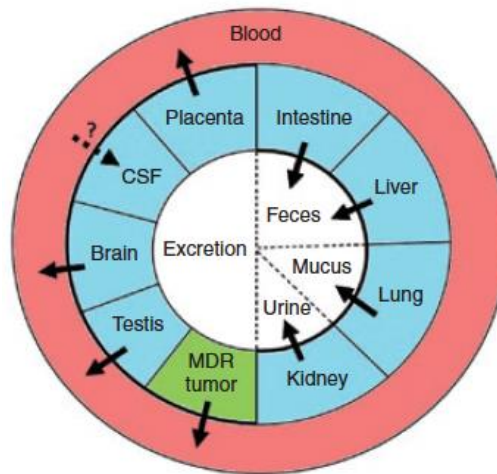


Figure 6 : Les localisations de la P-gp au niveau des différents organes et le sens d'efflux de ses substrats. D'après P. Kannan et al., 2009.

La P-gp est aussi exprimée au niveau d'interfaces biologiques où elle contribue à la sanctuarisation de certains organes, en limitant la distribution tissulaire de ses substrats. On retrouve notamment la P-gp au niveau du pôle vasculaire des cellules endothéliales des microcapillaires cérébraux de la BHE (Figure 7). Dans ce cas, l'impact de la P-gp sur la distribution de ses substrats dans le compartiment cérébral ne peut pas être prédit à partir des seules concentrations plasmatiques. Aussi, il apparaît nécessaire de disposer d'outils permettant d'évaluer l'importance de la P-gp au niveau de la BHE sur l'exposition cérébrale des médicaments (Löscher et al. 2005b).

Chez l'animal, le rôle de la P-gp au niveau de la BHE peut être mis en évidence de manière invasive, en déterminant la concentration cérébrale du substrat en regard des concentrations plasmatiques. Ces expériences ont permis de montrer le rôle essentiel de la P-gp dans la protection du SNC, en empêchant la pénétration de xénobiotiques potentiellement neurotoxiques. Chez l'Homme, on retrouve une forte expression de la P-gp au niveau des capillaires cérébraux post-mortem ou issus de la chirurgie. On peut donc faire l'hypothèse que la P-gp conditionne, du moins en partie, les effets centraux de certains médicaments substrats de ce transporteur chez l'Homme, en contrôlant leur exposition cérébrale (Daneman 2012).

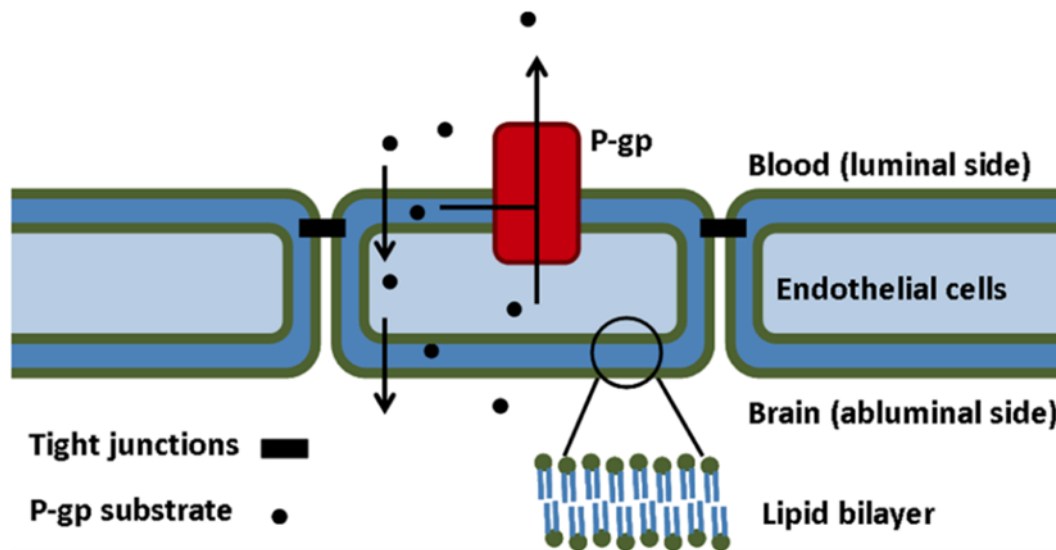


Figure 7 : Schéma simplifié de la P-gp au niveau de la BHE. D'après S. Syvänen et al., 2012.

Le rôle de la P-gp au niveau de la BHE fut rapporté pour la première fois en 1994 par l'équipe d'Alfred Schinkel, qui a mis en évidence une augmentation de l'accumulation cérébrale de l'ivermectine et de la vinblastine chez des souris déficientes en P-gp par rapport à des souris sauvages (Schinkel et al. 1994). Depuis, de nombreuses études ont montré qu'une inhibition ou un déficit génétique de la P-gp permet d'augmenter le passage cérébral d'un très grand nombre de médicaments substrats. Cependant, on connaît encore mal l'importance clinique d'une régulation de la P-gp sur le passage cérébral et les effets centraux de ces substrats. (Miller et al. 2008)

7.2.4 Régulation de la P-gp au niveau de la BHE

La régulation de la P-gp est un phénomène complexe et largement étudié dans le cadre du phénomène MDR, lié à une surexpression de la P-gp au niveau des cellules tumorales (Katayama et al. 2014). Au niveau cérébral, l'implication potentielle de la P-gp dans de nombreuses maladies neurologiques fait l'objet d'importants travaux de recherche (Cox et al. 2023). En tant que transporteur représentatif des propriétés fonctionnelles de la BHE, la connaissance des mécanismes de régulation de la P-gp permet d'apprécier la réponse de la BHE aux modifications physiopathologiques et environnementales (Gil-Martins et al. 2020). Ainsi, les répercussions fonctionnelles de la régulation de la P-gp, si elles peuvent être mesurées *in vivo*, pourraient être utilisées comme biomarqueur pour le suivi de certaines

maladies neurologiques (Carrano et al. 2014).

La régulation des transporteurs d'efflux de médicaments repose sur des mécanismes de signalisation complexes, notamment le stress oxydatif, le stress inflammatoire, les récepteurs nucléaires activés par des ligands et les récepteurs du glutamate (Chai et al. 2022; Gil-Martins et al. 2020). Sur la Figure 8, les deux domaines transmembranaires de la P-gp comprennent chacun six hélices membranaires, notées de 1 à 12, et deux régions intracellulaires de liaison à l'ATP (domaines de liaison aux nucléotides, NBD). Les sites de phosphorylation (résidus sérine S661, S667, S671 et S683) sont représentés par des cercles verts et se situent au niveau de la liaison entre les deux domaines. La glycosylation, représentés par des lignes ramifiées entre les hélices transmembranaires 1 et 2, se produit au niveau des résidus asparagine N91, N94 et N99. Les niveaux d'expression et d'activité de l'ARNm et de la protéine sont régulés à la hausse ou à la baisse par une série de facteurs de transcription et de mécanismes post-traductionnels.

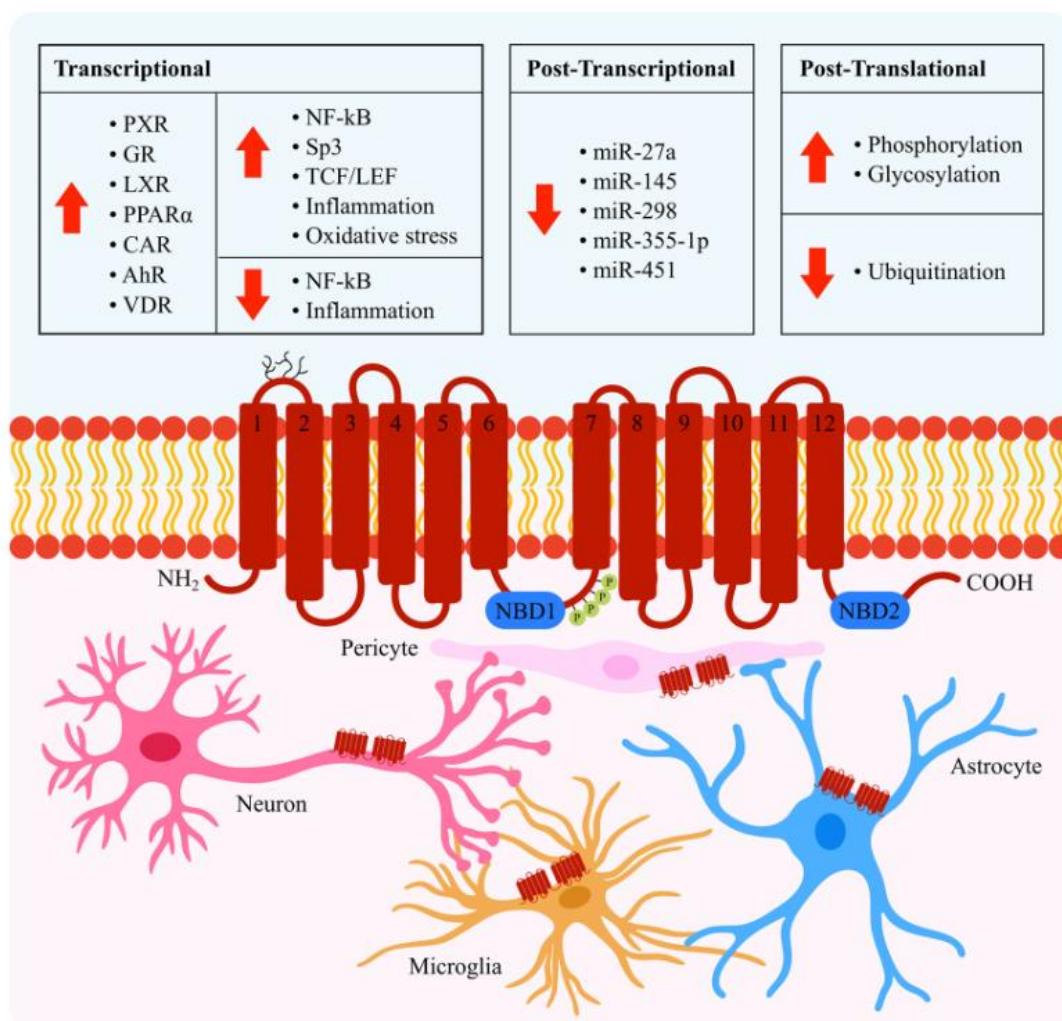


Figure 8 : Structure, localisation et régulation de la P-gp au niveau de la BHE. D'après A. B. Chai et al., International journal of molecular science, 2022

7.3 IMPLICATION DE LA P-GP DANS LA NEUROPHARMACOCINETIQUE DES MEDICAMENTS

7.3.1 Substrats de la P-gp

Au niveau de la BHE, la P-gp transporte un large panel de composés, ce qui en limite le passage cérébral (Sharom 2011). En raison de son importance dans la pharmacocinétique des médicaments et de son implication dans le phénomène de MDR, de nombreuses études se sont intéressées aux caractéristiques moléculaires de l'interaction de la P-gp avec ses substrats. Cette recherche a permis d'identifier les substrats potentiels et de développer des inhibiteurs de P-gp ayant pour objectif de contourner ou d'abolir le phénomène de MDR (Silva et al. 2015). Différents essais ont été réalisés pour trouver un ensemble de caractéristiques structurales et fonctionnelles théoriques qui permettraient de prédire le potentiel d'inhibition de la P-gp (Seelig 1998; Silva et al. 2015). Cependant, la complexité de la reconnaissance moléculaire par la P-gp rend difficile la prédiction du caractère substrat ou inhibiteur des composés. Aussi le caractère substrat et/ou inhibiteur de la P-gp est aujourd'hui déterminé pour chaque nouveau candidat médicament grâce à des expériences dédiées (Feng et al. 2008; Giacomini et al. 2010).

7.3.2 Inhibiteurs de la P-gp

Le terme d'inhibiteur de la P-gp est utilisé pour les composés limitant l'activité de transport de substrats. Les inhibiteurs de la P-gp sont classés en trois générations, basées sur leur spécificité et leur pouvoir d'inhibition du transporteur (Varma 2003). La première génération comprend des molécules utilisées en pratique clinique comme le vérapamil, la quinidine ou la ciclosporine, et qui se sont avérées être des inhibiteurs de la P-gp. Ces molécules sont actives pharmacologiquement et leur utilisation reste limitée du fait de leurs effets indésirables voire leur toxicité aux doses nécessaires pour inhiber substantiellement la P-gp (Srivalli et al. 2012). Les inhibiteurs de seconde génération ont été développés à partir d'analogues structuraux des inhibiteurs de première génération. Ils possèdent moins d'activité pharmacologique, ce qui améliore leur tolérance, et leur efficacité inhibitrice est augmentée par rapport aux inhibiteurs de précédente génération. Cependant ces inhibiteurs de la P-gp sont aussi, pour certains, inhibiteurs d'autres transporteurs ABC et parfois substrats de cytochromes P450 (CYP), ce qui complique leur utilisation dans la compréhension des mécanismes d'interactions médicamenteuses *in vivo*. C'est le cas, par exemple, du KR300312, dérivé du vérapamil, ou du PSC833 (ou valspodar)

qui est un dérivé de la ciclosporine A. Une troisième génération d'inhibiteurs a ensuite été développée pour être hautement spécifique de la P-gp et moins interagir avec les CYP. Toutefois, certains inhibiteurs de cette troisième génération ne sont pas sélectifs de la P-gp comme par exemple l'élacridar, qui bloque aussi bien l'activité de la P-gp que celle de la BCRP. Le tableau 1 ci-dessous présente les différentes générations d'inhibiteurs de la P-gp.

Tableau 1: liste non exhaustive des inhibiteurs de la P-gp

Première génération	Vérapamil, ciclosporine A, amiodarone, quinidine, quinine, nifédipine, cremophore EL (tensio-actif).
Deuxième génération	KR30031, PSC 833 (Valspodar), VX-710 (Biricodar).
Troisième génération	GF120918 (Elacridar), LY475776, LY335979 (Zosuquidar), XR9576 (Tariquidar), R101933 (Laniquidar), V-104, OC 144-093 (ONT-093).

7.3.3 Interactions médicamenteuses médiées par la P-gp

La présence et les caractéristiques de la P-gp au niveau de la BHE posent la question du risque d'interaction médicamenteuse impliquant ce transporteur. Au cours de leur développement, de nombreux médicaments sont identifiés comme inhibiteurs, mais aussi inducteurs de la P-gp *in vitro* (Feng et al. 2008; Miller et al. 2008). Les répercussions fonctionnelles d'une inhibition ou d'une induction de la P-gp au niveau des organes d'absorption et d'élimination, peuvent être mises en évidence par des études de pharmacocinétique conventionnelles, basées sur la mesure de l'exposition plasmatique des médicaments et de leurs métabolites. En revanche, au niveau de la BHE, il est difficile de prédire si ce type d'interaction médicamenteuse peut avoir des répercussions cliniquement significatives sur le passage de la BHE et l'exposition cérébrale des médicaments substrats chez l'Homme (Langer 2016). Une étude du Consortium International des Transporteurs (Kalvass et al. 2013) a notamment utilisé le rapport cerveau/plasma (K_p) du lopéramide comme sonde pour étudier les répercussions phénotypiques d'une déplétion totale (souris homozygote $mdr1a^{-/-}$) ou partielle (50%, souris hétérozygotes $mdr1a^{+/-}$) de la P-gp, par rapport aux souris sauvages ($mdr1a^{+/+}$) qui expriment

pleinement la P-gp (Figure 9). Lorsque que la P-gp est totalement inhibée, le passage du lopéramide est multiplié par 60. Par contre, une diminution de 50 % de l'expression de la P-gp augmente très peu le passage cérébral du lopéramide, d'un facteur 2 au maximum. L'augmentation de la distribution cérébrale du lopéramide (ligne pointillée noire Figure 9) n'est donc pas proportionnelle au degré d'inhibition de la P-gp au niveau de la BHE.

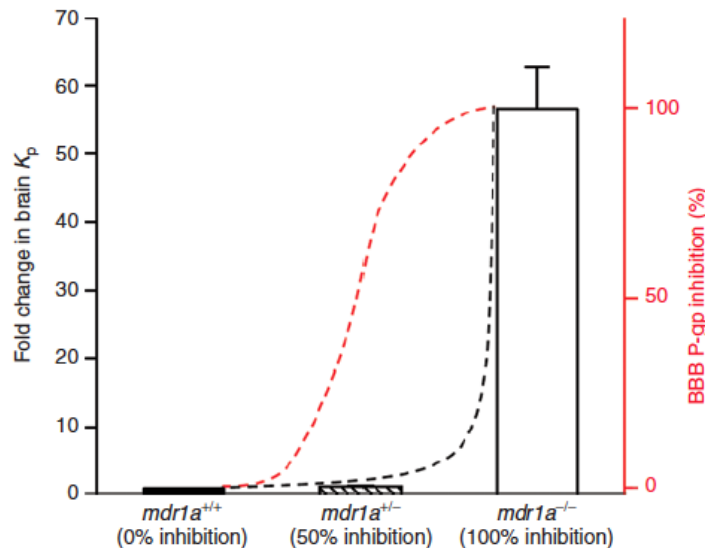


Figure 9 : Distribution cérébrale du lopéramide en fonction du niveau d'expression de la P-gp chez la souris. D'après J.C. Kalvass et al., Clin Pharm Ther, 2013.

De plus, dans cette même étude, Kalvass et al. ont conclu que les concentrations plasmatiques des principaux inhibiteurs de la P-gp connus sont plutôt susceptibles de n'inhiber que partiellement l'activité de transport. En réduisant au maximum de 50 % l'efflux de la BHE, ils entraînent au maximum le doublement de la distribution cérébrale d'un substrat tel que le lopéramide. Ainsi, l'augmentation de l'exposition cérébrale est fonction de l'inhibition du transport selon les équations :

$$Fold \Delta CNS \leq \frac{100\%}{100\% - \% inhibition} \quad (1)$$

$$Fold \Delta CNS \leq \frac{[I]}{K_i} + 1 \quad (2)$$

Où % inhibition est le degré d'inhibition de l'efflux dans la BHE (Figure 9), $[I]$ est la concentration d'inhibiteur non lié et K_i est la constante d'inhibition. Les équations 1 et 2 prédisent l'augmentation de la distribution dans le SNC lorsque la fraction excrétée par l'efflux (f_e) au niveau de la BHE est de 100 %. Si $f_e < 100\%$ l'ampleur de l'interaction sera plus faible.

L'avis de ce consortium quant au risque d'interactions médicamenteuse impliquant la P-gp se base essentiellement sur l'extrapolation d'études précliniques utilisant le lopéramide, un substrat pour lequel la P-gp joue un rôle particulièrement important. Cette situation pourrait ne pas refléter le comportement de l'ensemble des substrats de la P-gp voire sous-estimer les répercussions neuropharmacocinétiques d'une inhibition partielle chez l'animal ou chez l'Homme.

Il apparaît donc nécessaire de connaître les répercussions neuropharmacocinétiques d'une inhibition partielle de la P-gp afin d'estimer le risque d'interaction-médicamenteuses qui lui est associé.

7.4 IMPLICATION DE LA P-GP DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DES MALADIES NEUROLOGIQUES

Bien que la P-gp puisse être associée à un risque d'interactions médicamenteuses, elle peut aussi être régulée positivement ou négativement en dehors de toute exposition à des xénobiotiques ou médicaments (Gil-Martins et al. 2020). Si la recherche s'intéresse de près à la régulation de la P-gp comme moyen d'améliorer le traitement de certaines maladies neurologiques (Juvalé et al. 2022), la modification de son expression ou de son activité pourrait aussi permettre de l'utiliser comme biomarqueur d'une situation pathologique (Chai et al. 2022). Ces observations nécessitent le développement d'outils permettant d'étudier la P-gp au niveau de la BHE chez l'Homme.

7.4.1 Tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales sont généralement des tumeurs de faible pronostic du fait de la mauvaise réponse aux traitements par chimiothérapie. Cela s'explique en partie par l'efflux par la P-gp des médicaments anti-cancéreux classiquement utilisés en thérapeutique (Parrish et al. 2015). En effet, une augmentation de l'expression de la P-gp a été retrouvée au niveau des microvaisseaux de la vascularisation tumorale et au niveau des cellules tumorales empêchant

les agents cytotoxiques d'exercer leur action (Calatuzzolo et al. 2005). L'inhibition de la P-gp au niveau de la BHE fait aujourd'hui partie des stratégies potentielle d'optimisation pour la délivrance des médicaments anticancéreux vers le tissu cérébral. Cependant cette approche n'a pas encore montré de réel bénéfice pour améliorer le traitement des tumeurs cérébrales. En effet, l'inhibition de la P-gp avec les inhibiteurs disponibles n'est pas sélective de la BHE. Il en résulte une modification de la cinétique périphérique, de la distribution tissulaire extra-cérébrale et de l'élimination des anticancéreux substrats, ce qui peut en accentuer la toxicité périphérique (Robey et al. 2018).

7.4.2 Encéphalite du VIH

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), responsable du syndrome de l'immunodéficience humaine (SIDA) peut atteindre le cerveau et causer une encéphalite due au VIH. Plusieurs médicaments antirétroviraux ont été identifiés comme substrat de la P-gp (Ronaldson et al. 2008). L'efflux par la P-gp de certains inhibiteurs de protéase semble être responsable de l'accès limité de ces médicaments au système nerveux central (Banks et al. 2006). Ce phénomène pourrait contribuer à la sanctuarisation du cerveau vis-à-vis des traitements et à la rémanence du virus dans le tissu cérébral (Eilers et al. 2008).

7.4.3 Maladies psychiatriques

Peu d'études sont consacrées à l'implication des transporteurs ABC dans les maladies psychiatriques. Cependant, certains résultats suggèrent une modification fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE des patients atteints de dépression ou de schizophrénie qui pourrait être la cause d'une résistance aux traitements médicamenteux dans ces maladies (de Klerk et al. 2009; De Klerk et al. 2011). De nombreux médicaments antidépresseurs et antipsychotiques ont été identifiés comme substrats de la P-gp (O'Brien et al. 2012). Chez l'animal, une inhibition ou une déplétion de la P-gp augmente les concentrations et les effets centraux de ces médicaments (Bundgaard et al. 2012; Moons et al. 2011). Cependant, par manque d'outils, la relation entre l'augmentation fonctionnelle de la P-gp et la réponse aux traitements n'est toujours pas clairement établie chez l'Homme.

7.4.4 Sclérose en plaques

Des études ont montrées une diminution de l'expression de la P-gp au niveau de l'endothélium cérébral de patients atteints de sclérose en plaque. La perte de fonction de la P-gp pendant la phase neuroinflammatoire de la maladie pourrait dérégler l'homéostasie cérébrale et aggraver la progression de la maladie via l'exposition des cellules cérébrales à des composés neurotoxiques issus de la circulation (Kooij et al. 2009; 2010).

7.4.5 Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus commune. Il a été suggéré que le polymorphisme génétique associé au gène codant pour la P-gp pourrait être impliqué dans l'accumulation de molécules neurotoxiques au niveau cérébral chez les patients parkinsoniens (Zschiedrich et al. 2009). De plus, il a été rapporté une diminution de l'expression de la P-gp au niveau de la BHE chez ces patients (Westerlund et al. 2008; Kortekaas et al. 2005).

7.4.6 Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la cause principale de démence liée à l'âge (Citron 2010). Cette maladie neurodégénérative est associée à deux types de lésions, le dépôt de plaques amyloïdes constituées par le peptide A β et la dégénérescence neurofibrillaire associée à la protéine Tau. Depuis de nombreuses années, plusieurs études ont reconnu l'implication des transporteurs ABC dans l'efflux du peptide A β du cerveau vers le sang et il a été montré une corrélations inverse entre l'accumulation de plaques amyloïdes et la densité de P-gp chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (van Assema et al. 2012; Abuznait et al. 2012; Vogelgesang et al. 2002). Malgré cette diminution, l'expression partielle de la P-gp au niveau de la BHE constitue tout de même un obstacle au développement de candidats médicaments dont le passage cérébral est insuffisant pour prendre en charge cette pathologie (Burton et al. 2008).

7.4.7 Epilepsie pharmaco-résistante

Chez environ 30 % des patients atteints d'épilepsie, les traitements antiépileptiques ne permettent pas de contrôler la maladie que l'on qualifie alors d'épilepsie pharmaco-résistante (EPR) (Kwan P. 2011). L'une des hypothèses pour expliquer ce phénomène est la surexpression de la P-gp au niveau de la BHE qui empêcherait les médicaments d'atteindre leur cible au

niveau du système nerveux central (Löscher et al. 2005a; Löscher 2005; Remy et al. 2006). En effet, chez l'Homme, il a été montré une forte augmentation de l'expression de la P-gp dans le foyer épileptogène des patients atteints d'EPR par rapport au tissu cérébral environnant ou celui issu de patients sensibles aux traitements (J. Y. W. Liu et al. 2012). De plus, de nombreux médicaments antiépileptiques, même s'ils franchissent la BHE, sont reconnus comme étant substrat de la P-gp *in vitro* et *in vivo*, chez l'animal (Luna-Tortós et al. 2008).

7.4.8 Vers un biomarqueur de suivi des pathologies neuropsychiatriques ?

La P-gp est aujourd'hui considérée comme essentielle au bon fonctionnement de la BHE. En plus de son rôle clé dans la protection et le maintien de l'homéostasie cérébrale, via l'efflux de composés endogènes toxiques ou de xénobiotiques en dehors du SNC, la P-gp est également impliquée dans de nombreuses pathologies neurologiques. La compréhension des voies de signalisation qui régulent ce transporteur apporte des connaissances substantielles sur l'amélioration de l'administration des médicaments à visée cérébrale et sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques de certaines maladies du SNC. Aussi, la fonctionnalité de la P-gp au niveau de la BHE, dans certaines situations pathologiques, pourrait avoir un impact significatif sur le diagnostic, la prévention et le traitement des pathologies cérébrales. A ce jour, l'état des connaissances ne permet pas de déterminer si une dysfonction de la P-gp est la cause, un cofacteur ou une conséquence de la maladie. Dans cette optique, il paraît une nouvelle fois important de développer des outils permettant l'étude fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE chez l'Homme.

7.5 MODALITES D'ETUDE FONCTIONNELLE DE LA P-GP

La mesure du passage cérébral des substances au travers de la BHE constitue à ce jour un enjeu scientifique majeur pour le développement de nouveaux médicaments. Du fait de son implication dans de nombreuses pathologies et du grand nombre de médicaments reconnus comme substrats de ce transporteur, la P-gp est particulièrement étudiée.

Les approches *in vitro* permettent de réaliser des essais avec un contrôle plus important des paramètres expérimentaux et de s'affranchir des questions éthiques par rapport aux études *in vivo*. Il existe de nombreux modèles *in vitro* de BHE, plus ou moins complexes. Certains de ces

modèles permettent d'étudier le rôle de la P-gp. Cependant les données obtenues *in vitro* peuvent rarement être extrapolées à l'Homme et l'utilisation de modèles *in vivo* est nécessaire à leur validation (Roux et al. 2019).

In vivo, des méthodes plus ou moins invasives, ont été développées afin d'étudier le transport de composés entre le sang et le cerveau. Ces techniques permettent d'évaluer qualitativement et/ou quantitativement le transport et l'effet de la P-gp sur le passage de diverses molécules au travers de la BHE.

7.5.1 Modèles de rongeur déficients

Les modèles de souris ou de rats déficients pour le gène d'un transporteur donné ont montré leur importance dans le domaine d'étude des transporteurs *in vivo* (Zamek-Gliszczynski et al. 2013). La plupart des modèles sont disponibles sur le marché et un nouveau modèle de rongeur déficient sur un gène donné peut être rapidement obtenu. Cependant il existe des différences inter-laboratoires dans le régime alimentaire, les conditions de logement et une dérive génétique au sein des populations consanguines qui peuvent mener vers des phénotypes différents selon le laboratoire de provenance du modèle (Giacomini et al. 2010). Ce type de modèle peut être utilisé comme référence pour une inhibition complète de la P-gp. Il a été montré que les souris hétérozygotes pour le gène de la P-gp (*mdr1a*^{+/-}) ont une expression partielle, estimée à 50% de la P-gp au niveau de la BHE par rapport aux souris sauvages. Ce modèle peut donc être utilisé pour étudier une déplétion partielle de la P-gp *in vivo* (Schinkel et al. 1994).

7.5.2 Biodistribution après injection intraveineuse de substrats de la P-gp

Cette méthode consiste à administrer une substance par voie intra veineuse (IV) pour ensuite récupérer le cerveau et le sang de l'animal (Ohno et al. 1978). Cette technique permet de mesurer le rapport cerveau/plasma à des temps prédéfinis. Cependant, les composés étudiés administrés par voie périphérique, peuvent être métabolisés et se fixer aux protéines plasmatiques avant d'atteindre le cerveau. Cela complique l'étude du rôle intrinsèque de la P-gp sur le passage cérébral. Compte tenu du caractère invasif de cette méthode, de nombreux animaux sont nécessaires à chaque temps, pour obtenir et modéliser des données cinétiques permettant d'estimer l'effet de la P-gp sur le passage de la BHE.

7.5.3 Autoradiographie et imagerie par spectrométrie de masse

L'autoradiographie quantitative consiste en l'injection d'une molécule radioactive à un animal, puis le recueil d'échantillons sanguins artériels et de coupes cérébrales. Les échantillons sanguins servent à doser la concentration sanguine du composé et les coupes de cerveau sont congelées puis autoradiographiées. Le développement du film autoradiographique permet de visualiser la distribution et de quantifier le signal radioactif dans le cerveau (Dörner et al. 2009). Les propriétés quantitatives de l'autoradiographie sont très limitées, mais cette approche permet d'apprécier la distribution de la molécule radiomarquée dans plusieurs régions du cerveau.

Le développement de méthodes d'imagerie par spectrométrie de masse permet de mettre en place cette approche sans disposer des molécules radiomarquées. Des coupes cérébrales peuvent être analysées par la technique MALDI (*matrix assisted laser desorption ionisation*) qui permet l'ionisation et la vaporisation de protéines, peptides, sucres et grosses molécules organiques qui ont tendance à être fragmentées par les techniques d'ionisation habituellement utilisées en spectrométrie de masse. Cette technique est de plus en plus utilisée pour étudier l'importance de la P-gp sur la distribution cérébrale de ses substrats dans différentes conditions physiopathologiques (Yano et al. 2014).

7.5.4 Perfusion cérébrale *in situ*

La perfusion cérébrale *in situ* est une méthode utilisée pour tester le passage de molécules à travers la BHE (Abbott, 2013). Cette technique utilise un cathéter inséré dans l'artère carotide commune et une ligature au niveau de l'artère carotide externe. Ce système assure ainsi que la molécule perfusée est dirigée directement vers l'artère qui perfuse le cerveau, en l'isolant du reste de l'organisme. Le principal avantage de cette méthode réside dans la maîtrise de la composition et du temps de la perfusion qui permet le calcul de paramètres pharmacocinétiques (Passeleu-Le Bourdonnec et al. 2013). Cependant la perfusion *in situ* nécessite la mise au point de méthodes analytiques ou l'utilisation de substrats radiomarqués. Des compétences en chirurgie sont nécessaires pour la mise en place de cette technique.

7.5.5 Microdialyse cérébrale

La microdialyse cérébrale permet de déterminer la cinétique des concentrations cérébrales

extracellulaires de la fraction libre d'un médicament. Cette méthode nécessite l'implantation d'une sonde de microdialyse dans une zone cérébrale précise de l'animal. La sonde de microdialyse est constituée d'une membrane semi-perméable qui est continuellement perfusée avec une solution physiologique. Le passage des molécules perfusées se fait alors selon le gradient de concentration depuis le liquide extracellulaire cérébral de l'animal vers la solution physiologique et sera mesuré au cours du temps par une méthode adéquate telle de la chromatographie haute pression (CLHP). La concentration du composé testé peut être mesurée après une administration orale, intraveineuse, sous-cutanée ou administration par perfusion. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle fournit des profils pharmacocinétiques complet, à différents temps, à partir d'un seul animal. Cependant cette technique possède des inconvénients comme l'endommagement possible de la BHE, la nécessité d'une méthode d'analyse sensible des échantillons et le risque d'absorption des molécules lipophiles sur la sonde de microdialyse. De plus, l'analyse des concentrations cérébrales est limitée à la seule région prédéfinie d'implantation de la sonde de microdialyse (Nicolazzo et al. 2006; Passeleu-Le Bourdonnec et al. 2013).

7.5.6 Imagerie

Chez l'Homme il n'est pas concevable de réaliser des prélèvements et des dosages dans le tissu cérébral *in vivo*. Ainsi, les approches de pharmacocinétique préclinique ne peuvent pas être mises en œuvre pour détecter l'importance d'une modulation de la P-gp au niveau la BHE. Il a donc fallu privilégier les approches non-invasives permettant d'étudier les répercussions fonctionnelles de la P-gp au niveau de la BHE chez l'Homme.

Il existe plusieurs techniques d'imagerie qui permettent d'explorer des processus *in vivo* de manière non-invasive. Pour étudier le système nerveux central, trois techniques sont principalement utilisées. L'imagerie par résonance magnétique et l'imagerie nucléaire (IRM) qui regroupe l'imagerie par émission mono-photonique (TEMP) et l'imagerie par émission de positons (TEP). Chacune de ces techniques présente des propriétés plus ou moins adaptées aux paramètres qui sont étudiés au niveau cérébral (figure 10).

Pour étudier une cible moléculaire spécifique telle que la P-gp au niveau de la BHE, il est préférable de se tourner vers une technique proposant une grande variété chimique de sondes substrats du transporteur. Aussi, il faut opter pour une technique sensible permettant une bonne quantification et une résolution temporelle adéquate, afin de détecter les répercussions

fonctionnelles d'une modulation de l'activité du transporteur (Tournier et al. 2018).

L'IRM possède une très bonne résolution spatiale mais aucun ligand substrat de la P-gp n'est actuellement disponible à l'étude. Cette technique ne permet donc pas d'étudier spécifiquement la P-gp au niveau de la BHE. La TEMP est une technique relativement quantitative qui présente une bonne sensibilité. Il existe un nombre limité de radioligands permettant l'étude de la P-gp comme le [^{99m}Tc]sestamibi ou le [^{99m}Tc]tetrofosmin. Ces radiopharmaceutiques ont été utilisés pour étudier le phénomène de MDR au niveau tumoral mais ils ne permettent pas d'étudier la P-gp au niveau de la BHE (Kannan et al. 2009). En effet, même en l'absence de P-gp fonctionnelle, le passage cérébral passif de ces radiotraceurs au travers de la BHE est trop faible. Or, la capacité d'un radiotraceur à générer du contraste entre la situation où la P-gp est fonctionnelle et celle où elle est inhibée est cruciale pour l'étude de ce transporteur (Kannan et al. 2009). Pour ces raisons, la TEP reste la technique d'imagerie de choix. Plusieurs radiotraceurs pour l'imagerie TEP ont été développés pour étudier spécifiquement les répercussions fonctionnelles d'une modulation de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE, de manière non-invasive et translationnelle (Tournier et al. 2018).

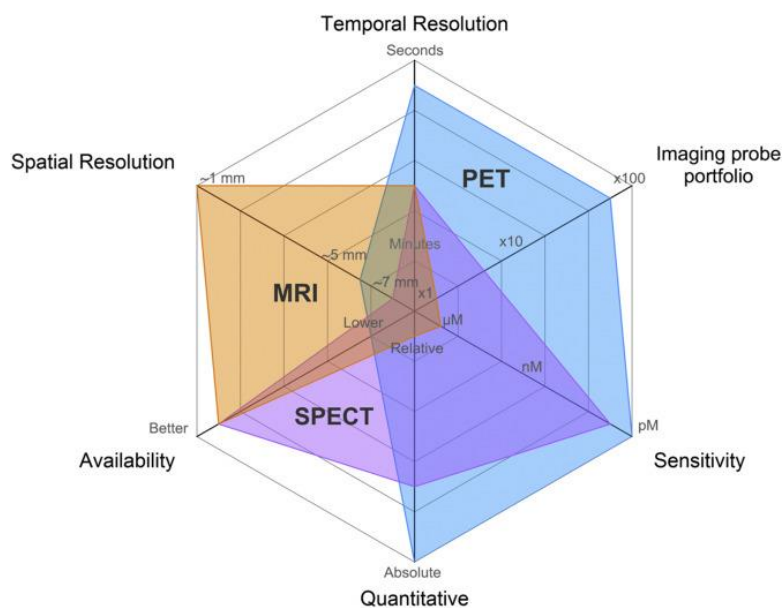


Figure 10 : Propriétés et avantages des différentes techniques d'imagerie pour l'étude des transporteurs de xénobiotiques. D'après N. Tournier et al., *Pharmacology & Therapeutics*, 2018.

7.5.7 Tomographie par émission de positons

La TEP est une technique d'imagerie nucléaire qui utilise des radiotraceurs radiomarqués avec des isotopes émetteurs de positons. Ces isotopes sont instables car ils présentent un excès de protons par rapport au nombre de neutrons au niveau du noyau. Un proton se transforme en neutron en même temps que l'émission d'un positon et d'un neutrino. Le positon est chargé positivement et parcourt la matière sur une courte distance avant de rencontrer un électron et de s'annihiler en libérant deux photons de 511 keV, émis à 180° l'un de l'autre. Cette paire de photons est détectée en coïncidence par la couronne de détecteurs de la caméra située autour du patient (figure 11). Les différentes désintégrations provenant d'un même point sont regroupées par des droites dont l'intersection correspond à la région émettrice. Les données enregistrées et transformées mathématiquement, avec des algorithmes prenant en compte les phénomènes de diffusion et d'atténuation du signal par les tissus, ainsi que la correction de la décroissance radioactive, permettent la reconstruction tridimensionnelle d'une image. Le radiotraceur est généralement injecté par voie intraveineuse et l'imagerie TEP cérébrale permet de mesurer la cinétique des concentrations radioactives dans les tissus. Cette technique permet donc d'étudier des cibles tissulaires spécifiques telle que la P-gp au niveau cérébral chez l'Homme (Langer et al. 2004). L'avantage des radiotraceurs marqués par des atomes émetteurs de positons est la variété des radiotraceurs envisageables. La radiochimie a permis de développer de nombreux ligands spécifiques de récepteurs d'intérêt, notamment en neurologie dans un objectif de diagnostic ou de recherche (Jacobs et al. 2003).

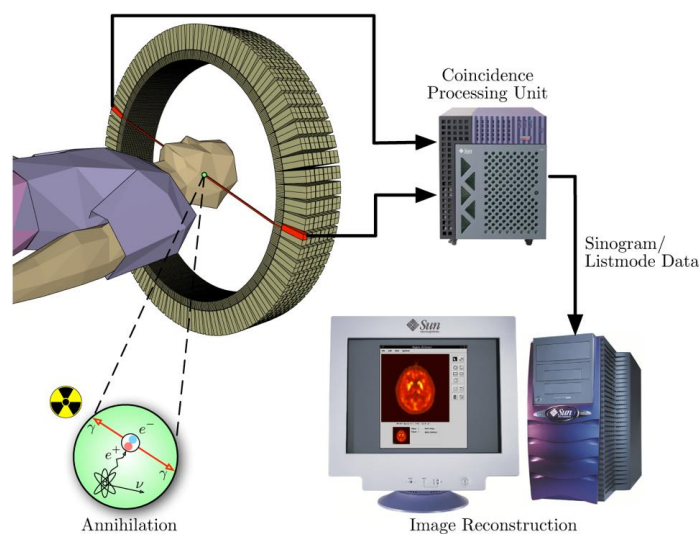


Figure 11 : Principe de la tomographie par émission de positons. D'après I. Jens Maus, domaine public

7.6 MODELISATION DES DONNEES D'IMAGERIE EN TEP

La pharmacocinétique explore le devenir des médicaments dans le corps. Son objectif est de comprendre comment un médicament évolue en analysant la cinétique de sa concentration dans les tissus. Pour ce faire, des modèles mathématiques sont utilisés pour déterminer des paramètres qui décrivent la manière dont le médicament se comporte dans l'organisme. La pharmacocinétique appliquée à l'imagerie TEP vise à quantifier les processus biologiques en se basant sur l'évolution des concentrations du radiotraceur dans les organes au fil du temps. Différents modèles peuvent être appliqués en fonction du radiotraceur et du contexte physiopathologique, avec deux grandes catégories : les modèles compartimentaux et les modèles non-compartimentaux.

7.6.1 Modèles compartimentaux

Un système physiologique peut être analysé en sous-systèmes ou espaces qui le composent et interagissent entre eux, appelés compartiments. Un compartiment représente un ensemble cohérent et homogène qui se comporte de manière uniforme vis-à-vis du radiotraceur et ne correspond pas nécessairement à une réalité anatomique. Chaque compartiment peut être en relation avec les autres. Quatre compartiments sont couramment définis en imagerie TEP :

- Le compartiment plasmatique, qui englobe la fraction inchangée du radiotraceur ainsi que sa fraction libre dans le plasma, notamment artériel.
- Le compartiment tissulaire, qui représente la fraction libre dans les tissus et peut se lier à des cibles spécifiques ou retourner dans le compartiment vasculaire.
- Le compartiment contenant le radiotraceur fixé de manière spécifique à des cibles particulières dans les tissus, comme les récepteurs.
- Le compartiment contenant le radiotraceur fixé de manière non-spécifique à d'autres sites ou cibles que ceux d'intérêt.

Un compartiment peut être ouvert, permettant au radiotraceur d'entrer et de sortir, ou fermé, le radiotraceur se trouve « piégé » au sein du compartiment. Les modèles compartimentaux sont représentés par des diagrammes où les rectangles symbolisent les compartiments et les flèches représentent les échanges entre ces compartiments, représentés par les microconstantes de vitesse cinétique entre les compartiments. Les échanges du radiotraceur entre les

différents compartiments sont généralement décrits par des fonctions mathématiques du premier ordre. L'objectif de la modélisation pharmacocinétique est alors de trouver un modèle qui correspond le mieux aux données expérimentales. Un modèle compartimental est caractérisé par le nombre de compartiments et leurs interactions. Dans les modèles à plusieurs compartiments, on suppose que tous les tissus sont en relation avec le même compartiment sanguin, la plupart du temps représenté par le plasma artériel qui perfuse les tissus. Dans ce type de modèle il est supposé une homogénéité de la distribution du radiotraceur dans le plasma artériel.

Les modèles compartimentaux les plus utilisées sont le modèle à un seul compartiment tissulaire (1TCM) et le modèle à deux compartiments tissulaires (2TCM), présentés dans la Figure 12. Dans ces modèles, le radiotraceur est administré par injection intraveineuse sous forme de bolus et se distribue dans le sang artériel au niveau cardiaque pour ensuite rejoindre les capillaires, où les échanges avec les différents tissus se produisent. Certains tissus peuvent extraire une fraction du radiotraceur, tandis que le reste est transporté de nouveau vers le cœur, amorçant un nouveau cycle de circulation. Dans ce modèle, on suppose que la concentration est homogène et identique dans tout le compartiment, et qu'elle est mesurée dans une artère périphérique. La concentration tissulaire du traceur au fil du temps, notée $C_{1(t)}$, augmente en raison de l'extraction du traceur à partir du compartiment plasmatique artériel. Dans le cadre d'un radiotraceur idéal, on considère généralement que seule la fraction inchangée, également appelée fraction « parentale », du radiotraceur pénètre dans les tissus ou le cerveau, et non ses éventuels radiométabolites, qui sont les métabolites radiomarqués issus du radiotraceur. Étant donné que l'extraction tissulaire suit une cinétique du premier ordre, le transfert du radiotraceur dépend de la concentration parentale $C_{P(t)}$.

Dans le modèle à un compartiment tissulaire (Figure 12 A), les constantes d'échange du traceur entre les compartiments plasmatique (C_p) et tissulaire (C_1) sont notées K_1 (en $\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) pour le transfert du sang vers le tissu, et k_2 (en min^{-1}) pour le transfert du tissu vers le sang. Dans ce modèle, le radiotraceur présent dans le compartiment C_1 peut être sous forme libre, lié de manière spécifique à sa cible (fixation saturable et réversible), ou lié de manière non spécifique à d'autres cibles (fixation non saturable et non réversible).

Dans le modèle à deux compartiments tissulaires (représenté dans la Figure 12 B), on introduit

un compartiment supplémentaire (C_2) qui correspond exclusivement au radiotraceur lié de manière spécifique à sa cible. Le compartiment C_1 représente le radiotraceur sous forme libre et lié de manière non spécifique. Les constantes de vitesse d'échange entre les différents compartiments suivent la même notation que dans le modèle précédent, à savoir : K_1 , k_2 , k_3 et k_4 . Une variante de ce modèle prend en compte l'irréversibilité de la liaison spécifique du radiotraceur à sa cible, ce qui signifie que le compartiment spécifique C_2 est considéré comme fermé, avec la valeur de k_4 fixée à zéro.

Il existe aussi, pour certains radiotraceurs, des modèles plus complexes avec plus de compartiments tissulaires.

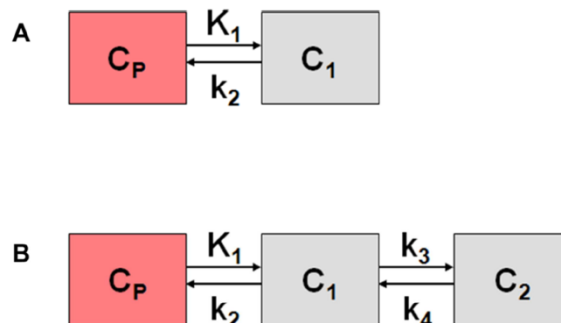


Figure 12 : Modèles compartimentaux, d'après le logiciel Pmod®

En A le modèle à un compartiment tissulaire (1TCM) et en B le modèle à 2 compartiments tissulaires (2TCM)

7.6.1.1 La fonction d'entrée artérielle

Pour réaliser une modélisation compartimentale, il est nécessaire d'avoir accès à la cinétique sanguine artérielle du radiotraceur, ainsi qu'à la mesure de sa fraction inchangée. En effet, dans la plupart des cas, seule la fraction libre du radiotraceur dans le sang peut être échangée entre les différents compartiments. Cette fraction libre doit donc être déterminée à partir d'échantillons sanguins prélevés d'une artère tout au long de l'examen TEP. Un échantillon de sang total contient à la fois le radiotraceur fixé aux globules rouges et les différentes formes du radiotraceur dans le plasma : libre, lié aux protéines plasmatiques et transformé en métabolites ou radiométabolites. La mesure de la radioactivité plasmatique par comptage gamma et l'estimation de la fraction parentale par chromatographie en phase liquide radiochimique (radio-CLHP) permettent d'obtenir la fonction d'entrée artérielle corrigée des radiométabolites (Pike 2009).

Grâce à cette fonction d'entrée artérielle corrigée des radiométabolites, la modélisation compartimentale permet d'estimer les constantes d'échange entre compartiments (microparamètres), mais aussi de calculer les macroparamètres qui caractérisent sa distribution tissulaire globale, comme par exemple le volume de distribution total V_T , qui correspond au rapport tissu/plasma à l'équilibre des concentrations (Innis et al. 2007).

7.6.2 Modèles non-compartimentaux

Dans certaines situations, les modèles compartimentaux peuvent être difficiles à appliquer pour décrire la cinétique de radiotraceurs. Sous certaines conditions, des alternatives moins informatives peuvent être mises en place. Parmi ces alternatives, on trouve les méthodes utilisant une région de référence, qui permettent de se passer de la mesure de la fonction d'entrée artérielle corrigée de la fraction parentale du radiotraceur. Il y a également les méthodes graphiques, qui permettent de s'affranchir de toute configuration compartimentale. Bien que moins précises, ces méthodes offrent des possibilités particulièrement pertinentes pour permettre une interprétation moléculaire de données d'imagerie TEP.

7.6.2.1 Méthodes avec région de référence

Les méthodes avec région de référence permettent l'analyse de radiotraceurs réversibles au niveau du système nerveux central (Lammertsma et al. 1996) (Figure 13). Le prérequis pour utiliser cette méthode est l'existence d'un tissu de référence qui doit être dépourvu de la cible étudiée et dans lequel la cinétique du radiotraceur doit pouvoir être modélisé par un modèle à un compartiment tissulaire. En théorie, ce type de méthode ne peut pas être appliquée à une région extracérébrale car les constantes d'échange K_1 et k_2 sont spécifiques au passage de la BHE (Foll et al. 2007).

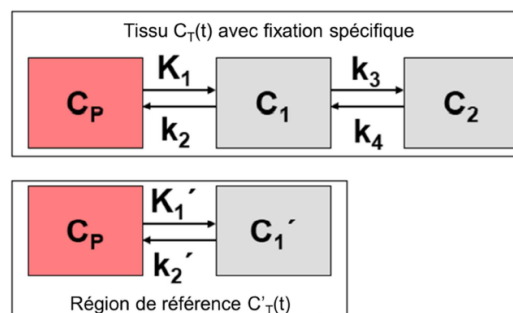


Figure 13 : Modèle avec région de référence, d'après le logiciel Pmod®

7.6.2.2 Normalisation par tissus de référence

En pharmacocinétique expérimentale, le rapport entre la concentration de médicament non lié (libre) dans le fluide interstitiel du cerveau et celle dans le plasma est appelé coefficient de partage non lié ($K_{p,uu}$). Ce paramètre est indépendant de la liaison aux protéines dans le sang ou de la liaison aux composants du tissu cérébral. Les techniques d'imagerie ne permettent pas de mesurer la fraction non-liée au niveau cérébral. Néanmoins, pour étudier le passage cérébral, il est parfois possible de normaliser le signal cérébral par un tissu de référence ou par le plasma. Une étude préclinique utilisant à la fois la TEP et la microdialyse a montré que la TEP peut être utilisée pour traduire les concentrations totales de la ^{11}C -oxycodone, mesurées de manière non-invasive en concentrations non liées, à condition que la contribution des métabolites radiomarqués soit mineure ou puisse être prise en compte dans l'estimation du $K_{p,uu}$ (Gustafsson et al. 2017). Néanmoins, cette approximation ne peut en aucun être généralisée pour les autres radiotraceurs sans validation préalable.

7.6.2.3 Méthodes graphiques

Les deux méthodes graphiques les plus connues en imagerie TEP sont l'analyse graphique de Patlak, pour les radiotraceurs à fixation irréversible (Patlak et al. 1983), et l'analyse graphique de Logan, pour les radiotraceurs à fixation réversible (Logan et al., 1990). L'analyse de Logan (Logan et al. 1990) est une méthode d'analyse graphique basée sur une régression linéaire. C'est une méthode simplifiée qui transforme les équations du modèle en une équation linéaire. Cette méthode permet notamment d'estimer le V_T du radiotraceur dans les différentes régions tissulaires, par intégration des concentrations radioactives dans les tissus et dans le plasma. Ainsi, en l'absence de fixation spécifique dans le cerveau, cette approche permet d'estimer le passage cérébral de radiotraceurs lorsque les modèles compartimentaux ne permettent pas une estimation correcte.

7.7 IMAGERIE TRANSLATIONNELLE DE LA P-GP

Plusieurs molécules d'intérêt ont été radiomarquées pour étudier la P-gp au niveau de la BHE, en étudiant leur distribution cérébrale par imagerie TEP. Des inhibiteurs de la P-gp radiomarqués, capables en théorie de se lier au transporteur, ont été évalués. Il était alors attendu que le signal TEP obtenu permette de visualiser la densité de la P-gp au niveau de la

BHE. Ainsi ont été développés et évalués le [^{11}C]tariquidar le [^{11}C]élacridar et le [^{11}C]laniquidar, trois inhibiteurs puissants de troisième génération. Cependant tous ces inhibiteurs ont révélé un passage cérébral faible et un comportement de substrat de la P-gp lors des essais au niveau de la BHE de rongeur puis chez l'Homme (Kannan et al. 2013).

La recherche s'est alors concentrée sur le marquage de molécules substrats de la P-gp afin d'évaluer la fonction. En effet, il est possible d'interpréter la cinétique cérébrale des radiotraceurs en regard de leur cinétique plasmatique et, par l'utilisation de modèles pharmacocinétiques, de déterminer les constantes d'échange qui décrivent le passage des radiotraceurs au travers de la BHE (Kannan et al. 2009; Auvity et al. 2018). Cela permet d'étudier les répercussions fonctionnelles de la P-gp en comparant des paramètres neuropharmacocinétiques avant et après inhibition pharmacologique de la P-gp.

A ce jour, trois radiotraceurs ont fait l'objet d'un développement radiopharmaceutique et d'une validation chez l'Homme pour l'étude de la P-gp au niveau de la BHE (Kannan et al. 2009; Tournier et al. 2018): le [^{11}C]vérapamil, le [^{11}C]N-desmethyl-lopéramide et le [^{11}C]métoclopramide. Ces radiotraceurs sont considérés comme sélectifs de la P-gp car ils ne sont pas transportés par la BCRP (Pottier et al. 2016; Wanek et al. 2013).

7.7.1 [^{11}C]vérapamil

Le vérapamil est un médicament inhibiteur des canaux calciques largement utilisé en cardiologie. Il est substrat et inhibiteur de la P-gp. Aux doses traceuses utilisées pour l'imagerie TEP, le vérapamil marqué au carbone-11 se comporte uniquement comme un substrat de la P-gp (Müllauer et al. 2012). Il a été le premier traceur développé pour étudier la P-gp au niveau de la BHE par imagerie TEP chez l'Homme. La majorité des études cliniques a donc été réalisée avec ce radiotraceur (Muzi et al. 2009). Le défaut principal de cette molécule est qu'elle subit un important métabolisme chez l'Homme. Il a été montré que l'énantiomère (*R*)-[^{11}C]vérapamil est un peu moins métabolisé que le (*S*)-[^{11}C]vérapamil, avec une capacité de transport par la P-gp comparable (Luurtsema et al. 2005). Aussi, c'est souvent l'énantiomère (*R*)-[^{11}C]vérapamil qui est utilisé. Certains des métabolites du [^{11}C]vérapamil sont radiomarqués et également substrats de la P-gp, alors que d'autres passent librement la BHE. Ainsi, la quantification et la modélisation des échanges entre le sang et le cerveau sont particulièrement difficiles pour ce

radiotraceur (Tracy et al. 1999; Luurtsema et al. 2005).

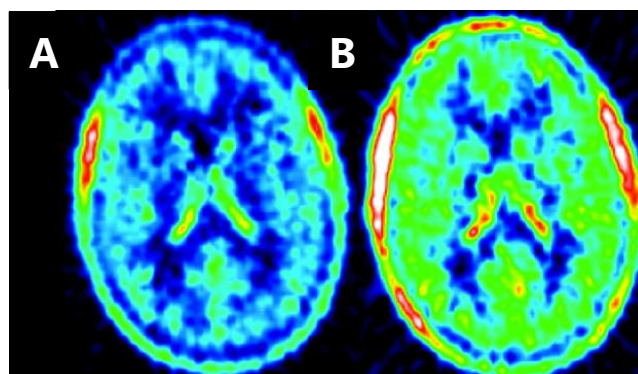


Figure 14 : Image obtenue après injection de [^{11}C]vérapamil chez l'Homme. D'après S. Eyal et al., 2009. En absence (A) et en présence (B) d'une inhibition de la P-gp par la ciclosporine.

7.7.2 [^{11}C]N-desmethyl-lopéramide

Le lopéramide est un médicament agoniste des récepteurs opioïdes μ , sans effet sur le système nerveux central du fait de son importante capacité d'efflux par la P-gp au niveau intestinal et cérébral. Le lopéramide exerce son activité pharmacologique au niveau des récepteurs aux opiacés intestinaux en ralentissant le transit. Il est utilisé dans le traitement symptomatique des diarrhées. Ces observations ont conduit à la synthèse du [^{11}C]lopéramide comme sonde P-gp. Comme le [^{11}C]vérapamil, le [^{11}C]lopéramide est fortement métabolisé. Son principal métabolite, le [^{11}C]N-desmethyl-lopéramide ([^{11}C]NdLop) est retrouvé en grande quantité dans le cerveau, lorsque la P-gp est inhibée. Le [^{11}C]NdLop est également substrat de la P-gp et bénéficie d'une excellente stabilité métabolique chez l'Homme et n'a pas d'affinité pour les récepteurs opioïdes (Kreisl et al. 2010). Son transport par la P-gp est tel que son passage cérébral basal vers le compartiment cérébral est négligeable. Une fois la BHE passée, le [^{11}C]NdLop est retenu dans le tissu cérébral par séquestration lysosomale (Kannan et al. 2011). Ces propriétés limitent les applications cliniques du radiotraceur qui ne permet pas d'explorer les répercussions fonctionnelles dans les situations où une augmentation de l'efflux par la P-gp est suspectée.

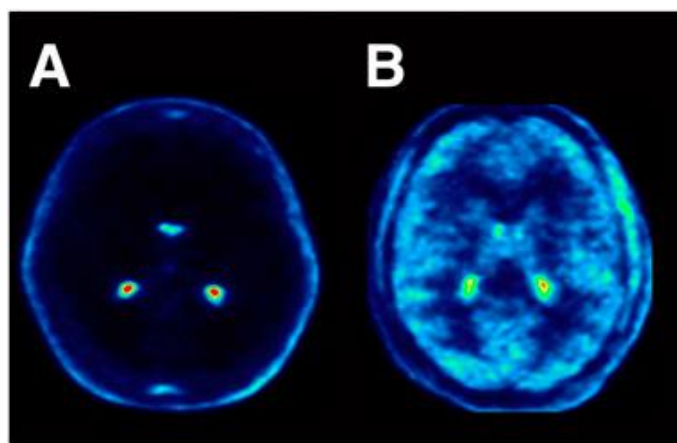


Figure 15 : Image obtenue après injection de $[^{11}\text{C}]\text{NdLop}$ chez l'Homme. D'après W. Kreils et al., 2015. En absence (A) et en présence (B) d'une inhibition de la P-gp par le tariquidar

7.7.3 $[^{11}\text{C}]\text{méclopramide}$

Le métopramide est un médicament neuroleptique de la famille des benzamides, exerçant principalement une action antagoniste sur les récepteurs dopaminergiques D2 (Lee et al. 2010). Il est indiqué comme stimulant de la motricité intestinale et accélérateur de la vidange gastrique, dans le traitement symptomatique des nausées et des vomissements. Le métopramide est un substrat de la P-gp *in vitro*. Son passage cérébral est augmenté chez la souris déficiente en P-gp (Feng et al. 2008). Par rapport aux radiotraceurs précédents, le $[^{11}\text{C}]\text{méclopramide}$ bénéficie d'un passage cérébral basal relativement important et ses métabolites ne passent pas la BHE, même en situation d'inhibition de la P-gp chez le rongeur (Pottier et al. 2016). Cette caractéristique a permis de mettre en évidence et de quantifier le rôle de la P-gp dans la clairance de ses substrats du cerveau vers le sang de manière non-invasive chez l'Homme (Tournier et al. 2019). De plus, on peut considérer que les propriétés de transport du $[^{11}\text{C}]\text{méclopramide}$ vis-à-vis de la P-gp sont représentatives de celles de médicaments à visée neurologique qui sont de faibles substrats de ce transporteur (Mahar Doan et al. 2002).

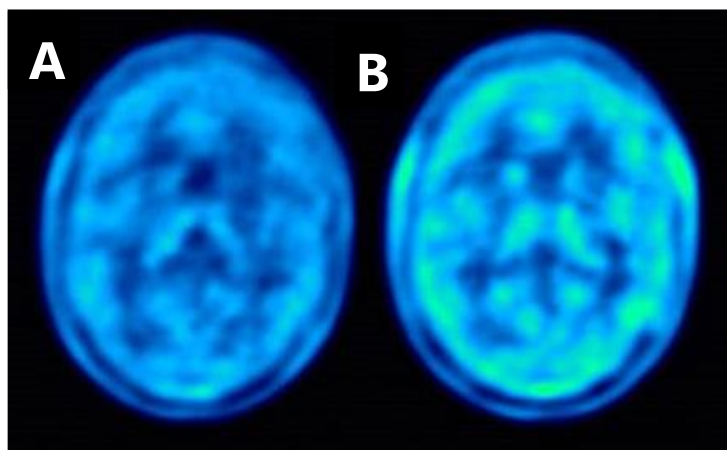


Figure 16 : Image obtenue après injection $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide chez l'Homme. D'après N. Tournier et al., 2019 En absence (A) et en présence (B) d'une inhibition de la P-gp par la ciclosporine

7.7.4 $[^{18}\text{F}]$ MC225

Le $[^{18}\text{F}]$ MC225, un radiotracer développé plus récemment, semble être sélectif de la P-gp et a bénéficié d'un grand nombre d'essais pour l'étude fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE chez l'animal (Savolainen et al. 2017). Il est radiomarké par le fluor-18, dont la période radioactive (110,8 minutes) est plus confortable que celle du carbone-11 (20,4 minutes). Les données de distribution cérébrale basale du $[^{18}\text{F}]$ MC225 chez l'Homme ont été publiées. Néanmoins, les répercussions d'une inhibition de la P-gp sur son passage cérébral n'ont pas été rapportées à ce jour (García-Varela, Váñez García, et al. 2021). Ces données sont essentielles à la validation du $[^{18}\text{F}]$ MC225 comme substrat de la P-gp au niveau de la BHE chez l'Homme. Chez le rat, la sensibilité du $[^{18}\text{F}]$ MC225 à l'inhibition de la P-gp par le tariquidar est plus importante que celle du $[^{11}\text{C}]$ vérapamil. Aussi, le passage cérébral significatif du $[^{18}\text{F}]$ MC225 en condition basale a permis, à l'instar du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide, de visualiser une stimulation de la P-gp au niveau de la BHE chez la souris (García-Varela, Rodríguez-Pérez, et al. 2021).

7.8 L'ÉPILEPSIE PHARMACO-RESISTANTE : DES HYPOTHESES MOLECULAIRES A L'IMAGERIE CLINIQUE

L'épilepsie est l'une des maladies neurologiques les plus courantes et touche environ 65 à 70 millions de personnes dans le monde. La pathogénèse de la maladie n'est pas entièrement

élucidée mais semble résulter d'une hyperexcitabilité neuronale entraînant un dérèglement des potentiels d'action des neurones responsables des crises. Cette hyperexcitabilité neuronale semble être liée à une instabilité ionique de la membrane cellulaire et au déséquilibre entre la neurotransmission inhibitrice GABAergique et la neurotransmission excitatrice glutamatergique. Les médicaments antiépileptiques visent à prévenir la survenue et la récurrence des crises en *i*) bloquant l'hyperexcitabilité neuronale, en *ii*) renforçant l'activité inhibitrice du GABAergique, en *iii*) inhibant l'activité excitatrice du système glutamatergique ou en *iv*) modifiant la conductance ionique (canaux Na^+ ou Ca^{2+}). L'inhibition de la transmission glutamatergique peut être indirecte en inhibant les canaux Na^+ voltage-dépendants des neurones glutamatergiques ou des neurones post-synaptiques (Thijs et al. 2019).

Malgré une prescription optimisée par le suivi thérapeutique des concentrations plasmatiques des médicaments antiépileptiques, environ 30% des patients épileptiques présentent une EPR et ne répondent pas suffisamment aux traitements antiépileptiques. Ces patients souffrent de crises d'épilepsie incontrôlées qui peuvent entraîner un décès prématuré, des dommages physiques et psychologiques et sont généralement associées à une détérioration significative de la qualité de vie. Aujourd'hui, le développement de nouveaux médicaments antiépileptiques n'a pas permis de contrôler l'EPR. La physiopathologie de l'EPR reste mal connue et plusieurs hypothèses ont été proposées pour l'expliquer (Figure 17) :

- L'hypothèse de la cible qui suppose que des altérations acquises et adaptatives au niveau moléculaire dans les cibles des médicaments antiépileptiques entraînent une sensibilité réduite aux médicaments.
- L'hypothèse de la variation génétique qui suppose que les différences au niveau des cibles des médicaments antiépileptiques entraînant une pharmacorésistance sont innées et d'origine génétiques
- L'hypothèse de la gravité intrinsèque qui suppose que la résistance aux médicaments est liée à la gravité de l'épilepsie, et à la fréquence des crises.
- L'hypothèse du réseau neuronal qui suggère que la dégénérescence et la reconstruction du réseau neuronal inhibent l'accès des médicaments aux cibles neuronales, affectant ainsi le système anticonvulsivant endogène.

- L'hypothèse pharmacocinétique qui soutient que la surexpression de transporteurs d'efflux réduit les concentrations plasmatiques des médicaments antiépileptiques chez les patients, diminuant ainsi leur efficacité.
- Et enfin, l'hypothèse des transporteurs, décrite sur la Figure 18, qui suggère que les traitements antiépileptiques ne traversent pas suffisamment la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour atteindre leur cible dans le système nerveux central (SNC) du fait d'une augmentation de l'expression et de l'activité des transporteurs d'efflux.

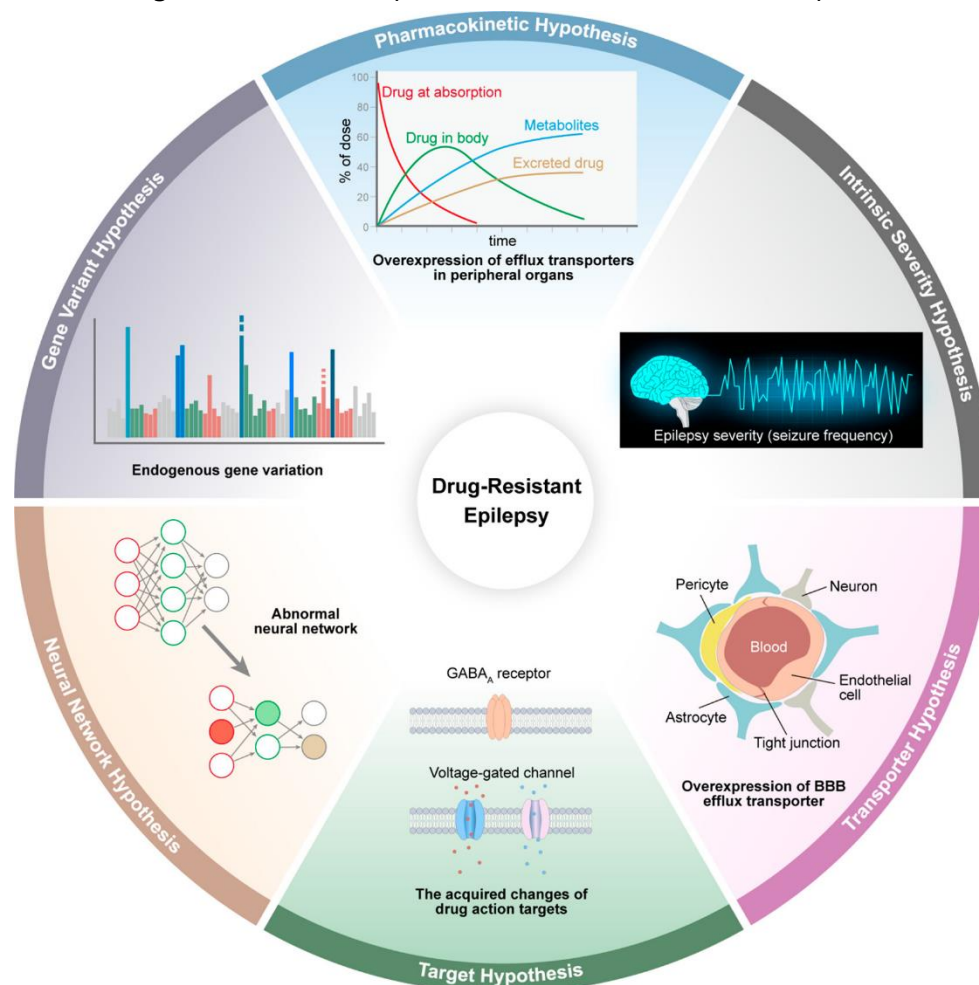


Figure 17: Hypothèses de l'EPR. D'après Tingting Hu et al., *Journal of medicinal chemistry* 2023

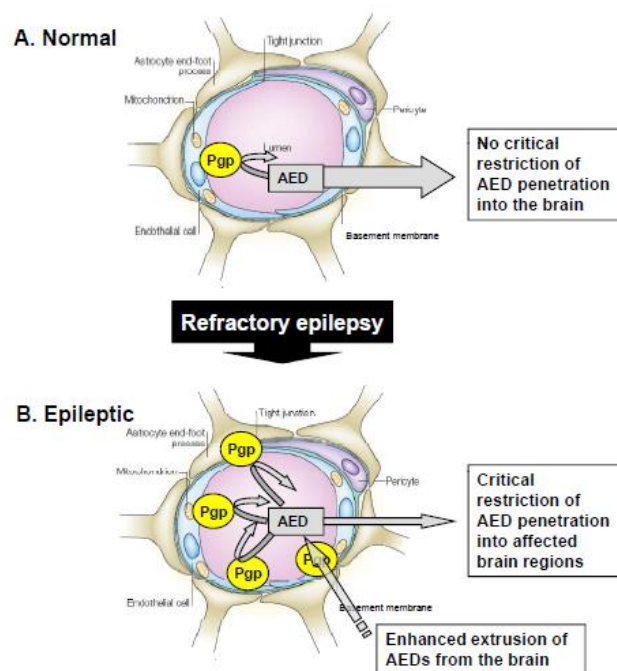


Figure 18: Hypothèse des transporteurs. D'après W. Loscher et al., *Curr Pharm Des*, 2011

En effet, une expression accrue de la P-gp, le transporteur d'efflux le plus étudié au niveau de la BHE, a été démontrée *ex vivo* sur des prélèvements chirurgicaux au niveau de foyers épileptogènes issus du cerveau de patients atteints d'EPR par rapport à des sujets sains (Tishler et al. 1995; J. Y. W. Liu et al. 2012). Aussi, l'expression de la P-gp était plus importante chez les patients atteints d'EPR que chez les patients pharmaco-sensibles (J. Y. W. Liu et al. 2012).

Les mécanismes de régulation de la P-gp dans le contexte de l'EPR impliquent le glutamate, le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2) et la cyclooxygénase-2 (COX-2). Les récepteurs NMDA provoquent un afflux d'ions calcium dans la cellule, ce qui active la phospholipase A2. La phospholipase A2 est une enzyme qui décompose les phospholipides pour libérer de l'acide arachidonique. L'augmentation de la production d'acide arachidonique par la cellule est ensuite convertie en prostaglandines par la cyclooxygénase-2 (COX-2). La prostaglandine se lie au récepteur 1 de la prostaglandine E (EP-1R) et entraîne la translocation du facteur nucléaire kappa-B (NF-kB) dans le noyau, ce qui augmente la transcription du gène *ABCB1* et donc l'expression de la protéine P-gp (B. Bauer et al. 2008; Mohamed et al. 2019). De plus, l'augmentation des niveaux intracellulaires de Ca^{2+}

provoquée par le glutamate induit la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne une translocation accrue du facteur nucléaire (dérivé érythroïde-2)-related factor-2 (Nrf2), un facteur de transcription qui stimule la surexpression de la P-gp médiée par NF- κ B (Figure 19).

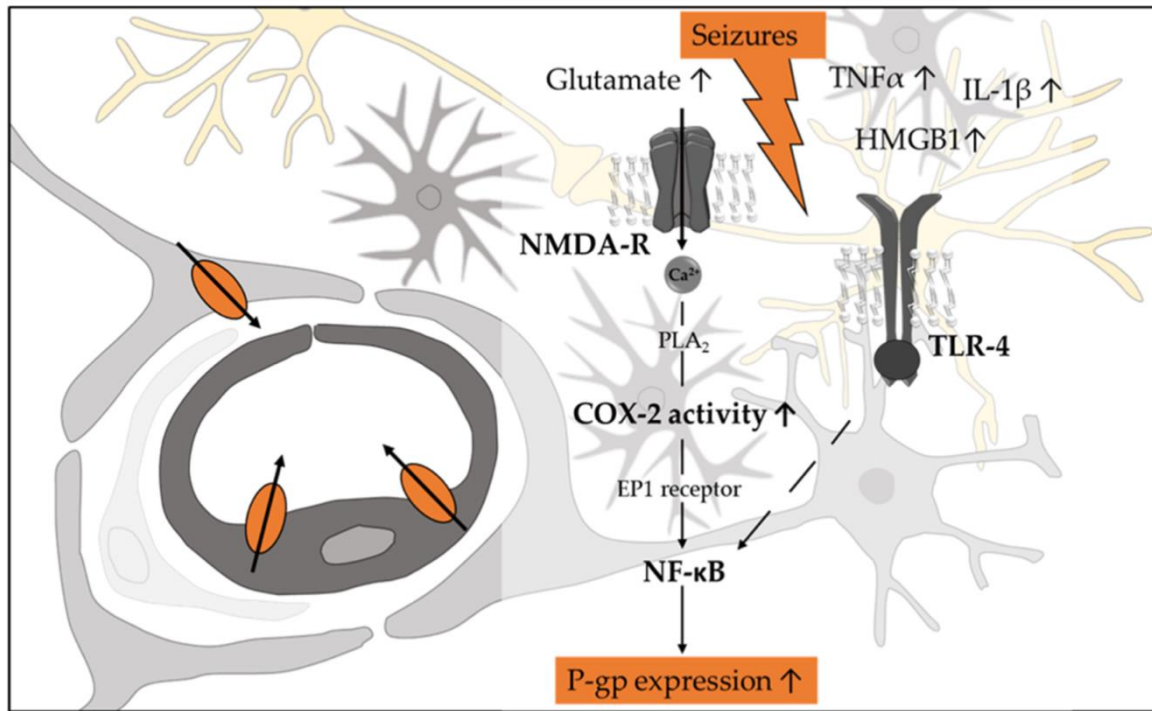


Figure 19 : Schéma des mécanismes supposés liés aux crises d'épilepsie dans l'augmentation de l'expression de la P-gp dans les tissus cérébraux affectés par l'épilepsie. D'après Taggi et al., *Pharmaceutics*, 2022.

Le facteur transcriptionnel NF- κ B est considéré comme jouant un rôle central dans la cascade neuroinflammatoire déclenchée par les crise d'épilepsie, avec l'augmentation de la production/libération de médiateurs pro-inflammatoires (Vishwakarma et al. 2022).

En ce qui concerne les mécanismes de régulation sous-jacents, un certain nombre de médicaments antiépileptiques modulent l'expression des transporteurs par l'activation de facteurs de transcription nucléaires tels que PXR, PPAR α et PPAR γ (Lombardo et al. 2008). Une étude utilisant le [¹¹C]NdLop comme sonde P-gp a conclu à l'augmentation de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE après administration de lévétiracétam, de topiramate ou de phénytoïne à des doses thérapeutiques (mais pas le valproate de sodium) (Moerman et al. 2011). Ces résultats sont tout à fait surprenants car le passage cérébral basal du [¹¹C]NdLop est

négligeable, ce qui empêche théoriquement toute détection d'une induction fonctionnelle de la P-gp. À l'inverse (Ambroziak et al. 2010) n'ont pas retrouvé d'augmentation de l'expression ou de l'activité de la P-gp suite à l'administration de phénobarbital, phénytoïne ou carbamazépine sur des cellules endothéliales de cerveau de rat, GNTF et sur les cellules MDCKII-MDR1 qui surexpriment la P-gp humaine.

Des recherches antérieures ont permis d'établir un lien étroit entre la neuroinflammation et l'expression de la protéine P-gp au niveau de la BHE dans le contexte de l'EPR (Vishwakarma et al. 2022). Lorsqu'une lésion cérébrale se produit ou lors de crises récurrentes, les astrocytes et les neurones libèrent des médiateurs inflammatoires ainsi que du glutamate (Figure 20). Cette réponse neuroinflammatoire peut entraîner une augmentation de l'expression des protéines de transport, et notamment de la P-gp, au niveau de la BHE. Ainsi, il reste difficile de déterminer si la surexpression de la P-gp dans l'EPR est la cause ou la conséquence des crises. Dans tous les cas, ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'expression de la P-gp est liée aux mécanismes moléculaires de l'EPR. Ainsi, la P-gp pourrait accompagner les processus neuroinflammatoires particulièrement complexes mis en jeu dans le développement de l'EPR.

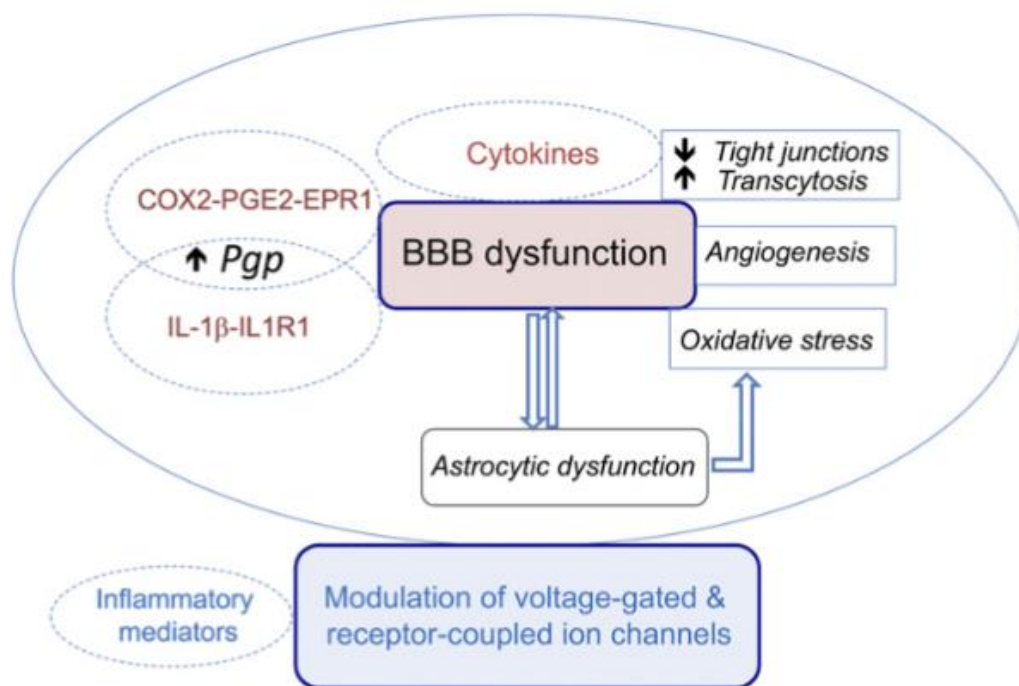


Figure 20: Schéma des mécanismes de la neuroinflammation impliqués dans l'augmentation de l'expression de la P-gp au niveau du tissu cérébral atteint par l'épilepsie. D'après Löscher et al., *Pharmacological Reviews*, 2020

Cependant, l'hypothèse des transporteurs pour expliquer l'EPR reste très controversée. En effet, cette hypothèse implique que les médicaments antiépileptiques sont des substrats de la P-gp. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour déterminer si les médicaments antiépileptiques sont des substrats de la P-gp *in vitro* ou *in vivo*. Concernant une même molécule, il existe souvent des divergences de conclusion entre les différentes techniques ou les différents modèles utilisés. Ainsi, des conclusions différentes ont pu être obtenues en fonction de l'espèce étudiée ou même du type cellulaire utilisé pour réaliser les expériences de transports.

Transport des médicaments antiépileptiques in vitro

La plupart des modèles *in vitro* ont été développés et optimisés pour étudier le transport de composés « avides », c'est-à-dire avec une forte capacité de transport. C'est en particulier le cas du modèle de référence qui consiste à déterminer le ratio d'efflux à travers une couche monocellulaire qui surexprime la P-gp humaine. Or, les antiépileptiques sont pour la plupart de petites molécules très lipophiles qui traversent librement la BHE, même lorsque la P-gp est fonctionnelle. Ainsi, les molécules antiépileptiques, si certains sont transportés par la P-gp,

correspondent à la définition des « faibles substrats » de ce transporteur.

Le midazolam et la phénytoïne donnent des résultats contradictoires sur les cellules MDCK-MDR1 (P-gp humaine) vs MDCK-mdr1a (P-gp murine) (Feng et al. 2008; J. W. Polli et al. 2001) et LLC-PK1-MDR1 vs LLC-PK1-mdr1a (Baltes, Gastens, et al. 2007), suggérant ainsi une importante différence du caractère substrat de la P-gp pour les protéines humaines et murines.

Aussi, des résultats contradictoires ont été obtenus pour le diazépam, le midazolam, la phénytoïne et le phénobarbital suivant le type de cellules utilisé pour étudier le transport de molécules par la P-gp, par le test de transport bidirectionnel. Ainsi, en utilisant ce modèle, le diazépam n'est pas transporté par la P-gp des cellules MDCK-MDR1 et MDCK-mdr1a (Feng et al. 2008), mais l'est par celle des cellules LLC-PK1-MDR1 (Uchida, Ohtsuki, Kamiie, et al. 2011). Les cellules MDCK sont issues du rein de chien et les cellules LLC-PK1 sont issues du rein de porc. Ces différences pourraient s'expliquer par l'importance relative de l'expression de la P-gp endogène (canine ou porcine) sur ces modèles de cellules transfectées par la P-gp humaine (Kuteykin-Teplyakov et al. 2010). Le phénobarbital ne fait l'objet d'aucun efflux significatif sur les cellules Caco-2 (Crowe et al. 2006), mais une étude a conclu à un transport par la P-gp sur les cellules rBMEc (cellules endothéliales microvasculaires issues du cerveau de rat) (Yang et al. 2008). De plus, il existe des différences entre l'expression des transporteurs endogènes des lignées cellulaires MDCKII natives (utilisées comme contrôle) et les cellules MDCKII transfectées par *MDR1* (Kuteykin-Teplyakov et al. 2010). Cette particularité pourrait conduire à des conclusions différentes pour un même potentiel substrat P-gp par rapport aux cellules LLC-PK1 qui possèdent une expression comparable entre les lignées natives et celles transfectées par le gène *MDR1* (Kuteykin-Teplyakov et al. 2010).

La méthode de transport bidirectionnel n'est clairement pas adaptée au transport de substrats faibles de la P-gp, en raison de l'importante composante de diffusion passive le long du gradient de concentration, qui peut masquer la contribution de la P-gp (Zhang et al. 2012). Dans le but d'évaluer le transport actif de petites molécules lipophiles comme les antiépileptiques, l'essai de transport bidirectionnel a été modifié en ajoutant le médicament dans les deux chambres au début de l'essai. Cette méthode, appelée dosage de l'équilibre de concentration (CETA), a permis de reclasser la phénytoïne (Luna-Tortós et al. 2008; Zhang et al. 2012; Dickens et al. 2013), le lévétiracétam (Luna-Tortós et al. 2008), le topiramate (Luna-Tortós

et al. 2009) et le phénobarbital (Luna-Tortós et al. 2008; Zhang et al. 2010) comme substrats de la P-gp, alors qu'ils n'avaient pas été identifiés comme tels lors des tests bidirectionnels conventionnels sur des cellules LLC-PK1-MDR1 (Baltes, Gastens, et al. 2007; Feng et al. 2008; Luna-Tortós et al. 2008; 2009). L'acide valproïque (Luna-Tortós et al. 2009; Baltes, Fedrowitz, et al. 2007), la carbamazépine (Feng et al. 2008; Baltes, Gastens, et al. 2007; Crowe et al. 2006; Luna-Tortós et al. 2009) et l'éthosuximide (Zhang et al. 2010) ont quant à eux été confirmés comme non-substrats de la P-gp avec ce modèle.

Une étude menée par D. Dickens en 2013 avait pour objectif d'étudier le transport de la phénytoïne, la lamotrigine et la carbamazépine par la P-gp en utilisant sept modèles de transport *in vitro* différents. Dans cette étude, les auteurs ont pu mesurer l'expression de la P-gp suivant les types cellulaires utilisés. Par rapport à la lignée cellulaire « CEM », utilisée comme référence avec une faible expression de la P-gp, les cellules LLC-PK1-MDR1 présentaient une expression de la P-gp respectivement 86 fois supérieure, et les cellules MDCKII-MDR1 une expression 43 fois supérieure. L'expression endogène de la P-gp dans les cellules Caco-2 et hCMEC/D3 était 4,2 et 11,6 fois supérieure à celle des cellules CEM. Cette différence importante d'expression de la P-gp pourrait expliquer une partie de la variabilité des résultats obtenus dans les différentes études *in vitro* pour un même substrat, mais sur des lignées cellulaires différentes. Cependant, la différence d'expression de la P-gp au niveau des cellules ne peut pas être le seul facteur de variabilité en jeu. En ce qui concerne le transport de la lamotrigine, l'étude de C. Luna-Tortos en 2008 a conclu à un faible transport de la lamotrigine par la P-gp dans le modèle CETA, tandis que l'étude de D. Dickens en 2013 n'a pas montré de transport significatif par la P-gp en utilisant la même méthode avec les mêmes types cellulaires (Luna-Tortós et al. 2008; Dickens et al. 2013).

Enfin, la concentration des molécules testées est très différente d'une étude à l'autre. On peut faire l'hypothèse d'un transport par la P-gp saturable qui pourrait être masqué si la concentration d'incubation est trop importante. (Löscher et al. 2011)

Transport des médicaments antiépileptiques in vivo

Les essais de transport *in vitro* peuvent être utilisés pour déterminer si un médicament est un substrat de la P-gp humaine. Cependant, seules les expériences *in vivo* permettent d'apprécier l'importance de ce transport dans l'environnement complexe de la BHE. Parmi les techniques

couramment utilisées pour évaluer si une molécule est un substrat de la P-gp cérébrale, on retrouve la microdialyse et l'utilisation de modèles de rongeurs génétiquement déficients, ou partiellement déficient en P-gp.

Des expériences de microdialyse *in vivo* sur des modèles animaux déficients pour les gènes *Abcb1a/1b* ont permis d'identifier l'oxcarbazépine (Marchi et al. 2004), la phénytoïne, le felbamate, la lamotrigine et le phénobarbital (H. Potschka et al. 2001; Heidrun Potschka et al. 2002), comme des substrats de la P-gp cérébrale chez la souris. En revanche, le transport du valproate (Baltes, Fedrowitz, et al. 2007) et du lévétiracétam (Heidrun Potschka et al. 2004) n'a pas été démontré de manière concluante avec cette méthode. Il existe des études contradictoires concernant le transport de la carbamazépine par la P-gp (Heidrun Potschka et al. 2001; Höcht et al. 2009). Pour H. Potschka et al., la carbamazépine est un substrat de la P-gp car l'administration de vérapamil, un puissant inhibiteur de la P-gp, augmente la concentration de la carbamazépine dans le milieu interstitiel, mesuré par microdialyse. Pour C. Höcht et al., une induction de la P-gp par la répétition des crises chez le rat, n'a pas modifié la disponibilité cérébrale de la carbamazépine (Höcht et al. 2009).

Seuls deux antiépileptiques ont été identifiés comme substrats de la P-gp grâce au modèle de souris déficientes en P-gp : la phénytoïne et le topiramate (Nakanishi et al. 2013; Schinkel et al. 1996; M. Bankstahl et al. 2016; Rizzi et al. 2002; Sills et al. 2002). Des études contradictoires existent cependant pour la phénytoïne (Sills et al. 2002; Doran et al. 2005) (Rizzi et al. 2002). Le phénobarbital, quant à lui, est considéré comme substrat au niveau de la BHE chez la souris selon une étude de Yang et al. en 2008 (Yang et al. 2008).

Pour conclure au statut de substrat P-gp d'un médicament antiépileptique, Zhang et ses collègues ont proposé de combiner les techniques *in vitro* et *in vivo* par l'intermédiaire d'un arbre décisionnel (Figure 21). Avec cette approche, la majorité des médicaments antiépileptiques sont définis comme potentiellement substrats de la P-gp mais des études complémentaires seraient nécessaires pour obtenir des conclusions plus étayées (Tableau 2).

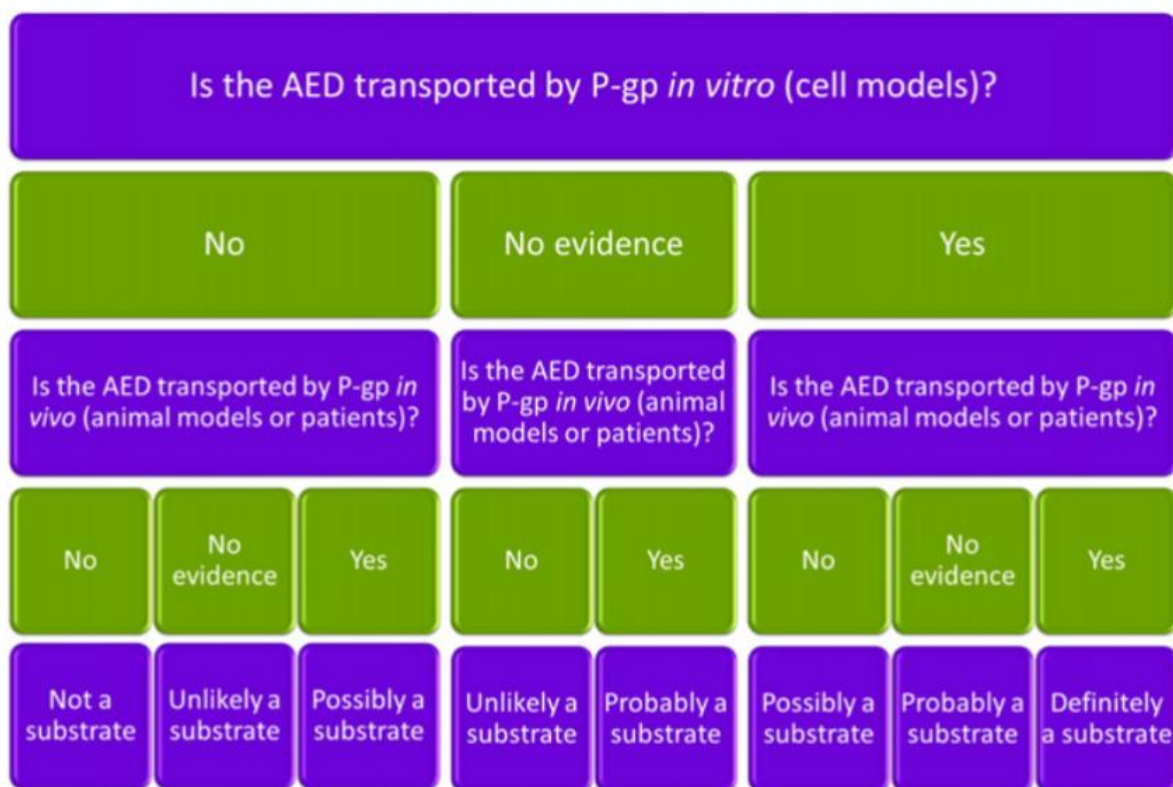


Figure 21 : Arbre décisionnel pour statuer sur le statut substrat de la P-gp d'un antiépileptique en fonction des données *in vitro* et *in vivo* de la littérature. D'après Zhang et al., *Advanced drug delivery review*, 2012

Tableau 2 : Statut substrat de la P-gp des antiépileptiques selon l'arbre décisionnel de Zhang et al., *Advanced drug delivery review*, 2012

AEDs as substrates of P-gp in research models.

Substrate status	Drug	Evidence for AEDs as P-gp substrates		
		Patients	Animals	Cell lines
Definite	Phenytoin	–	Y	Y
Definite	Phenobarbital	–	Y	Y
Definite	Lamotrigine	Y	Y	Y
Definite	Oxcarbazepine	Y	–	Y
Probable	Levetiracetam	Y	N	Y
Probable	Acetazolamide	–	–	Y
Probable	S-licarbazepine	–	–	Y
Probable	Carbamazepine-10,11-epoxide	–	–	Y
Probable	Eslicarbazepine acetate	–	–	Y
Possible	Carbamazepine	Y	?	N
Possible	Topiramate	–	–	?
Possible	Felbamate	–	Y	N
Possible	Sodium valproate	–	–	?
Possible	Gabapentin	–	–	?
Unlikely	Ethosuximide	–	–	N
Unlikely	Vigabatrin	–	–	N
Unlikely	Zonisamide	–	–	N

Y: yes; N: no; –: not reported; ?: conflicting evidence.

Régulation de la P-gp dans l'EPR chez l'animal

Afin de prendre en compte l'environnement des transporteurs, un certain nombre d'études se sont intéressées à l'expression et à l'activité de la P-gp *in vivo* sur des modèles murins d'épilepsie. En accord avec l'hypothèse des transporteurs, des expériences ont démontré que les rats souffrant de crises récurrentes spontanées et ne répondant pas aux médicaments antiépileptiques appelés "non-répondeurs", présentent une expression plus élevée de la P-gp au niveau de la BHE par rapport aux "répondeurs" (Volk et al. 2005). De plus, les médicaments antiépileptiques transportés par la P-gp chez les rongeurs (Zhang et al. 2012) voient leur concentrations cérébrales diminuées par une surexpression de la P-gp (Ma et al. 2013). Aussi, l'inhibiteur sélectif de la P-gp, le tariquidar, a permis d'améliorer la sensibilité à la phénytoïne dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal chez le rat (Van Vliet et al. 2006).

Régulation de la P-gp dans l'EPR chez l'Homme

Les divergences de résultats obtenus entre les techniques *in vitro* et *in vivo* ont souligné d'importantes différences inter-espèces dans le transport des molécules par la P-gp. Aussi, l'étude de l'expression de la P-gp dans le contexte de l'EPR chez l'Homme a fait l'objet de nombreuses études. L'étude pionnière réalisée par D. Tishler et ses collègues en 1995 a mis en évidence une surexpression de la P-gp dans des échantillons de tissu cérébral réséqués de patients souffrant d'EPR (Tishler et al. 1995). Cette surexpression suggérait que la P-gp pouvait limiter l'accumulation de médicaments antiépileptiques tels que la phénytoïne dans le cerveau, établissant ainsi l'hypothèse d'un rôle du transporteur dans la résistance aux traitements.

Cette hypothèse a été confirmée ensuite par l'étude S. Sisodiya et al. (2002), qui ont observé une surexpression de la P-gp et de la MRP1 dans les foyers épileptogènes des patients, mais pas dans les tissus normaux adjacents (Sisodiya et al. 2002). D'autres études, telles que celles menées par N. Marchi (Marchi et al. 2004) ont également apporté des éléments supplémentaires en montrant des corrélations inverses entre l'expression de la P-gp et les concentrations cérébrales de médicaments antiépileptiques, suggérant ainsi un rôle de la P-gp dans la pharmacorésistance. Enfin, l'étude de Liu et al. en 2012, a quant à elle, démontré l'existence d'une surexpression localisée de la P-gp dans l'hippocampe des patients atteints d'EPR, et que cette surexpression semble spécifique à la P-gp et n'affecte pas les autres transporteurs situés au niveau de la BHE, comme la BCRP (J. Y. W. Liu et al. 2012).

Imagerie de la P-gp dans l'EPR

Les études basées sur des biopsies cérébrales restent limitées en raison de leur caractère invasif, et ne peuvent être envisagées à grande échelle. C'est pourquoi il est essentiel de développer des méthodes alternatives peu invasives. À ce jour, l'imagerie TEP représente la technique la plus avancée pour étudier la fonction de la P-gp au niveau de la BHE. Elle offre une approche translationnelle, peu invasive, dynamique et quantitative, permettant ainsi d'estimer l'activité de la P-gp dans le cerveau. Quelques études cliniques ont utilisé cette technique pour étudier l'activité de la P-gp dans le contexte de l'EPR. L'imagerie TEP ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour mieux comprendre le rôle de la P-gp dans l'épilepsie.

Jusqu'à présent, la plupart des études ont utilisé le [^{11}C]vérapamil comme sonde P-gp. Cependant, il reste difficile de conclure à une augmentation de l'activité régionale de la P-gp chez les patients épileptiques. L'étude pilote menée par Langer et al. en 2007 n'a pas abouti à des conclusions claires, bien qu'elle n'ait pas exclu l'implication de la P-gp dans la résistance aux médicaments chez certains des patients inclus (Langer et al. 2007). Toutefois, en raison de la faible pénétration cérébrale du [^{11}C]vérapamil, et de son important métabolisme périphérique, il était difficile d'observer des différences régionales dans la fonction de la P-gp cérébrale.

Une approche contournant cette problématique a été développée. Elle consiste à administrer un inhibiteur de la P-gp, tel que le tariquidar, pour amplifier le signal cérébral du [^{11}C]vérapamil. Cette approche a tout d'abord été validée chez le rat, dans un modèle d'EPR (J. P. Bankstahl et al. 2011). Puis, Feldmann et ses collègues ont utilisé cette approche chez l'Homme. Ils ont ainsi pu démontrer, grâce à l'imagerie TEP au [^{11}C]vérapamil, une diminution de la réponse à l'inhibition (par le tariquidar) chez les patients atteints d'EPR par rapport aux volontaires sains, ainsi qu'aux patients épileptiques pharmaco-sensibles (Feldmann et al. 2012; Feldmann M. et al. 2013) (Figure 22). Il faut noter que cette approche nécessite la réalisation de plusieurs examens TEP au [^{11}C]vérapamil, avant et après administration de différentes doses de tariquidar. Aussi, ce ne sont pas les effets directs de l'induction potentielle de la P-gp sur la cinétique du la [^{11}C]vérapamil qui sont mesurés, mais l'atténuation des effets inhibiteurs du tariquidar, ce qui suggère une induction fonctionnelle. De plus, l'influence des traitements antiépileptiques sur le métabolisme du [^{11}C]vérapamil et du tariquidar n'a pas été clairement établie, alors qu'elle peut constituer un biais pour l'interprétation des données pharmacocinétique.

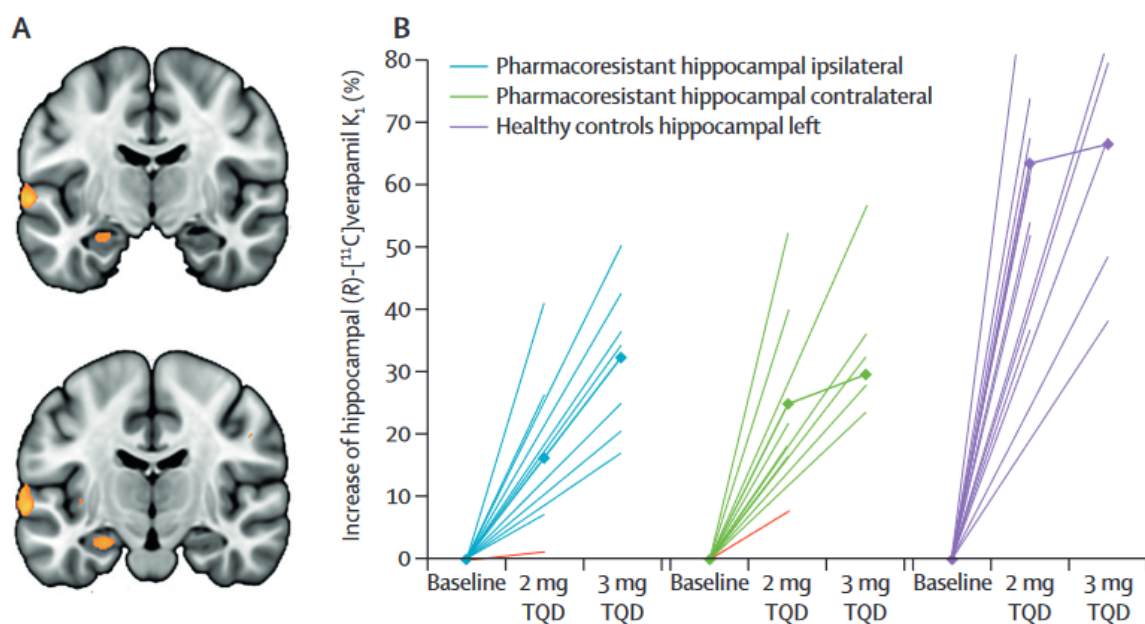


Figure 22 : Atténuation de l'inhibition de la P-gp sur la constante d'influx K_1 du (R)- $[^{11}\text{C}]$ vérapamil chez les patients atteints d'EPR du lobe temporal et chez les témoins sains.
D'après M. Feldmann et al., *Lancet neurology*, 2013.

En A, le tariquidar (2-3 mg/kg) est moins efficace pour augmenter le signal du (R)- $[^{11}\text{C}]$ vérapamil dans l'hippocampe épileptogène chez des patients atteints d'EPR du lobe temporal ($n=14$) par rapport à des témoins sains ($n=13$) (en jaune régions pour lesquelles $p<0.05$).

En B, l'augmentation de la captation du (R)- $[^{11}\text{C}]$ vérapamil après 2 mg/kg ou 3 mg/kg de tariquidar chez des patients atteints d'EPR du lobe temporal ($n=14$) est atténuée dans l'hippocampe épileptogène par rapport au côté controlatéral, montrant une saturation à 3 mg/kg chez des volontaires sains ($n=13$). La ligne en gras indique la moyenne pour chaque groupe. La ligne rouge représente le patient pharmaco-résistant, qui a été temporairement épargné par les crises et qui a présenté des effets secondaires associés à l'utilisation de médicaments antiépileptiques après l'administration de tariquidar. TQD=tariquidar.

Ces résultats ont été confirmés plus récemment par une étude menée par Bauer et al. en 2014 sur des patients avant et après une chirurgie de résection de l'épilepsie (M. Bauer et al. 2014). Cette dernière étude a de surcroît mis en évidence une "normalisation" de la fonction de la P-gp chez les patients pour qui la chirurgie a été bénéfique. Cela suggère que l'hyperactivité de la P-gp dans le lobe temporal ; qui peut être estimée grâce à une imagerie TEP préopératoire, pourrait être un indicateur prédictif du bénéfice clinique postopératoire.

Il convient de noter que toutes ces études ont recruté des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal due à une sclérose de l'hippocampe. L'imagerie TEP au [¹¹C]vérapamil pour évaluer la fonction de la P-gp dans d'autres types de lésions épileptogènes n'a été étudiée que très récemment par l'équipe de Feldmann en 2020, avec l'inclusion de deux patients seulement (Ilyas-Feldmann et al. 2020)..

Intérêt de l'étude de la P-gp dans l'EPR

De nombreuses études ont cherché à élucider le rôle de la P-gp dans l'EPR. Indépendamment du transport des antiépileptiques par la P-gp, la fonction de la P-gp semble être corrélée à la survenue des crises et à l'EPR. Les mécanismes moléculaires sous-jacents sont complexes et encore mal compris. Néanmoins, les données précliniques et cliniques disponibles indiquent que l'activité de la P-gp pourrait être un biomarqueur de l'EPR. Ensuite, il reste difficile de vérifier l'hypothèse selon laquelle les transporteurs tels que la P-gp pourraient être, au moins en partie, responsables de l'EPR. Pourtant, cette observation pourrait permettre de proposer des études visant à améliorer l'efficacité des traitements antiépileptiques grâce à une modulation ou une inhibition fonctionnelle de la P-gp chez l'Homme (Summers et al. 2004; Lakshmi-kanthcharan et al. 2018; Nicita et al. 2014; Borlot et al. 2014). Il faut toutefois noter que les études pilotes évaluant une inhibition pharmacologique comme adjuvant des traitements antiépileptiques ont principalement utilisé le vérapamil dont l'efficacité comme inhibiteur de la P-gp au niveau de la BHE n'est pas optimale par rapport aux inhibiteurs de génération plus récente comme le tariquidar (J.-I. Lai et al. 2020).

Perspectives de travail

Dans ce contexte, l'imagerie TEP de la P-gp cérébrale suscite un grand intérêt car elle pourrait permettre une meilleure compréhension de l'évolution de ce mécanisme moléculaires dans l'EPR. Cependant, il est primordial de choisir le radiotraceur le plus adapté à la situation pathologique étudiée. Jusqu'à présent, les solutions portées en clinique pour étudier l'activité fonctionnelle de la P-gp dans l'épilepsie ne sont pas pleinement satisfaisantes. En raison de ses caractéristiques, le [¹¹C]vérapamil ne permet pas la mise en évidence d'une induction fonctionnelle de la P-gp en un seul examen. Néanmoins, les protocoles utilisant le [¹¹C]vérapamil ont apporté une preuve de concept clinique qui appuie l'hypothèse d'une induction fonctionnelle de la P-gp chez des patients atteints d'EPR (Feldmann M. et al. 2013). Cependant, les protocoles

sont très lourds, ce qui les rend difficiles à réaliser chez des patients en pratique clinique ou, tout au moins, à plus large échelle. De plus, le tariquidar utilisé dans ces études n'est plus disponible pour usage humain.

Aussi, parallèlement à l'amélioration des connaissances pharmacologiques de la P-gp et de son activité au niveau de la BHE, des radiotraceurs adaptés doivent être validés afin de mieux répondre aux questions suscitées par l'EPR. Ainsi, l'imagerie moléculaire de la P-gp, si elle s'intègre dans les protocoles cliniques de prise en charge de l'EPR, devrait permettre d'apprécier l'importance de la P-gp comme biomarqueur voire comme piste thérapeutique adjuvante dans la prise en charge de l'EPR.

7.9 OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Le principal objectif de cette thèse a été d'approfondir les connaissances sur la pharmacologie du [^{11}C]métoclopramide, un traceur TEP destiné à l'étude de la P-gp au niveau de la BHE, afin d'optimiser son utilisation dans un protocole clinique. Plus spécifiquement, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation de l'imagerie au [^{11}C]métoclopramide pour évaluer l'activité de la P-gp au niveau de la BHE en tant que biomarqueur de l'EPR.

Dans un premier temps, chez l'animal et *in vitro*, les propriétés neuropharmacocinétiques du [^{11}C]métoclopramide ont été comparées à celles d'autres radiopharmaceutiques précédemment utilisés dans l'imagerie de la P-gp chez l'Homme. Nous avons également évalué l'utilisation du [^{11}C]métoclopramide, avec différents traitements, afin d'anticiper l'influence de co-médications susceptibles d'induire ou d'inhiber son métabolisme périphérique. Enfin, nous avons pu utiliser les premières données cliniques obtenues avec le [^{11}C]métoclopramide chez des volontaires sains et des patients afin de définir une méthode de quantification simplifiée, qui soit applicable en pratique clinique.

8 ETUDES EXPERIMENTALES

8.1 CONTEXTE GENERAL

La P-gp est un transporteur d'efflux membranaire étudié depuis longtemps dans la recherche médicale et pharmaceutique. Son rôle dans la pharmacocinétique des médicaments et son implication dans le phénomène de résistance aux médicaments est parfaitement établi. Cependant, en dehors de toute considération neuropharmacocinétique, la P-gp semble jouer un rôle dans la physiopathologie de nombreuses maladies neurologiques où son expression est diminuée ou induite. Aussi, plusieurs études ont mis en évidence une surexpression de la P-gp au niveau des foyers épileptogènes, comme en témoignent les biopsies de résections chez des patients atteints d'EPR.

L'induction fonctionnelle de la P-gp est souvent avancée comme hypothèse mécanistique pour expliquer l'EPR. Néanmoins, cette hypothèse reste très controversée tant il est difficile de mettre en évidence l'existence d'un transport des antiépileptiques par la P-gp, ou l'existence d'une induction de la P-gp au niveau de la BHE, qui soient réellement significative d'un point de vue pharmacologique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons souhaité contribuer au développement d'outils d'imagerie moléculaire pour étudier la P-gp au niveau de la BHE chez l'animal et chez l'Homme. Nous avons ainsi pu établir des critères permettant de comparer objectivement les performances de radiotraceurs candidats pour mesurer l'activité de la P-gp au niveau de la BHE. Cette étude comparative a notamment permis de mettre en évidence les avantages du [^{11}C]métoclopramide pour l'étude de la P-gp en termes de sensibilité à détecter de faibles changements de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE. Nous avons pu extrapoler les données d'imagerie, obtenues avec différents substrats radiomarqués, aux répercussions potentielles des interactions médicamenteuses impliquant des substrats et inhibiteurs de la P-gp au niveau de la BHE.

Dans un second temps, nous avons évalué l'impact des comédications sur les cinétiques périphériques et cérébrales du [^{11}C]métoclopramide chez le rat, en vue d'anticiper de potentiels biais dans l'interprétation des données d'imagerie chez des patients atteints d'épilepsie. Enfin, nous avons mis au point et validé une méthode de quantification simplifiée de l'activité de la

P-gp par imagerie TEP au [^{11}C]métopropramamide afin de permettre une étude à large échelle, avec un minimum de contraintes pour les patients. Cette méthode de quantification a pu être appliquée aux premières images TEP au [^{11}C]métopropramamide obtenues chez l'Homme.

Ce projet de thèse a donc suivi une démarche translationnelle et a contribué à initier la réalisation d'un protocole clinique, le projet EPIFLUX, dont l'objectif est d'utiliser l'imagerie moléculaire au [^{11}C]métopropramamide pour la détection de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE chez les patients atteints d'épilepsie. EPIFLUX est une étude clinique de phase II, en ouvert, multicentrique et avec des groupes parallèles. L'étude comporte 100 patients atteints d'épilepsie répartis en 4 groupes et un groupe de 10 volontaires sains. Le plan de l'étude est présenté Figure 23.

- Groupe 1 : 20 patients atteints d'EPR et qui ne présentent pas de lésion à l'IRM.
- Groupe 2 : 25 patients atteints d'EPR et qui présentent des lésions détectables à l'IRM.
- Groupe 3 : 25 patients atteints d'épilepsie et répondeurs aux traitements
- Groupe 4 : 10 patients atteints d'épilepsie multifocale
- Groupe 5 : 10 volontaires sains

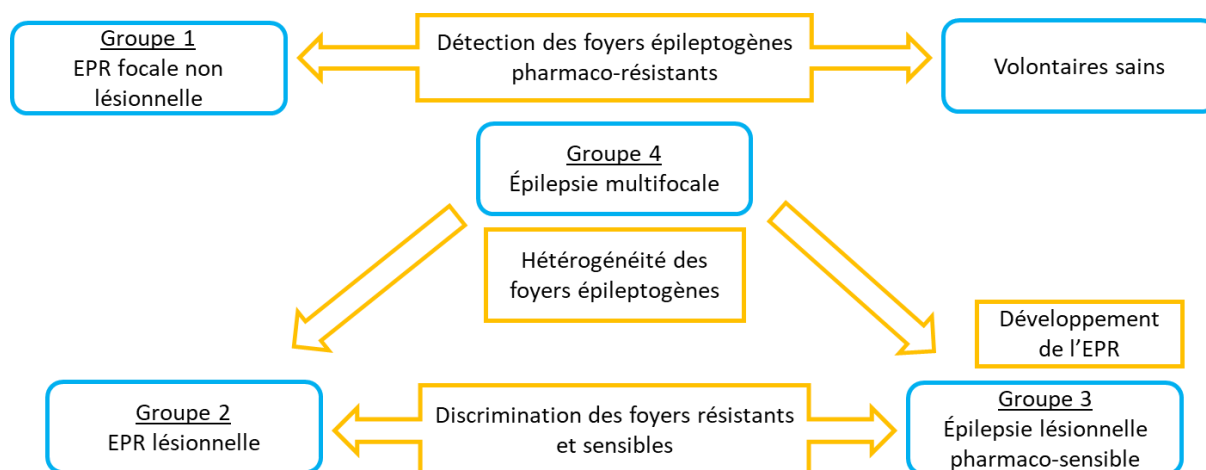


Figure 23 : Design de l'étude EPIFLUX. Les groupes sont précisés dans les bulles bleues. Les hypothèses associées au choix des différents groupes sont précisées dans les bulles jaunes.

EPIFLUX est un protocole multicentrique mené en parallèle en France et en Autriche dans le cadre d'un financement ANR PRCI (projet de recherche collaboratif international) porté par Nicolas Tournier. En France, le recrutement est assuré par le service du Pr Viviane Bouilleret à l'hôpital du Kremlin Bicêtre (AP-HP), et l'imagerie est réalisée au service Hospitalier Frédéric

Joliot (CEA/BioMaps). En Autriche, l'étude est réalisée par l'Université médicale de Vienne. Cette collaboration doit permettre d'inclure un nombre suffisant de patients dans tous les groupes.

Dans le cadre de cette étude, l'analyse pharmacocinétique des données TEP a pour objectif d'améliorer les performances du au [^{11}C]métoclopramide pour la détection et la caractérisation des lésions épileptogènes chez les patients atteints d'EPR. L'étude a débuté en 2022 et le recrutement est prévu jusqu'en 2024. Dans ce manuscrit, les premiers résultats obtenus sur la quantification de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE humaine chez des volontaires et des patients atteints d'épilepsie seront présentés.

8.2 PARTIE 1 : COMPARAISON DES RADIOPHARMACEUTIQUES POUR L'ÉTUDE FONCTIONNELLE DE LE P-GP AU NIVEAU DE LA BHE

8.2.1 Hypothèses et objectifs

En 2009, Kannan et ses collègues ont proposé des critères pour définir un "radiopharmaceutique idéal" permettant l'étude fonctionnelle de la P-gp (Kannan et al. 2009). Le premier critère concerne la sélectivité du radiopharmaceutique en tant que substrat de la P-gp. Étant donné qu'il existe plusieurs autres transporteurs au niveau de la BHE, le radiopharmaceutique utilisé doit être spécifiquement un substrat de la P-gp afin d'éviter toute interférence avec les autres transporteurs et permettre une interprétation moléculaire des données d'imagerie. En pratique, cela concerne essentiellement la sélectivité pour la P-gp vis-à-vis de la BCRP. En effet, à ce jour, seules la P-gp et la BCRP ont montré leur importance fonctionnelle sur l'efflux de petites molécules au niveau de la BHE chez l'Homme. Le transporteur Mrp1 a été identifié au niveau de la BHE chez les rongeurs, même s'il existe certaines controverses quant à son importance en neuropharmacocinétique (Löscher et al. 2005b). L'orthologue humain (MRP1) n'a pas été retrouvé au niveau de la BHE humaine par les études protéomiques mais une faible expression de MRP4 a été décrite (Uchida, Ohtsuki, Katsukura, et al. 2011). Aussi, l'importance des transporteurs MRP n'a pas été démontré chez l'Homme ou le primate non-humain (PNH).

Le deuxième critère concerne la pureté radiochimique du signal TEP. Le signal TEP mesuré dans le cerveau peut provenir à la fois du radiopharmaceutique inchangé et/ou de ses métabolites radiomarqués, s'ils pénètrent dans le tissu cérébral. S'il est possible de connaître la proportion de radiotraceur inchangé dans le sang grâce à des méthodes séparatives (radio-HPLC), il n'est pas possible de distinguer le signal provenant du radiopharmaceutique et de ses radiométabolites par imagerie des tissus. Aussi, la pureté radiochimique du signal TEP est essentielle pour permettre une quantification correcte des échanges entre le sang et le cerveau et, d'estimer avec fidélité l'importance de la P-gp sur la neuropharmacocinétique des médicaments.

Le troisième critère concerne l'intensité du signal, c'est-à-dire l'intensité du contraste qui existe entre la situation basale, où l'expression fonctionnelle de la P-gp est physiologique, et les situations où une modification se produit, telle qu'une inhibition pharmacologique par exemple. Pour vérifier ce critère, des études d'inhibition de la P-gp sont réalisées. D'après ce critère, une augmentation du contraste importante en présence d'une inhibition pharmacologique ou

d'une déplétion totale de la P-gp (animaux déficients) préjuge de la sensibilité des différents radiotraceurs à détecter de faibles changements d'expression ou de fonction de la P-gp. Les molécules qui présentent ces caractéristiques sont décrites comme « bons » substrats (*avid substrates* en anglais), ce qui les oppose aux substrats faibles (*weak substrates*) dont la capacité de transport par la P-gp est limitée. Aussi, les substrats faibles peuvent présenter un passage cérébral lorsque la P-gp est parfaitement fonctionnelle et la réponse à une inhibition/déplétion totale est moins importante (Tournier et al. 2019).

Tableau 3 : Evaluation des radiotraceurs cliniques concernant les critères d'un bon radiotraceur substrat de la P-gp, d'après Kannan et al. 2009

Radiotraceur	Critères des radiotraceurs substrats de la P-gp			
	Transport <i>in vitro</i>		Pureté radiochimique cérébrale	Amplitude du signal
	P-gp	BCRP		
[¹¹ C]vérapamil	oui	non	non	++
[¹¹ C]NdLop	oui	non	oui (rat)/non (souris)	+++
[¹¹ C]métoclopramide	oui	non	oui (rat)	+
[¹¹ C]dompéridone	oui	?	?	?

Cependant, des études menées sur des souris hétérozygotes pour les gènes codant pour la P-gp, qui expriment environ 50% de moins la P-gp par rapport au génotype sauvage, ont montré que le [¹¹C]vérapamil et le [¹¹C]NdLop ne permettent pas de détecter une diminution modérée de l'expression de la P-gp au niveau de la BHE. Cela suggère que ces radiotraceurs ne sont pas non-plus capables de mettre en évidence une inhibition pharmacologique partielle (Kalvass et al. 2013).

Nous nous sommes donc interrogés quant à la sensibilité des différents radiotraceurs pour la détection d'une modulation partielle de la P-gp. Cette question n'avait jamais été abordée en détails à notre connaissance. De plus, en pratique clinique, une inhibition totale de la P-gp au niveau de la BHE est très peu probable. En effet, l'inhibition totale de la P-gp chez l'Homme n'a été obtenue qu'avec des doses élevées de puissants inhibiteurs développés à cet effet comme le tariquidar (Kreisl et al. 2010; M. Bauer et al. 2021). Des sujets présentant une double mutation antisens sur le gène ABCB1 ont été identifiés mais cette situation est extrêmement rare (Baudou et al. 2020; Seo et al. 2020). Par contre, une inhibition partielle de son expression

fonctionnelle est tout à fait plausible. En effet, à partir des données d'imagerie TEP au [^{11}C]vérapamil ou au [^{11}C]lopéramide (études réalisées avant le développement du [^{11}C]NdLop), il a été montré que les concentrations sanguines d'inhibiteurs connus de la P-gp utilisés en thérapie sont insuffisantes pour envisager une inhibition totale de la P-gp au niveau de la BHE (Kallvass et al. 2013). La réalisation d'une étude comparative a donc été envisagée afin de comparer la sensibilité à l'inhibition des différents radiotraceurs de la P-gp disponibles, dans des conditions standardisées.

Pour l'imagerie moléculaire, il est essentiel de pouvoir détecter de faibles variations de la P-gp au niveau de la BHE afin de pouvoir envisager son utilisation comme biomarqueur des propriétés fonctionnelles de la BHE *in vivo*. Des fluctuations subtiles de l'activité de la P-gp peuvent potentiellement être significatives d'un point de vue physiopathologiques. Un radiotraceur dont la sensibilité est insuffisante pourrait alors sous-estimer l'importance de la P-gp dans le développement et la progression des maladies neurologiques. Ainsi, la sensibilité du radiotraceur pour détecter de faibles variations d'activité de la P-gp semble être un critère de choix essentiel mais qui n'a pas tellement été pris en compte jusqu'alors.

D'un point de vue mécanistique, nous avons donc émis l'hypothèse d'une sensibilité substrat-dépendante de la P-gp à l'inhibition pharmacologique. Cette hypothèse n'avait fait l'objet que de quelques études visant à établir un substrat P-gp de référence (la digoxine) pour la standardisation des études de transport *in vitro* (Rautio et al. 2006). Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi de comparer, d'abord *in vitro* puis *in vivo*, la sensibilité des trois principaux radiotraceurs utilisés pour l'étude de la P-gp au niveau de la BHE chez l'Homme : le [^{11}C]vérapamil, le [^{11}C]NdLop et le [^{11}C]métoclopramide. Ces radiotraceurs ont été comparés quant à leur sensibilité à l'inhibition par le tariquidar, un inhibiteur connu puissant de la P-gp. Cette même méthode a ensuite été appliquée à un autre médicament, la dompéridone, qui a été marqué au carbone-11 comme candidat potentiel pour étudier l'activité de la P-gp au niveau de la BHE en espérant de meilleures performances que le [^{11}C]métoclopramide.

D'un point de vue pharmacologique, la dompéridone fait partie de la même classe pharmaceutique que le métoclopramide. Ce sont deux médicaments antiémétiques largement prescrits (Junqueira et al. 2023). Bien que leurs cibles pharmacologiques soient les récepteurs D2 périphériques, leur action potentielle sur les récepteurs D2 du système nerveux central, qui

sous-tend un passage cérébral effectif et une implication potentielle de la P-gp, comporte un risque d'effets secondaires (Whiting et al. 2021). La dompéridone est considérée comme un meilleur substrat (substrat « avide ») de la P-gp par rapport au métoclopramide qui est considéré comme un substrat « faible », c'est-à-dire avec une capacité totale de transport moindre. Aussi, à partir de cette observation, il est généralement admis que le risque d'interaction médicamenteuse en présence d'un inhibiteur de la P-gp est plus élevé (Schinkel et al. 1996).

Dans ce projet préclinique, l'impact de l'inhibition de la P-gp au niveau de la BHE sur l'exposition cérébrale de radiotraceurs substrats, qui sont des analogues ou métabolites de médicaments, a été comparé *in vitro* et *in vivo* à l'aide de l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP) chez le rat. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications complémentaires dans le *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (facteur d'impact = 7,0), et dans *Pharmaceutics* (facteur d'impact = 6,5), et d'une lettre à l'éditeur dans le *Journal of Pharmaceutical Sciences* (facteur d'impact = 3,8).



Original Article

JCBFM

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism
 2022, Vol. 42(1) 175–185
 © The Author(s) 2021
 Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
 DOI: 10.1177/0271678X211045444
journals.sagepub.com/home/jcbfm

Comparative vulnerability of PET radioligands to partial inhibition of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: A criterion of choice?

Louise Breuil^{1,2}, Solène Marie^{1,3}, Sébastien Goutal¹,
 Sylvain Auvity⁴, Charles Truillet¹, Wadad Saba¹,
 Oliver Langer⁵, Fabien Caillé¹ and Nicolas Tournier¹

Abstract

Only partial deficiency/inhibition of P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) function at the blood-brain barrier (BBB) is likely to occur in pathophysiological situations or drug-drug interactions. This raises questions regarding the sensitivity of available PET imaging probes to detect moderate changes in P-gp function at the living BBB. *In vitro*, the half-maximum inhibitory concentration (IC₅₀) of the potent P-gp inhibitor tariquidar in P-gp-overexpressing cells was significantly different using either [¹¹C]verapamil (44 nM), [¹¹C]N-desmethyl-loperamide (19 nM) or [¹¹C]metoclopramide (4 nM) as substrate probes. *In vivo* PET imaging in rats showed that the half-maximum inhibition of P-gp-mediated efflux of [¹¹C]metoclopramide, achieved using 1 mg/kg tariquidar (*in vivo* IC₅₀ = 82 nM in plasma), increased brain exposure by 2.1-fold for [¹¹C]metoclopramide ($p < 0.05$, $n = 4$) and 2.4-fold for [¹¹C]verapamil ($p < 0.05$, $n = 4$), whereby cerebral uptake of the “avid” substrate [¹¹C]N-desmethyl-loperamide was unaffected ($p > 0.05$, $n = 4$). This comparative study points to differences in the “vulnerability” to P-gp inhibition among radiolabeled substrates, which were apparently unrelated to their “avidity” (maximal response to P-gp inhibition). Herein, we advocate that partial inhibition of transporter function, in addition to complete inhibition, should be a primary criterion of evaluation regarding the sensitivity of radiolabeled substrates to detect moderate but physiologically-relevant changes in transporter function *in vivo*.

Keywords

ATP-binding cassette, drug-drug interaction, membrane transporter, neuropharmacology, pharmacokinetics

Received 4 May 2021; Revised 12 July 2021; Accepted 8 August 2021

Introduction

P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) is an important efflux transporter of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, which is notably expressed at the vascular pole of endothelial cells forming the blood-brain barrier (BBB). P-gp selectively regulates the BBB transfer of many drugs, metabolites and endogenous compounds.¹ There is growing evidence that P-gp expression and function are impaired in various conditions, including normal ageing, Alzheimer’s disease or neuroinflammatory states.² Overexpression of P-gp has been reported in brains of rat epilepsy models³ and in patients with epilepsy,^{4,5} suggesting a relationship with resistance to anti-seizure medication.

¹Laboratoire d’Imagerie Biomédicale Multimodale (BioMaps), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay France

²Pharmacy Department, Robert-Debré Hospital, AP-HP, Université de Paris, Paris, France

³Pharmacy Department, Bicêtre Hospital, AP-HP, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁴Pharmacy Department, Necker Hospital, AP-HP, UMR-S 1144, Université de Paris, Paris, France

⁵Department of Clinical Pharmacology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

Corresponding author:

Nicolas Tournier, CEA/SHFJ, 4 Place du Général Leclerc, 91400 Orsay, France.

Email: n.tournier@universite-paris-saclay.fr

Active P-gp-mediated efflux is therefore increasingly regarded as a dynamic biomarker of BBB function, which may be linked to the onset of neurological disorders.²

Preclinical studies have shown that the brain distribution of many positron emission tomography (PET) imaging radioligands is restricted by P-gp function at the BBB.^{6,7} However, only few radiolabeled substrates have so far been used as dedicated probes to selectively assess P-gp function at the human BBB. These include [¹⁴C]verapamil⁹ (racemic or the (*R*)-enantiomer analogue of the calcium channel blocker verapamil), [¹¹C] *N*-desmethyl-loperamide¹⁰ (a radiolabeled metabolite of loperamide, an antidiarrheal opioid drug) and [¹¹C]metoclopramide¹¹ (analogue of metoclopramide, a dopamine receptor antagonist used as an antiemetic drug). The particular characteristics of P-gp-mediated transport at the BBB level as compared to conventional neuroimaging targets (e.g. receptor proteins) have prompted the need for new criteria to describe and select effective PET probes for P-gp activity.⁸ A first prerequisite is selectivity for P-gp over breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2), the other major ABC transporter at the BBB. Second, a limited contribution of radiometabolites to the brain PET signal is preferred for correct estimation of P-gp function at the BBB. Third, “avid” substrates were initially preferred as probes, with the aim to generate maximal contrast in the PET signal between the baseline condition, in which P-gp is fully functional, and a pharmacological inhibition challenge in which P-gp-mediated efflux is attenuated or abolished. Strains of P-gp deficient mice are useful tools to assess this last criterion *in vivo*.^{12,13} However, from a clinical perspective, complete deletion or genetic deficiency of P-gp expression is extremely rare in humans.¹⁴ Indeed, only partial decreases in P-gp expression have been found in histology or proteomics studies of human specimens.^{2,15} This raises the important question of the sensitivity of available PET probes to detect the functional impact of moderate changes in P-gp expression at the BBB.

PET studies using either [¹¹C]verapamil or [¹¹C] *N*-desmethyl-loperamide have clearly shown the efficacy of pharmacological inhibitors to dose dependently decrease P-gp function at the human BBB.^{16,17} Tariquidar is a highly potent and specific P-gp inhibitor that can be safely used to achieve an almost maximal decrease in P-gp function at the human BBB.^{16–18} Many marketed drugs are described as P-gp inhibitors *in vitro*, although with a lower potency or efficacy than tariquidar.^{19,20} Clinical PET data using [¹¹C]verapamil or [¹¹C] *N*-desmethyl-loperamide as model P-gp substrates have been used as reference points to estimate the risk for P-gp-mediated drug-drug interactions at the human BBB.²¹ These results led to the assumption

that a high degree of P-gp inhibition by marketed drugs is very unlikely to occur, so that only partial inhibition can be achieved in clinical practice.^{21,22}

[¹¹C]Metoclopramide has been designed as an alternative P-gp probe for PET imaging, based on the need for a PET probe to detect induction of P-gp function at the BBB, starting from substantial baseline brain uptake, when P-gp is normally expressed.^{23,24} [¹¹C]Metoclopramide corresponds to the definition of a “weak” P-gp substrate, thus mimicking the characteristics of many CNS active drugs including antiepileptic drugs, antidepressants, antipsychotics or opioids.⁴ The overall increase in brain exposure to [¹¹C]metoclopramide after a high degree or nearly complete P-gp inhibition was consequently lower than that observed with the “avid” substrates [¹¹C]verapamil or [¹¹C] *N*-desmethyl-loperamide.^{24–26} However, it may be hypothesized that [¹¹C]metoclopramide with its lower transport rate and higher BBB permeability may show better sensitivity to detect partial P-gp inhibition compared with previous PET radioligands.²⁶ This would imply a higher “vulnerability” to clinically relevant drug-drug interactions with P-gp inhibitors, resulting in increased brain exposure.

The present study aimed at comparing the “vulnerability” of [¹¹C]verapamil, [¹¹C] *N*-desmethyl-loperamide and [¹¹C]metoclopramide to partial P-gp inhibition. To this end, standardized *in vitro* uptake assays using cells expressing human P-gp and *in vivo* PET experiments in rats were performed with these 3 substrates, in the absence or presence of increasing doses of tariquidar. Based on these data, we propose new and important criteria to describe and compare the sensitivity of radiolabeled substrate probes to detect moderate changes in P-gp function at the BBB.

Materials and methods

Chemicals and radiotracers

Tariquidar used for P-gp inhibition was purchased from Eras Labo (France). Tariquidar solutions for intravenous injection were freshly prepared at the selected concentration on the day of the experiment by dissolving tariquidar dimesylate in dextrose solution (5%, w/v), followed by dilution with sterile water.

Three radiolabeled P-gp probes suitable for human use were compared. Ready-to-inject [¹¹C]metoclopramide, racemic [¹¹C]verapamil and [¹¹C] *N*-desmethyl-loperamide were synthesized as previously described^{27–29} starting from cyclotron-produced [¹¹C] carbon dioxide (Cyclone-18/9 cyclotron; IBA, Belgium) by [¹¹C]methylation of nor-metoclopramide (Toronto Chemicals, Canada), racemic nor-verapamil (ABX advanced biomedical compounds, Germany) or

in-house synthesized di-desmethyl-loperamide²⁸ using a TRACERLab FX CPro synthesizer (GE Healthcare, France). Quality control was performed by radio-high-performance liquid chromatography (HPLC) to assess the identity, radiochemical and chemical purities of the radiotracers and their molar activities.

Cells

Culture media and buffers were obtained from Fischer Scientific, France. Stably transfected MDCKII-MDR1 cells were obtained from Dr. Alfred Schinkel (National Cancer Institute, The Netherlands) and were grown under a controlled atmosphere at 37°C, 5% CO₂. The culture medium was composed of DMEM Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4.5 g/L dextrose, 1 mM pyruvate) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin 5000 U/mL).

Uptake assay in P-gp overexpressing cells

P-gp-mediated transport of [¹¹C]verapamil and [¹¹C]*N*-desmethyl-loperamide and [¹¹C]metoclopramide was compared in cells expressing human P-gp. Cells were seeded in 24-well plates (30,000 cells per well) in 500 µL culture medium. Cells were grown to confluence (~2 days). On the day of the experiment, culture medium was removed and replaced by 200 µL of incubation buffer (10% HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) + 1.26 mM CaCl₂ + 0.49 mM MgCl₂) containing 1 mM pyruvate and 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 37°C). The incubation buffer contained the tested radiolabeled P-gp substrate (~37 MBq/40 mL corresponding to <1 µg/40 mL of the unlabeled compound) and tariquidar at the selected concentration. Tariquidar was dissolved in DMSO and tariquidar concentrations ranged from 0 to 200 nM (1% v/v final DMSO concentration). After 30 minutes of incubation at 37°C, buffer was removed and cell monolayers were rapidly washed with 300 µL of ice-cold buffer Dulbecco's phosphate buffer. Cells were then lysed with 500 µL of NaOH (10 mM, 10 min). Then, 400 µL of cell lysate was collected from each well (n = 4 wells per condition) and gamma-counted using a Cobra Quantum (Perkin-Elmer, France).

Animals

Thirty-six male Sprague Dawley rats (Janvier, France) were used for the study (mean weight: 354 ± 76 g). Animals were housed and acclimatized for at least 3 days before the experiments. Rats had free access to chow and water. All animal experiments were in accordance with the recommendations of the European

Community (2010/63/UE) and the French National Committees (law 2013-118) for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was approved by a local ethics committee for animal use (CETEA) and by the French ministry of agriculture (APAFIS#7466-20 1611 04 1 7049220 v2). Samples size for each group was based on previous studies.^{24,30} Reporting of animal data is in compliance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting in Vivo Experiments) guidelines.

PET experiments

PET protocol. PET acquisitions were performed using an Inveon microPET scanner (Siemens, Knoxville, TN, US). Anesthesia was induced and then maintained using 3.5% followed by 1.5-2.5% isoflurane in pure oxygen. Thirty-minute dynamic scans were acquired, starting with intravenous bolus injection of [¹¹C]verapamil (40 ± 8 MBq; 2.0 ± 1.5 µg), [¹¹C]*N*-desmethyl-loperamide (35 ± 5 MBq, 1.7 ± 1.3 µg) or [¹¹C]metoclopramide (35 ± 5 MBq, 3.4 ± 1.3 µg), via a catheter inserted in the caudal lateral vein.

P-gp inhibition protocol. Tariquidar was used to modulate P-gp function in rats. Tariquidar doses up to 8 mg/kg were shown to be well tolerated with a negligible impact of tariquidar on the arterial input function and peripheral metabolism of [¹¹C]verapamil,³¹ [¹¹C]*N*-desmethyl-loperamide³⁰ or [¹¹C]metoclopramide.²⁴ Tariquidar was injected in a volume of 200–300 µL into the caudal vein at 15 minutes before radiotracer injection. For [¹¹C]metoclopramide, a range of different tariquidar doses was tested (vehicle-0, 1, 2, 3, 4 or 8 mg/kg). PET acquisitions using [¹¹C]verapamil or [¹¹C]*N*-desmethyl-loperamide were performed after injection of vehicle and 1 or 8 mg/kg of tariquidar (n = 4 per condition).

Determination of tariquidar in plasma. Blood samples (~2 mL) were collected under anesthesia at the end of the PET acquisition (i.e. at 65 ± 2 min after tariquidar injection) by intracardiac puncture. Afterwards animals were killed using 180 mg/kg i.v. pentobarbital (Dolethal®, France). Samples were centrifuged and plasma was collected and stored at –80°C until analysis. Determination of tariquidar concentration in plasma samples was performed using a validated HPLC method using elacridar as an internal standard.³² Calibration curves for the analysis of plasma samples were generated by analyzing different dilutions of a tariquidar solution in drug-free human plasma (obtained from Etablissement Français du Sang, France).

Data analysis and statistics

In vitro data. Counting values obtained in each well (R) were normalized using either the concentration of radioactivity in the incubation buffer ($\%C_0 = 100 \times R/C_0$) or using the following equation:

$$I\% = \frac{R - mR_0}{mR_{max} - mR_0} \times 100$$

where $I\%$ is the extent of inhibition ($I\%$) between 0 and 100%, R is the radioactivity in the 4 tested wells, mR_0 is the mean radioactivity of each radioligand in the 4 wells without tariquidar, and mR_{max} is the mean radioactivity of each radioligand in the 4 wells containing the highest concentration of tariquidar (200 nM).

The *in vitro* half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}) was estimated by non-linear regression using the "One-site binding Hill equation" function in Graphpad Prism software (V8.0, San Diego, CA, USA) with maximal uptake constrained to 100%. IC_{50} values obtained for each radiotracer were considered different when their 95% confidence interval [$CI_{95\%}$] did not overlap. The uptake ratio was calculated as R_{max}/mR_0 (mean \pm S.D) for each P-gp substrate. Normality of the data was checked using the Shapiro-Wilk's test and homoscedasticity using the Brown-Forsythe's test. Uptake ratios were then compared using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

PET data analysis. Images were reconstructed with the Fourier rebinning algorithm and the 3-dimensional ordered-subset expectation maximization algorithm including normalization, attenuation, scatter, and random corrections. Image analysis and quantification of radioactivity uptake were performed using PMOD software (version 3.9; PMOD Technologies, Zürich, Switzerland). A region of interest was drawn over the whole brain to generate time-activity curves (TACs) with time frame durations of 0.25 min, 2 \times 0.5 min, 0.75 min, 4 \times 1 min, 1.5 min, 4 \times 2 min, 3 \times 2.5 min, 3 \times 3 min and 3.5 min. Brain radioactivity was corrected for ^{11}C decay, injected dose and animal weight, and expressed as the standardized uptake value (SUV).

In rats, the determination of an arterial input function during the PET scan is very challenging. The impact of P-gp inhibition was therefore estimated from the area under the brain TAC, which was determined from 10 to 30 minutes after radiotracer injection ($AUC_{10-30\text{ min}}$) to limit the pharmacokinetic variability associated with the bolus injection procedure. First, the doses that inhibited 50% ($ID_{50\%/Meto}$) and 100% ($ID_{100\%/Meto}$) of the P-gp-mediated transport of [^{11}C]metoclopramide were estimated by fitting plots of brain $AUC_{10-30\text{ min}}$ versus the injected dose of tariquidar

($n = 1-4$ animals per dose) with the non-linear one-site binding Hill equation. Brain $AUC_{10-30\text{ min}}$ was also plotted versus the plasma concentration of tariquidar to estimate $IC_{50\%/Meto}$, corresponding to the plasma concentration of tariquidar that inhibited 50% of the P-gp-mediated efflux of [^{11}C]metoclopramide at the BBB. Then, PET experiments were performed using [^{11}C]verapamil and [^{11}C]N-desmethyl-loperamide at baseline and after administration of tariquidar at $ID_{50\%/Meto}$ or $ID_{100\%/Meto}$ ($n = 4$ per condition).

Graphical and statistical analysis were performed using Graphpad[®] prism software. Normality of the data was checked using the Shapiro-Wilk's test and homoscedasticity using the Spearman's test. Brain $AUC_{10-30\text{ min}}$ values obtained under all tested conditions were compared using 2-way ANOVA analysis and compared with the baseline condition using the Dunnett's post-hoc test.

Results

In vitro experiments

The *in vitro* P-gp inhibitory potency of tariquidar was tested in P-gp overexpressing cells using either [^{11}C]verapamil, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide or [^{11}C]metoclopramide as substrate probes. The fitted concentration-inhibition curves for each radiotracer are shown in Figure 1. Cellular uptake of the tested substrates was not significantly higher in the presence of 200 nM vs 100 nM tariquidar suggesting that maximal inhibition was achieved using 200 nM tariquidar. The estimated IC_{50} of tariquidar was 44 nM [33–53 nM] for [^{11}C]verapamil, 19 nM [13–25 nM] for [^{11}C]N-desmethyl-loperamide and 4 nM [2–8 nM] for [^{11}C]metoclopramide. The $CI_{95\%}$ of the IC_{50} values of the different tested substrates did not overlap, suggesting that each substrate's "vulnerability" to partial P-gp inhibition was significantly different (Figure 1). Uptake ratios were 1.4 ± 0.09 for [^{11}C]verapamil, 3.9 ± 0.64 for [^{11}C]N-desmethyl-loperamide and 1.4 ± 0.07 for [^{11}C]metoclopramide. For [^{11}C]metoclopramide, maximal inhibition was achieved with ~ 50 nM of tariquidar. At this concentration, only 58% of the P-gp-mediated transport of [^{11}C]verapamil and 70% of the transport [^{11}C]N-desmethyl-loperamide was inhibited (Figure 1).

In vivo experiments

Under the baseline condition, [^{11}C]metoclopramide PET signal in the rat brain was lower than that in tissues surrounding the skull (Figure 2). The PET signal reached similar levels as peripheral tissues in rats injected with 1 mg/kg of tariquidar. Tariquidar

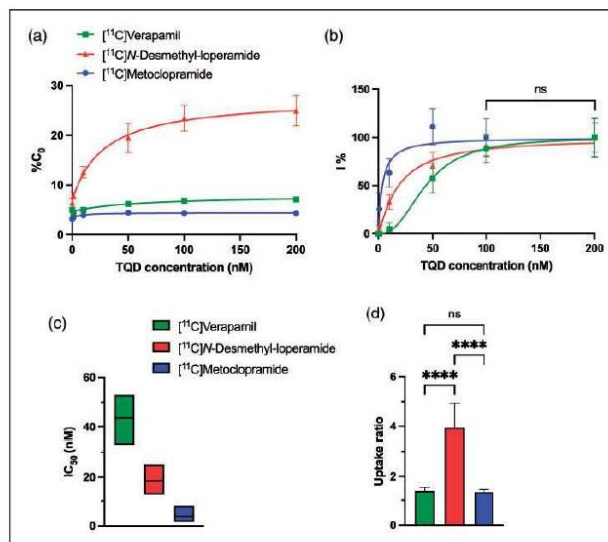


Figure 1. Uptake of [^{11}C]verapamil, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide and [^{11}C]metoclopramide in MDCKII-MDR1 cells in presence of increasing doses of tariquidar (TQD). Intracellular uptake is expressed as the percentage of radioactivity in the cell lysate relative to the incubation buffer (%C₀, in A) and as the percentage of maximal inhibition (%), assuming maximal inhibition was achieved using tariquidar 200 nM, in B). Lines in B represent fits of Hill model employed to estimate the *in vitro* half-maximum inhibitory concentration (IC₅₀) with corresponding 95% confidence interval (CI_{95%}), $n = 4$ per condition, reported in C. In D, uptake ratios are reported as mean \pm S.D ($n = 4$ per condition). **** $p < 0.0001$, ns = not significant (one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test for multiple comparisons).

doses > 1 mg/kg dose dependently increased the brain PET signal with a limited impact on radioactivity in peripheral tissues (Figure 2). This is consistent with a localization of P-gp at the BBB and a negligible impact of tariquidar on the peripheral pharmacokinetics of [^{11}C]metoclopramide.²⁴

Dose-response and concentration-response curves of tariquidar for inhibition of P-gp-mediated transport of [^{11}C]metoclopramide at the rat BBB are shown in Figure 2. The estimated ID_{50%/Meto} of tariquidar was 1 mg/kg [0.78–1.5 mg/kg] (IC_{50%/Meto} ~ 82 nM). Maximal P-gp inhibition was observed for tariquidar doses ≥ 2 mg/kg (IC_{100%/Meto} ~ 300 nM) using [^{11}C]metoclopramide as a substrate probe.

The 1 mg/kg dose (ID_{50%/Meto}) and the 8 mg/kg dose (ID_{100%/Meto}) of tariquidar were then selected to test the impact of partial and maximal P-gp inhibition using [^{11}C]verapamil and [^{11}C]N-desmethyl-loperamide as probes. Figure 3 shows representative [^{11}C]verapamil, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide and [^{11}C]metoclopramide PET images obtained at baseline and after injection of either 1 or 8 mg/kg of tariquidar. Maximal P-gp inhibition using 8 mg/kg tariquidar visually enhanced the brain PET signal (Figure 3) and

significantly increased AUC_{10-30 min} compared to baseline ($p < 0.0001$) for all three radiotracers (Figure 4(d)). The rank order of increases was [^{11}C]verapamil (7.4-fold) $>$ [^{11}C]N-desmethyl-loperamide (6.8-fold) $>$ [^{11}C]metoclopramide (3.3-fold). The intermediate dose of tariquidar (1 mg/kg) visually increased the brain PET signal for [^{11}C]verapamil and [^{11}C]metoclopramide with a limited impact on brain uptake of [^{11}C]N-desmethyl-loperamide (Figure 3). The corresponding increase in AUC_{10-30 min} relative to baseline was significant for [^{11}C]verapamil (2.4-fold, $p < 0.05$) and [^{11}C]metoclopramide (2.1-fold $p < 0.05$), but not for [^{11}C]N-desmethyl-loperamide (1.8-fold, $p > 0.05$, Figure 4(d)).

Discussion

PET imaging using radiolabeled P-gp substrates has convincingly demonstrated the role of this efflux transporter in limiting the brain distribution of its substrates across the BBB in humans.^{11,16,18,33,34} Efforts have been made to develop optimized PET probes to quantitatively address the importance of P-gp function at the BBB in neurological disorders with good sensitivity.^{8,35,36} Previous studies have preferentially classified

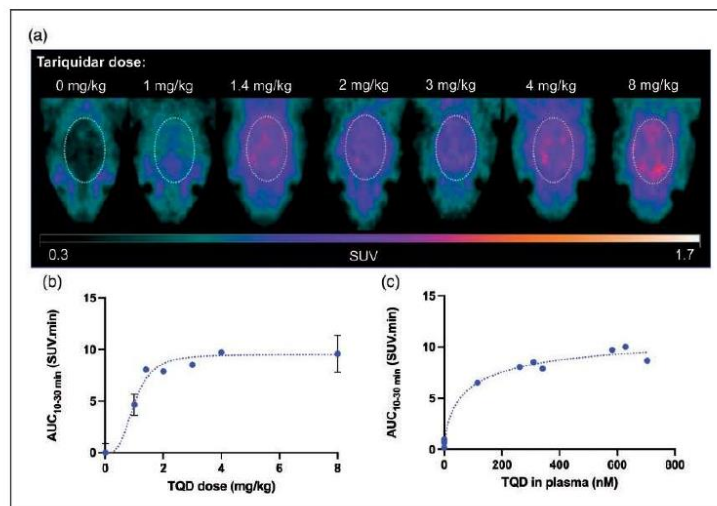


Figure 2. Dose- and concentration-response of tariquidar (TQD) for inhibition of P-gp-mediated transport of [^{11}C]metoclopramide at the rat BBB. In A, representative summed brain PET images are shown for each condition. Brain exposure ($\text{AUC}_{10-30 \text{ min}}$) of [^{11}C]metoclopramide as a function of administered tariquidar dose (B) or tariquidar plasma concentration measured at the end of the PET scan (C). Dotted lines in B and C represent fits of the employed Hill model.

radiolabeled probes as “avid” or “weak” P-gp substrates which refers to their maximal capacity of transport. However, a direct *in vitro* and *in vivo* comparison of all three PET probes currently available for human use, performed in parallel conditions, has not yet been performed. Moreover, the present work focused on the impact of partial rather than complete P-gp inhibition at the BBB on the brain distribution of radiolabeled P-gp substrates with the aim to reflect clinically relevant situations of a moderate decrease in P-gp function. Strikingly, our results point to significant differences in the “vulnerability” of radiolabeled substrates to P-gp inhibition at the BBB, which contributes to their “sensitivity” to detect changes in P-gp function using PET imaging.

Differences in the substrate properties of [^{11}C]verapamil, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide and [^{11}C]metoclopramide were first compared *in vitro*, using a standardized uptake assay in cells overexpressing human P-gp. Maximal P-gp inhibition, using 200 nM tariquidar, allowed determining the uptake ratios of the tested substrates. The results confirmed that [^{11}C]metoclopramide and [^{11}C]verapamil are “weaker” P-gp substrates than [^{11}C]N-desmethyl-loperamide (Figure 1). The magnitude of the uptake ratios was consistent with the transport ratios of these compounds measured using conventional bidirectional transport assays, which were 2.1 for verapamil, 3.8 for loperamide and

1.4 for metoclopramide.³⁷ Of note, the uptake assay employed in our work is more suitable to test compounds radiolabeled with short-lived isotopes such as carbon-11 than the conventional bidirectional transport assay. *In vitro*, [^{11}C]metoclopramide was identified as one of the “weakest” P-gp substrates (lowest uptake ratio, similar to that of [^{11}C]verapamil) but showed the highest “vulnerability” to P-gp inhibition (lowest IC_{50} of tariquidar). Interestingly, [^{11}C]verapamil appeared to be a “weaker” P-gp substrate than [^{11}C]N-desmethyl-loperamide (lower uptake ratio) but showed a lower “vulnerability” to P-gp inhibition (higher IC_{50}). Importantly, these comparative *in vitro* data suggest that the “avidity” and the “vulnerability” of P-gp substrates are independent factors that are not directly or inversely correlated.

PET experiments were needed to compare the “vulnerability” of the three probes to P-gp inhibition in the living brain. Several factors other than P-gp function may additionally influence the PET signal obtained with the investigated radiotracers in the living brain. For instance, lysosomal trapping was shown to account for the irreversible uptake of [^{11}C]N-desmethyl-loperamide in the brain.³⁸ The [^{11}C]verapamil brain PET signal comprises a considerable proportion of radiometabolites.³⁹ [^{11}C]Metoclopramide shows a significant brain-to-blood efflux component that contributes to limit brain exposure.²⁴

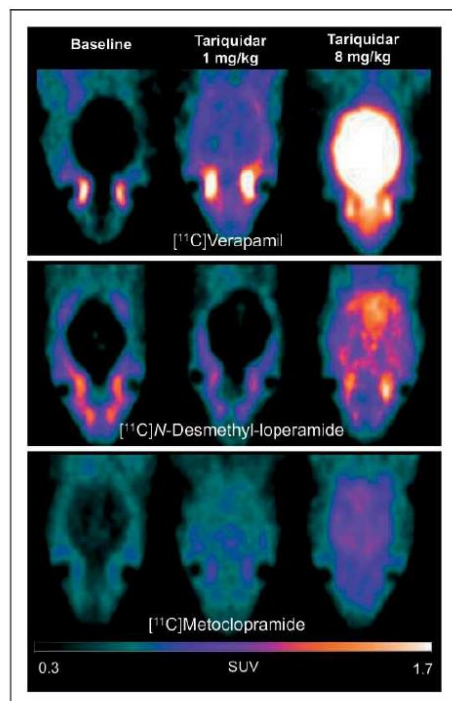


Figure 3. PET images obtained with [^{11}C]verapamil, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide and [^{11}C]metoclopramide after selected doses of the P-gp inhibitor tariquidar. Representative PET images are summed from 0 to 30 min and were obtained at baseline, after partial P-gp inhibition (1 mg/kg tariquidar) and complete P-gp inhibition (8 mg/kg tariquidar).

These particular kinetic properties may also contribute to the *in vivo* sensitivity of radiolabeled P-gp substrates to detect moderate changes in P-gp function using PET.³⁹ Dedicated kinetic models have been developed to estimate P-gp function, taking the individual properties of each radioligand into account.^{24,30,40–42} However, these models do not apply to all 3 radioligands. Tariquidar was selected as an inhibitor because doses up to 8 mg/kg were shown to not significantly impact the peripheral pharmacokinetics and metabolism of the tested radioligands in rats.^{24,30,31} Using kinetic modeling and an arterial input function, brain AUC has been previously validated as a simplified parameter to describe the response to tariquidar for [^{11}C]metoclopramide³² and [^{11}C]N-desmethyl-loperamide¹⁶ and (*R*)-[^{11}C]verapamil (personal communication, Dr. Oliver Langer). We therefore used the brain AUC as a model-independent parameter to describe

the increase in the brain exposure obtained after different degrees of P-gp inhibition, assuming negligible changes in the plasma kinetics of the investigated radioligands in the presence of increasing doses of tariquidar up to 8 mg/kg.

Mice that are heterozygous for the genes encoding P-gp (*Abcb1a/1b*^(+/-)) were shown to have approximately 50% lower P-gp expression levels at the BBB than wild-type mice.⁴³ Interestingly, no significant increases in the brain uptake of (*R*)-[^{11}C]verapamil and [^{11}C]N-desmethyl-loperamide were observed in *Abcb1a/1b*^(+/-) mice as compared with wild-type mice.⁴⁴ This suggested that (*R*)-[^{11}C]verapamil and [^{11}C]N-desmethyl-loperamide lack the sensitivity to detect the consequences of a moderate decline (<50%) in P-gp function at the BBB *in vivo*. In our study, the dose of tariquidar that inhibited 50% of the P-gp-mediated transport of [^{11}C]metoclopramide at the rat BBB increased the brain uptake of [^{11}C]verapamil, but not that of [^{11}C]N-desmethyl-loperamide. From a quantitative PET imaging perspective, the *in vivo* response to partial inhibition was similar for both [^{11}C]metoclopramide and [^{11}C]verapamil, although the latter is a much more “avid” substrate of P-gp at the rat BBB (Figure 4). A direct comparison remains however difficult because radiometabolites may contribute to the brain PET signal for [^{11}C]verapamil but not for [^{11}C]metoclopramide.^{24,39} Nevertheless, this suggests that the “weak” P-gp substrate [^{11}C]metoclopramide offers an adequate sensitivity to detect moderate decreases in P-gp function, which is probably linked to its higher “vulnerability” to P-gp inhibition.²⁴

In rats, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide behaved as an “avid” and “refractory” substrate, with a limited response to partial P-gp inhibition. Given its excellent metabolic stability in humans and its favorable neuropharmacokinetic properties, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide should be preferably employed to explore situations in which a great degree of inhibition/repression of P-gp function is expected, with an expected large increase in the PET signal.^{16,30,45,46} Altogether, our results suggest that imaging “sensitivity” of PET probes to detect partial inhibition of P-gp at the BBB *in vivo* does not only depend on the “avidity” (i.e. the ability to generate contrast between situations of full and abolished P-gp function, related to the uptake ratio), as it also depends on the “vulnerability” of the substrate (i.e. the ability to reach nearly maximal inhibition, related to the IC_{50}).

[^{11}C]Metoclopramide and [^{11}C]verapamil PET imaging in rats showed similar sensitivity (i.e. enhancement of the brain PET signal) to partial P-gp inhibition, although [^{11}C]metoclopramide is a “weaker” substrate than [^{11}C]verapamil *in vivo*, as revealed by the lower

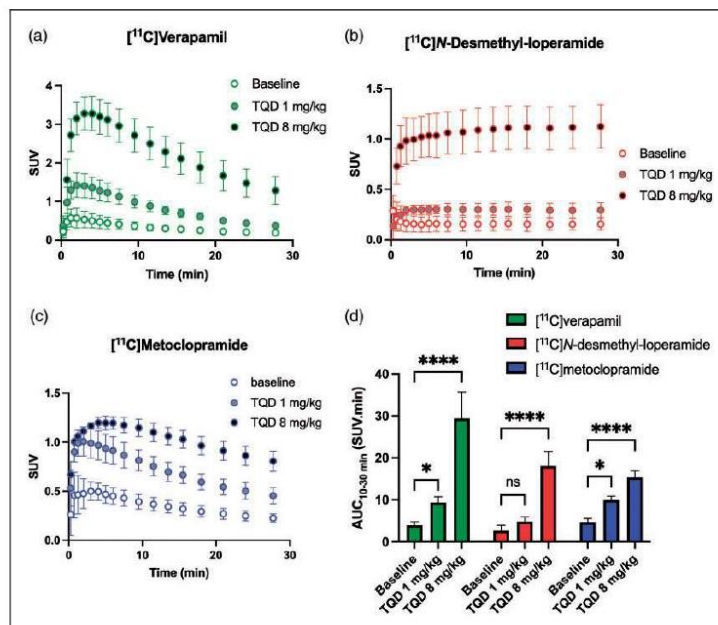


Figure 4. Impact of P-gp inhibition of the brain kinetics of radiolabeled substrates. Time-activity curves obtained with [^{11}C]verapamil (A), [^{11}C]N-desmethyl-loperamide (B) and [^{11}C]metoclopramide (C) in presence of selected states of P-gp inhibition. In D, the corresponding brain exposures ($\text{AUC}_{10-30 \text{ min}}$) are shown. Data are reported as mean \pm S.D with $n = 4$ per condition. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant (2-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test for comparison with baseline).

response to maximal P-gp inhibition (Figure 4). The *in vivo* IC_{50} of tariquidar using [^{11}C]verapamil as probe has not been determined in this work to enable a direct comparison with the IC_{50} obtained with [^{11}C]metoclopramide. It may nonetheless be hypothesized that the higher *in vivo* "vulnerability" of [^{11}C]metoclopramide may compensate its lower "avidity" compared with [^{11}C]verapamil to offer similar sensitivity to partial inhibition. Our preclinical data should be interpreted with caution with respect to their clinical translatability. Differences in P-gp expression at the BBB have been reported between humans and rodents.^{47,48} Moreover, many compounds show disparate P-gp-mediated transport between human and rodent P-gp *in vitro*.^{37,49,50} However, our comparative *in vitro* experiments, performed using cells overexpressing human P-gp, pointed to a higher "vulnerability" of [^{11}C]metoclopramide to P-gp inhibition compared with [^{11}C]verapamil and [^{11}C]N-desmethyl-loperamide.

The neuropharmacokinetic consequences of partial P-gp inhibition on the brain exposure to "weak" but "vulnerable" P-gp substrates in humans remain to be further explored. Using [^{11}C]metoclopramide PET

imaging in rats, we show here that partial P-gp inhibition may have a relatively higher impact for brain exposure compared with more "avid" but "inhibition-refractory" substrates like [^{11}C]N-desmethyl-loperamide. At the molecular level, the factors that account for the "avidity" and "vulnerability" of P-gp substrates remain poorly understood. This may imply the complex molecular interaction of substrates and inhibitors at multiple binding domains of P-gp.⁵¹ From a PET imaging perspective, this suggests a higher sensitivity of [^{11}C]metoclopramide to explore situations of moderate changes in P-gp function at the BBB. From a neuropharmacological perspective, our results suggest that partial inhibition/deficit of P-gp at the BBB may contribute to clinical variability in efficacy of CNS-targeted "vulnerable" P-gp substrates, which may deserve further attention.^{4,26}

Bauer et al. have recently shown a significant decline in P-gp function at the BBB of elderly subjects using [^{11}C]metoclopramide PET imaging.⁵² Interestingly, differences in brain distribution between elderly and young subjects were greater for [^{11}C]metoclopramide than for (R)-[^{11}C]verapamil.⁵³ This is consistent with

a higher “vulnerability” of [^{11}C]metoclopramide to moderate and physiological changes in P-gp function at the human BBB.²⁶ Interestingly, differences between young and elderly subjects could be observed using (R)-[^{11}C]verapamil in the presence of partial P-gp inhibition (3 mg/kg tariquidar).⁵⁴ This suggested that partial P-gp inhibition enhanced the “vulnerability” of (R)-[^{11}C]verapamil, thus improving the sensitivity of the technique. Such a partial inhibition protocol is difficult to implement because tariquidar is no longer available for human use and may cause drug-drug interactions with concomitant treatments in patients. This supports the use of [^{11}C]metoclopramide as a “change-sensitive” PET probe to safely explore P-gp function at the human BBB.

Conclusion

The sensitivity of PET probes to detect moderate changes in P-gp function at the BBB appeared different among clinically validated radiolabeled substrates. Our results suggest that the “weak” but “vulnerable” P-gp substrate [^{11}C]metoclopramide offers good sensitivity as a PET probe to detect moderate changes in P-gp function *in vivo*. We advocate that the future development of radiolabeled substrates for imaging the function of P-gp or other ABC efflux transporters at the BBB should also include an evaluation under conditions of partial transporter inhibition. This may improve our understanding of the impact of clinically relevant situations of a moderate decline in transporter function at the BBB.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Louise Breuil received funding from the joined AP-HP/CEA grant. This work was performed on a platform partially funded by the France Life Imaging network (grant ANR-11-INBS-0006).

Acknowledgements

We thank Maud Goislard, Thierry Lekieffre, Christine Coulon and Kevin Pansavath for helpful technical assistance.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Authors' contributions

Nicolas Tournier, Louise Breuil and Oliver Langer designed the research; Solène Marie, Sébastien Goutal, Charles Truillet, Wadad Saba and Fabien Caillé performed the research; Louise Breuil, Sylvain Auvity and Sébastien

Goutal analyzed the data; Louise Breuil and Nicolas Tournier drafted the paper. All authors revised the manuscript critically for important intellectual content and approved the final version.

References

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 13–25.
- Gil-Martins E, Barbosa DJ, Silva V, et al. Dysfunction of ABC transporters at the blood-brain barrier: role in neurological disorders. *Pharmacol Ther* 2020; 213: 107554.
- Bartmann H, Fuest C, la Fougere C, et al. Imaging of P-glycoprotein-mediated pharmacoresistance in the hippocampus: proof-of-concept in a chronic rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2010; 51: 1780–1790.
- Löscher W and Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 591–602.
- Liu JYW, Thom M, Catarino CB, et al. Neuropathology of the blood-brain barrier and pharmacoresistance in human epilepsy. *Brain* 2012; 135: 3115–3133.
- García-Varela L, Arif WM, Vázquez García D, et al. Pharmacokinetic modeling of [18F]MC225 for quantification of the P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in non-human primates with PET. *Mol Pharm* 2020; 17: 3477–3486.
- Pike VW. PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30: 431–440.
- Kannan P, John C, Zoghbi SS, et al. Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: pharmacokinetics and *in vivo* applications. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86: 368–377.
- Muzi M, Mankoff DA, Link JM, et al. Imaging of cyclosporine inhibition of P-glycoprotein activity using 11C-verapamil in the brain: studies of healthy humans. *J Nucl Med* 2009; 50: 1267–1275.
- Kreisl WC, Liow J-S, Kimura N, Seneca N, et al. P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in humans can be quantified with the substrate radiotracer 11C-N-desmethyl-loperamide. *J Nucl Med* 2010; 51: 559–566.
- Tournier N, Bauer M, Pichler V, et al. Impact of P-Glycoprotein function on the brain kinetics of the weak substrate 11C-Metoclopramide assessed with PET imaging in humans. *J Nucl Med* 2019; 60: 985–991.
- Doran A, Obach RS, Smith BJ, et al. The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDRI1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 165–174.
- Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, et al. Development of an *in situ* mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 381–386.
- Baudou E, Lespine A, Durrieu G, et al. Serious ivermectin toxicity and human ABCB1 nonsense mutations. *N Engl J Med* 2020; 383: 787–789.

15. Sauna ZE, Kim I-W and Ambudkar SV. Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1). *J Bioenerg Biomembr* 2007; 39: 481–487.
16. Kreisl WC, Bhatia R, Morse CL, et al. Increased permeability-glycoprotein inhibition at the human blood-brain barrier can be safely achieved by performing PET during peak plasma concentrations of tariquidar. *J Nucl Med* 2015; 56: 82–87.
17. Bauer M, Zeitlinger M, Karch R, et al. Pgp-mediated interaction between (R)-[11C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier: a comparison with rat data. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 91: 227–233.
18. Bauer M, Karch R, Zeitlinger M, et al. Approaching complete inhibition of P-glycoprotein at the human blood-brain barrier: an (R)-[11C]verapamil PET study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 743–746.
19. Traxl A, Mairinger S, Filip T, et al. Inhibition of ABCB1 and ABCG2 at the mouse blood-brain barrier with marketed drugs to improve brain delivery of the model ABCB1/ABCG2 substrate [11C]erlotinib. *Mol Pharm* 2019; 16: 1282–1293.
20. Matsson P, Pedersen JM, Norinder U, et al. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res* 2009; 26: 1816–1831.
21. Kalvass JC, Polli JW, Bourdet DL, International Transporter Consortium, et al. Why clinical modulation of efflux transport at the human blood-brain barrier is unlikely: the ITC evidence-based position. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 94: 80–94.
22. Eyal S, Hsiao P and Unadkat JD. Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy? *Pharmacol Ther* 2009; 123: 80–104.
23. Zoufal V, Mairinger S, Brackhan M, et al. Imaging P-Glycoprotein induction at the blood-brain barrier of a β -Amyloidosis mouse model with 11C-metoclopramide PET. *J Nucl Med* 2020; 61: 1050–1057.
24. Pottier G, Marie S, Goutal S, et al. Imaging the impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) function on the brain kinetics of metoclopramide. *J Nucl Med* 2016; 57: 309–314.
25. Wanek T, Mairinger S and Langer O. Radioligands targeting P-glycoprotein and other drug efflux proteins at the blood-brain barrier. *J Labelled Comp Radiopharm* 2013; 56: 68–77.
26. Bauer M, Tournier N and Langer O. Imaging P-glycoprotein function at the blood-brain barrier as a determinant of the variability in response to CNS drugs. *Clin Pharmacol Ther* 2019; 105: 1061–1064. doi:doi:10.1002/cpt.1402.
27. Caillé F, Goutal S, Marie S, et al. Positron emission tomography imaging reveals an importance of saturable liver uptake transport for the pharmacokinetics of metoclopramide. *Contrast Media Mol Imaging* 2018; 2018: 7310146.
28. Damont A, Goutal S, Auvity S, et al. Imaging the impact of cyclosporin A and dipyrindamole on P-glycoprotein (ABCB1) function at the blood-brain barrier: a [(11)C]-N-desmethyl-loperamide PET study in nonhuman primates. *Eur J Pharm Sci* 2016; 91: 98–104.
29. Luurtsema G, Windhorst AD, Mooijer MPJ, et al. Fully automated high yield synthesis of (R)- and (S)-[11C] verapamil for measuring P-glycoprotein function with positron emission tomography. *J Labelled Cpd Radiopharm* 2002; 45: 1199–1207.
30. Farwell MD, Chong DJ, Iida Y, et al. Imaging P-glycoprotein function in rats using [11C]-N-desmethyl-loperamide. *Ann Nucl Med* 2013; 27: 618–624.
31. Bankstahl JP, Kuntner C, Abraham A, et al. Tariquidar-induced P-glycoprotein inhibition at the rat blood-brain barrier studied with (R)-11C-verapamil and PET. *J Nucl Med* 2008; 49: 1328–1335.
32. Auvity S, Caillé F, Marie S, et al. Glycoprotein (ABCB1) inhibits the influx and increases the efflux of 11C-metoclopramide across the blood-brain barrier: a PET study on nonhuman primates. *J Nucl Med* 2018; 59: 1609–1615.
33. Sasongko L, Link JM, Muzi M, et al. Imaging P-glycoprotein transport activity at the human blood-brain barrier with positron emission tomography. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77: 503–514.
34. Bauer M, Karch R, Neumann F, et al. Assessment of regional differences in tariquidar-induced P-glycoprotein modulation at the human blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 510–515.
35. Tournier N, Stieger B and Langer O. Imaging techniques to study drug transporter function in vivo. *Pharmacol Ther* 2018; 189: 104–122.
36. Luurtsema G, Elsinga P, Dierckx R, et al. PET tracers for imaging of ABC transporters at the blood-brain barrier: principles and strategies. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 5779–5785.
37. Feng B, Mills JB, Davidson RE, et al. In vitro P-glycoprotein assays to predict the in vivo interactions of P-glycoprotein with drugs in the central nervous system. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 268–275.
38. Kannan P, Brimacombe KR, Kreisl WC, et al. Lysosomal trapping of a radiolabeled substrate of P-glycoprotein as a mechanism for signal amplification in PET. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 2593–2598.
39. Luurtsema G, Molthoff CFM, Schuit RC, et al. Evaluation of (R)-[11C]verapamil as PET tracer of P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: kinetics and metabolism in the rat. *Nucl Med Biol* 2005; 32: 87–93.
40. Lubberink M, Luurtsema G, van Berckel BNM, et al. Evaluation of tracer kinetic models for quantification of P-glycoprotein function using (R)-[11C] verapamil and PET. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 424–433.
41. Müllauer J, Kuntner C, Bauer M, et al. Pharmacokinetic modeling of P-glycoprotein function at the rat and human blood-brain barriers studied with (R)-[11C]verapamil positron emission tomography. *EJNMMI Res* 2012; 2: 58.
42. Lubberink M. Kinetic models for measuring P-glycoprotein function at the blood-brain barrier with positron

- emission tomography. *Curr Pharm Des* 2016; 22: 5786–5792.
43. Umbenhauer DR, Lankas GR, Pippert TR, et al. Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 88–94.
 44. Wanek T, Römermann K, Mairinger S, et al. Factors governing P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions at the blood-brain barrier measured with positron emission tomography. *Mol Pharm* 2015; 12: 3214–3225.
 45. Lazarova N, Zoghbi SS, Hong J, et al. Synthesis and evaluation of [N-methyl-11C]N-desmethyl-loperamide as a new and improved PET radiotracer for imaging P-gp function. *J Med Chem* 2008; 51: 6034–6043.
 46. Goutal S, Gerstenmayer M, Auvity S, et al. Physical blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound does not overcome the transporter-mediated efflux of erlotinib. *J Controlled Release* 2018; 292: 210–220.
 47. Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, et al. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem* 2011; 117: 333–345.
 48. Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, et al. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm* 2011; 8: 1332–1341.
 49. Tournier N, Cisternino S, Peyronneau M-A, et al. Discrepancies in the P-glycoprotein-mediated transport of (18)F-MPPF: a pharmacokinetic study in mice and non-human primates. *Pharm Res* 2012; 29: 2468–2476.
 50. Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, et al. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 2007; 52: 333–346.
 51. Prajapati R and Sangamwar AT. Translocation mechanism of P-glycoprotein and conformational changes occurring at drug-binding site: insights from multi-targeted molecular dynamics. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838: 2882–2898.
 52. Bauer M, Bamminger K, Pichler V, et al. Impaired clearance from the brain increases the brain exposure to metoprolol in elderly subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2021; 109: 754–761. doi:10.1002/cpt.2052.
 53. Bauer M, Karch R, Neumann F, et al. Age dependency of cerebral P-gp function measured with (R)-[11C]verapamil and PET. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65: 941–946.
 54. Bauer M, Wulkersdorfer B, Karch R, et al. Effect of P-glycoprotein inhibition at the blood-brain barrier on brain distribution of (R)-[11 C]verapamil in elderly vs. young subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2017; 83: 1991–1999.



Article

Comparison of the Blood–Brain Barrier Transport and Vulnerability to P-Glycoprotein-Mediated Drug–Drug Interaction of Domperidone versus Metoclopramide Assessed Using In Vitro Assay and PET Imaging

Louise Breuil ^{1,2}, Sébastien Goutal ¹, Solène Marie ^{1,3} , Antonio Del Vecchio ⁴, Davide Audisio ⁴, Amélie Soyer ¹, Maud Goislard ¹, Wadad Saba ¹, Nicolas Tournier ^{1,*} and Fabien Caillé ^{1,†}

¹ Laboratoire d’Imagerie Biomédicale Multimodale (BIOMAPS), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm, Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4 place du Général Leclerc, 91401 Orsay, France

² Pharmacy Department, Robert-Debré Hospital, AP-HP, Université Paris Cité, 75019 Paris, France

³ Pharmacy Department, Bicêtre Hospital, AP-HP, Université Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

⁴ CEA, Département Médicaments et Technologies pour la Santé, SCBM, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France

* Correspondence: n.tournier@universite-paris-saclay.fr

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Breuil, L.; Goutal, S.; Marie, S.; Del Vecchio, A.; Audisio, D.; Soyer, A.; Goislard, M.; Saba, W.; Tournier, N.; Caillé, F. Comparison of the Blood–Brain Barrier Transport and Vulnerability to P-Glycoprotein-Mediated Drug–Drug Interaction of Domperidone versus Metoclopramide Assessed Using In Vitro Assay and PET Imaging. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1658. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081658>

Academic Editor: Balázs Sarkadi

Received: 7 July 2022

Accepted: 5 August 2022

Published: 9 August 2022

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Domperidone and metoclopramide are widely prescribed antiemetic drugs with distinct neurological side effects. The impact of P-glycoprotein (P-gp)-mediated efflux at the blood–brain barrier (BBB) on brain exposure and BBB permeation was compared in vitro and in vivo using positron emission tomography (PET) imaging in rats with the radiolabeled analogs [¹¹C]domperidone and [¹¹C]metoclopramide. In P-gp-overexpressing cells, the IC₅₀ of tariquidar, a potent P-gp inhibitor, was drastically different using [¹¹C]domperidone (221 nM [198–248 nM]) or [¹¹C]metoclopramide (4 nM [2–8 nM]) as the substrate. Complete P-gp inhibition led to a 1.8-fold higher increase in the cellular uptake of [¹¹C]domperidone compared with [¹¹C]metoclopramide ($p < 0.0001$). Brain PET imaging revealed that the baseline brain exposure (AUC_{brain}) of [¹¹C]metoclopramide was 2.4-fold higher compared with [¹¹C]domperidone ($p < 0.001$), consistent with a 1.8-fold higher BBB penetration (AUC_{brain}/AUC_{plasma}). The maximal increase in the brain exposure (2.9-fold, $p < 0.0001$) and BBB penetration (2.9-fold, $p < 0.0001$) of [¹¹C]metoclopramide was achieved using 8 mg/kg of tariquidar. In comparison, neither 8 nor 15 mg/kg of tariquidar increased the brain exposure of [¹¹C]domperidone ($p > 0.05$). Domperidone is an avid P-gp substrate that was in vitro compared with metoclopramide. Domperidone benefits from a lower brain exposure and a limited risk for P-gp-mediated drug–drug interaction involving P-gp inhibition at the BBB.

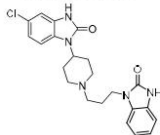
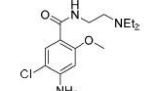
Keywords: ATP-binding cassette; drug–drug interaction; membrane transporter; neuropharmacology; pharmacokinetics; PET imaging; radiochemistry; P-glycoprotein; blood–brain barrier

1. Introduction

Domperidone and metoclopramide are both dopamine D2 receptor antagonists prescribed as antiemetic drugs. Their pharmacological targets are the peripheral D2 receptors, especially at the area postrema level, a spinal structure responsible for the vomiting reflex. Metoclopramide is also a 5HT₃ serotonin receptor antagonist responsible for its gastro-prokinetic effect. Their action on the D2 receptors of the central nervous system (CNS) is related to adverse events. They are rarely observed with domperidone, which acts at the antehypophyse level, generating gynecomastia and galactorrhea [1]. The Food and Drug Administration (FDA) put a black-box warning on metoclopramide, thus restricting its clinical use [2]. Metoclopramide has been shown to cause neurological side effects such as peripheral extrapyramidal symptoms and tardive dyskinesia. The risks increase when

metoclopramide is administered in high doses and during long-term treatment [3]. Table 1 shows the CNS relative frequencies of the side effects of domperidone and metoclopramide.

Table 1. Comparison of neurological side effects between domperidone and metoclopramide [4–6].

Side Effects	Very Frequent	Frequent	Not Frequent	Rare	Unspecified
Domperidone 			dizziness, sleepiness, headache, extrapyramidal signs		restless legs syndrome
Metoclopramide 	sleepiness	extrapyramidal signs, parkinsonian syndrome, akathisia	dystonia, dyskinesia, altered consciousness	convulsions	late dyskinesia, neuroleptic malignant syndrome

These differences may be explained by lower brain penetration of domperidone compared with metoclopramide [7]. It is, however, difficult to estimate brain penetration and exposure in vivo. There is a need for minimally invasive methods to explore and compare the brain penetration of such compounds with clinical perspectives.

Both domperidone and metoclopramide are substrates of the P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), the main efflux transporter expressed at the blood–brain barrier (BBB). A large body of literature suggests that the P-gp function controls the brain exposure to many drugs [8]. The most widely accepted hypothesis for low brain penetration of domperidone is that domperidone is an avid substrate of the P-gp [9]. In contrast, metoclopramide is considered a comparatively “weak” P-gp substrate in vitro [10], implying that metoclopramide exerts CNS effects despite fully functional P-gp at the BBB.

Comparison of the brain kinetics of domperidone and metoclopramide can first be informed by available data in the literature. The BBB passage of domperidone and metoclopramide has been compared in an in vitro model of the BBB using bovine brain capillary endothelial cells grown on filter inserts in a co-culture system with glial cells [11]. Compared with the passage of solutes across the filter (no BBB), the authors reported a 76% passage for domperidone versus 100% for metoclopramide [11]. The transport across parallel artificial membrane permeability assays (PAMPA) was 76-fold lower for domperidone compared with metoclopramide, suggesting higher passive diffusion of metoclopramide across lipid membranes [12]. The efflux ratio of domperidone in cells overexpressing the human P-gp (MDCK-MDR1), using bidirectional transport assay, was 31.2 for domperidone. This transport was reduced to ~1 in the presence of P-gp inhibition, thus confirming that domperidone is an avid substrate of the P-gp [13]. In comparison, a 1.4 efflux ratio for metoclopramide was reported using the same MDCK-MDR1 cell line from the same origin, suggesting that metoclopramide is a much “weaker” substrate of the P-gp [10]. This was also observed in cells transfected with the rodent P-gp gene (LLC-PK1-Mdr1a), in which the efflux ratio of domperidone was 87.5 versus 1.6 for metoclopramide [7]. Ex vivo studies in rats reported a tissue/plasma ratio ($K_{p,brain}$) of 0.17 for domperidone [14] versus 1.72 for metoclopramide [15]. The $K_{p,uu,brain}$, which takes the binding to plasma and brain proteins into account, was 0.022 for domperidone versus 2.4 for metoclopramide in rats [16]. Another rat study consistently reported a $K_{p,uu,brain}$ of 0.044 for domperidone versus 0.235 for metoclopramide [7]. A 6.6-fold increase in the $K_{p,brain}$ of metoclopramide was observed in P-gp deficient mice compared with wild-type mice [17]. Schinkel et al. reported that the $K_{p,brain}$ of radiolabeled domperidone (3H -domperidone) was not increased in P-gp deficient mice, which was attributed to the predominant proportion of circulating

radiometabolites, which rapidly surpassed the radioactive signal of parent unmetabolized ^3H -domperidone in plasma [9]. However, P-gp deficiency was associated with increased CNS effects and catalepsy compared with wild-type mice when an oral pharmacological dose of domperidone was administered. This suggests a higher level of domperidone in the CNS of P-gp-deficient mice. However, as P-gp is abundant in the intestinal epithelium, increased oral bioavailability of domperidone in P-gp-deficient mice may also have contributed to the observed effect [9,18]. By using in situ brain perfusion, which bypasses the effect of plasma protein binding and peripheral metabolism, a significant increase of the $K_{p,\text{brain}}$ of domperidone was observed in the presence of P-gp inhibition achieved using high concentration of the P-gp inhibitors cyclosporin A (2.5 μM) [19] or verapamil (500 μM) in the perfusate, which could hardly be achieved in vivo.

It is broadly assumed that avid substrates expose to a higher risk of drug–drug interactions (DDIs) caused by P-gp inhibitors. In comparison, weak substrates have less impact on brain kinetics, assuming a limited risk for clinically relevant DDI [20]. It may therefore be hypothesized that the consequences of DDI precipitated by P-gp inhibitors may lead to unintended brain exposure and CNS effects, which may balance the CNS safety of domperidone in this particular situation.

Positron emission tomography (PET) imaging provides an advanced technology to study in vivo the crossing of biological barriers, as it allows for the study of drug distribution and pharmacokinetics in a non-invasive way. Both metoclopramide and domperidone can be isotopically radiolabeled with carbon-11, i.e., without modification of the chemical structure and, by extension, the biological properties of the drug. [^{11}C]metoclopramide has been validated as a PET probe for detecting the regulation of P-gp function at the BBB in animals and humans, including the impact of inhibition and induction of the transporter [21–23]. Accumulated in vitro and in vivo data suggest the high vulnerability of [^{11}C]metoclopramide to P-gp inhibition. Availability of [^{11}C]domperidone for PET imaging offers the unique opportunity to compare the brain kinetics of domperidone with previously published data of metoclopramide [21] obtained using the same approach [24]. This study assesses the P-gp substrate properties of domperidone in vitro in transfected cells expressing the human P-gp. Baseline brain exposure and consequences of DDI precipitated by tariquidar (TQD), a potent inhibitor of P-gp, are then assessed in vivo using PET imaging in rats.

2. Materials and Methods

2.1. [^{11}C]Metoclopramide PET Data

All in vitro and in vivo experiments performed using [^{11}C]metoclopramide presented in this article have already been published [21,24]. However, some newly estimated pharmacokinetic parameters and previously published data relative to [^{11}C]metoclopramide brain PET imaging are displayed to allow for direct comparison with data obtained using [^{11}C]domperidone.

2.2. Chemistry

Tariquidar (TQD) used for P-gp inhibition was purchased from Eras Labo (Saint-Nazaire-les-Eymes, France). TQD solutions for intravenous injections were freshly prepared at the selected concentrations on the day of the experiment by dissolving TQD dimesylate 2.35 H_2O in dextrose solution (5%, *w/v*), followed by dilution with sterile water. *O*-desmethyl metoclopramide was purchased from LGC standards (France). The precursor for [^{11}C]domperidone radiosynthesis was synthesized in house [25].

2.3. Radiochemistry

[^{11}C]metoclopramide was synthesized by automated radiomethylation using a TRACERlab[®] FX C Pro module (GE Healthcare, Buc, France) and cyclotron-produced [^{11}C]CO₂ according to the method described in the literature [26]. No carrier added [^{11}C]CO₂ (50–70 GBq) was produced via the $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ nuclear reaction by irradiation of

an $[^{14}\text{N}]\text{N}_2$ target containing 0.15–0.5% of O_2 on a cyclone 18/9 cyclotron (18 MeV, IBA, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium). $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ was subsequently reduced to $[^{11}\text{C}]\text{CH}_4$ and iodinated to $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ following the process described by Larsen et al. [27] and finally converted to $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ according to the method of Jewett [28]. $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ was bubbled into a solution of *O*-desmethyl-metoclopramide (1 mg) and aqueous sodium hydroxide (3 M, 7 μL) in acetone (400 μL) at -20°C for 3 min. The mixture was heated at 110°C for 2 min, then evaporating the residual solvent to dryness at 110°C under a vacuum for 30 s. Upon cooling to 60°C , a mixture of aqueous NaH_2PO_4 (20 mM)/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_3\text{PO}_4$ (85/15/0.2 *v/v/v*) was added. Purification was realized by reverse phase HPLC (Waters Symmetry[®] C18 7.8 \times 300 mm, 7 μm) with a 501 HPLC Pump (Waters, Guyancourt, France) using aqueous NaH_2PO_4 (20 mM)/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_3\text{PO}_4$ (85/15/0.2 *v/v/v*, 5 mL/min) as eluent. UV detection (K2501, Knauer, Germany) was performed at 220 nm. The purified compound was diluted with water (20 mL) and passed through a Sep-Pak[®] C18 cartridge (Waters, Milford, CT, USA). The cartridge was rinsed with water (10 mL) and eluted with ethanol (2 mL). The final compound was diluted with saline (0.9% *w/v*, 8 mL) to afford ready-to-inject $[^{11}\text{C}]\text{metoclopramide}$ (1.9 ± 0.2 GBq) in $12\% \pm 3\%$ radiochemical yield (RCY) within 40 min and with a molar activity (MA) of 88 ± 13 GBq/ μmol at the end of the beam (EOB) ($n = 35$) (Figure 1A).

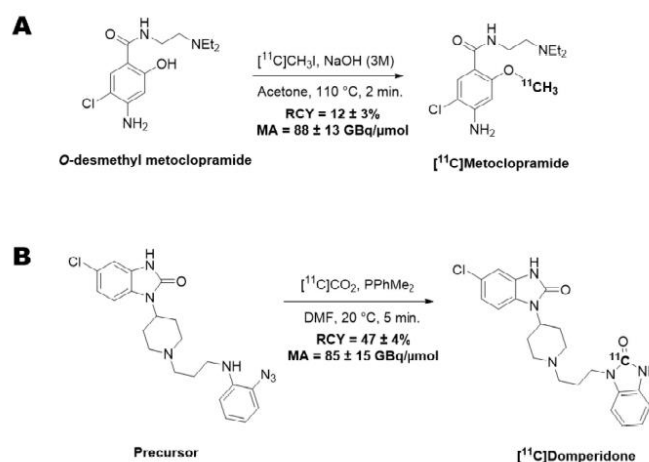


Figure 1. Radiosynthesis scheme of $[^{11}\text{C}]\text{metoclopramide}$ (A) and $[^{11}\text{C}]\text{domperidone}$ (B).

$[^{11}\text{C}]\text{Domperidone}$ was synthesized by radiocarbonylation following the original Staudiger Aza-Wittig (SAW) method described in the literature [25]. Automated radio-labelling was performed using a Melplus research module (Synthra GmbH, Hamburg, Germany) with modifications to undergo direct bubbling of the $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$. No carrier-added $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ (30–40 GBq) was produced via the $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ nuclear reaction by irradiation of an $[^{14}\text{N}]\text{N}_2$ target containing 0.15–0.5% of O_2 on a cyclone 18/9 cyclotron (18 MeV, IBA, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium) and trapped at -180°C . $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ was then released at 0°C under a stream of helium (8 mL/min) to bubble for 10 s into the reaction vessel containing a solution of the precursor (1 mg) and dimethylphenyl phosphine (15 μL) in DMF (300 μL) at -50°C . The mixture was heated at 20°C for 5 min and hydrolyzed with glacial acetic acid (100 μL), followed by a mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ (65/35/0.1 *v/v/v*, 1 mL). The crude product was purified by semi-preparative HPLC on a reverse-phase Symmetry C18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μm , Waters, Milford, CT, USA) using a mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$ (65/35/0.1 *v/v/v*, 5 mL/min) as eluent with gamma and UV ($\lambda = 280$ nm) detection. The collected peak of $[^{11}\text{C}]\text{domperidone}$ was diluted with

water (20 mL) and loaded on a C18 cartridge (Sep-Pak C18, Waters, Milford, CT, USA). The cartridge was rinsed with water (10 mL), and the product was eluted with ethanol (2 mL) and further diluted with aq. 0.9% NaCl (8 mL). Ready-to-inject [^{11}C]domperidone (5.9 ± 0.3 GBq) was obtained within 30 min from the end of the beam in $47 \pm 4\%$ RCY and 85 ± 15 GBq/ μmol MA at the EOB ($n = 12$) (Figure 1B).

For both radiotracers, quality control was performed by HPLC using a 717 plus Autosampler system equipped with a 1525 binary pump and a 2996 photodiode array detector (Waters, Milford, CT, USA) and a Flowstar LB 513 (Berthold, Thoiry, France) gamma detector. The system was monitored with the Empower 3 (Waters, Milford, CT, USA) software. HPLC were realized on a reverse-phase analytical Symmetry C18 (50×3.9 mm, $5 \mu\text{m}$, Waters, Milford, CT, USA) column using either a mixture of aqueous NaH_2PO_4 (4 mM)/acetonitrile/ H_3PO_4 (90/10/0.2 v/v/v, 2 mL/min) or a mixture of $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{PicB7}^\circledast$ (70/30/0.2 v/v/v, 2 mL/min) as eluent for [^{11}C]metoclopramide or [^{11}C]domperidone, respectively. UV detection was performed at 274 nm or 285 nm for [^{11}C]metoclopramide or [^{11}C]domperidone, respectively. Identification of the peak was assessed by comparing the retention time of the carbon-11-labeled compound with the retention time of the non-radioactive reference (t_{Ref}). For acceptance, the retention time must be within the $t_{\text{Ref}} \pm 10\%$ range. Radiochemical purity (RCP) was calculated as the ratio of the peak's area under the curve (AUC) over the sum of the AUCs of all other peaks on gamma chromatograms. RCP is the mean value of three consecutive runs. The RCY of the labeling reaction was calculated as the ratio of the decay-corrected activity at the end of the synthesis (A_{EOS}) CO_2 measured in an ionization chamber (Capintec $^\circledast$, Berthold, Thoiry, France) over the starting activity of [^{11}C]CO $_2$ (A_{CO_2}) measured by the calibrated detector of the synthesizer. This ratio was corrected for the RCP following the equation: $\text{RCY} = (A_{\text{EOS}}/A_{\text{CO}_2}) \times \text{RCP}$. MA was calculated as the ratio of the activity of the collected peak of the radioactive product measured in an ionization chamber (Capintec $^\circledast$, Berthold, Thoiry, France) over the molar quantity of the compound determined using calibration curves. MA was calculated as the mean value of three consecutive runs.

Chemical characterization of [^{11}C]metoclopramide and [^{11}C]domperidone is reported in the Supplementary Material. The Supplementary Material shows HPLC and radioHPLC data for each radiotracer.

2.4. Uptake Assay in P-gp Overexpressing Cells

Culture media and buffers were obtained from Fischer Scientific, France. Stably transfected MDCKII-MDR1 cells were obtained from Dr. Alfred Schinkel (National Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) and were grown under a controlled atmosphere at 37°C , $5\% \text{CO}_2$. The culture medium was composed of DMEM Glutamax (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4.5 g/L dextrose, 1 mM pyruvate) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin 5000 U/mL).

P-gp-mediated transport of [^{11}C]domperidone and [^{11}C]metoclopramide was compared in cells expressing human P-gp. Cells were seeded in 24-well plates (30,000 cells per well) in a 500 μL culture medium. Cells were grown to confluence (~ 2 days). On the day of the experiment, the culture medium was removed and replaced by 200 μL of incubation buffer (10% HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) + 1.26 mM CaCl_2 + 0.49 mM MgCl_2) containing 1 mM pyruvate and 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 37°C). The incubation buffer contained the tested radiolabeled P-gp substrate (~ 37 MBq/40 mL corresponding to $<1 \mu\text{g}/40$ mL of the unlabeled compound) and TQD at the selected concentration. TQD was dissolved in DMSO, and TQD concentrations ranged from 0 to 800 nM (1% v/v final DMSO concentration). After 30 min of incubation at 37°C , the buffer was removed, and cell monolayers were rapidly washed with 300 μL of ice-cold Dulbecco's phosphate buffer. Cells were then lysed with 500 μL of NaOH (10 mM, 10 min). Then, 400 μL of cell lysate was collected from each well ($n = 4$ wells per condition) and gamma counted using a Cobra Quantum (Perkin-Elmer, Villebon-sur-Yvette, France).

2.5. Animals

A total of 12 male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) (263 ± 34 g) were used to investigate the brain kinetics of [^{11}C]domperidone. Animals were housed and acclimatized for at least 3 days before the experiments. Rats had free access to chow and water. All animal experiments were in accordance with the recommendations of the European Community (2010/63/UE) and the French National Committees (law 2013-118) for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was approved by a local ethics committee for animal use (CETEA) and by the French Ministry of Agriculture (APAFIS#74662016110417049220 v2). The sample size for each group was based on previous studies [21,24].

2.6. PET Experiments

PET acquisitions were performed using an Inveon microPET scanner (Siemens, TN, USA). Anesthesia was induced and then maintained using 3.5% followed by 1.5–2.5% isoflurane in O_2 . Radiotracers were diluted in saline to obtain at least <10% ethanol in the ready-to-inject preparation. Thirty-minute dynamic scans were acquired, starting with an intravenous bolus injection of [^{11}C]domperidone (32 ± 5 MBq, 0.80 ± 0.55 μg) via a catheter inserted in the caudal lateral vein. PET data of [^{11}C]metoclopramide used for comparison with [^{11}C]domperidone have already been reported. The injected dose of [^{11}C]metoclopramide used for comparison was (35 ± 5 MBq, 3.4 ± 1.3 μg) [24].

2.7. P-gp Inhibition Protocol

TQD was used to inhibit P-gp function in rats. TQD was injected in a volume of 200–300 μL into the caudal vein 15 min before radiotracer injection. PET acquisitions using [^{11}C]domperidone were performed after vehicle injection, 8 mg/kg ($n = 1$) or 15 mg/kg ($n = 4$) of TQD.

2.8. Arterial Input Function

Dedicated experiments were performed in additional rats to estimate the metabolism and arterial input function of [^{11}C]domperidone in the absence and the presence of P-gp inhibition using TQD ($n = 2$ for each condition).

Blood samples (50 μL) were collected at selected times from the femoral artery to establish total radioactivity kinetics in arterial plasma. Plasma was separated from whole blood by centrifugation (5 min, 2054 g, 4 $^{\circ}\text{C}$), and 20 μL of plasma and whole blood were counted using a PET cross-calibrated gamma well counter (WIZARD2, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) to obtain the whole-blood and plasma activity curves. All data were corrected for radioactive decay from the injection time. For the larger blood samples, 80 μL plasma was deproteinized with acetonitrile. The supernatant was injected in high-performance liquid chromatography, equipped with an Atlantis[®] T3 5 μm 10 \times 250 mm column (Waters, Guyancourt, France) and an Atlantis[®] T3 5 μm 19 \times 10 mm pre-column (Waters) with an LB-514 radioactivity flow detector (Berthold, France, MX Z100 cell). The mobile phase was composed of water containing 0.1% (v/v) TFA (solvent A) and acetonitrile containing 0.1% (v/v) TFA (solvent B) delivered in a gradient elution mode at a flow rate of 5 mL min^{-1} : solvent B increased linearly from 20 to 30% from 0 to 9 min. The [^{11}C]domperidone parent fraction was calculated as a percentage of the total radioactivity (metabolites and parent).

For each animal, a 1-exponential decay function was fitted to [^{11}C]domperidone parent fraction, which was time multiplied with the plasma activity curve to obtain the metabolite-corrected arterial plasma input function used for the kinetic modeling.

The method for [^{11}C]metoclopramide metabolism has been previously reported [21].

2.9. Data Analysis and Statistics

2.9.1. In Vitro Data

Counting values obtained in each well were normalized using Equation (1):

$$I\% = \frac{(R - mR_{zero})}{mR_{max}} \times 100 \quad (1)$$

where $I\%$ is the extent of inhibition ($I\%$) between 0 and 100%, R is the radioactivity in the 4 tested wells, mR_{zero} is the mean of the 4 wells without TQD, and mR_{max} is the difference of means between the 4 wells containing the highest concentration of TQD (800 nM) and the 4 wells without TQD.

The in vitro half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}) was estimated by non-linear regression using the “One-site binding Hill equation” function in Graphpad Prism software (V8.0, San Diego, CA, USA) with maximal uptake constrained to 100%. IC_{50} values obtained for each radiotracer were considered different when their 95% confidence interval ($CI_{95\%}$) did not overlap. The uptake ratio (mean \pm S.D) of each P-gp substrate was determined as the maximal intracellular radioactivity after complete inhibition of P-gp (800 nM TQD for [^{11}C]domperidone and 200 nM for [^{11}C]metoclopramide) divided by the mean intracellular radioactivity without P-gp inhibition. The normality of the data was checked using the Kolmogorov–Smirnov test. Uptake ratios were then compared using the t -test.

2.9.2. PET Data Analysis

Images were reconstructed with the Fourier rebinning algorithm and the three-dimensional ordered-subset expectation-maximization algorithm, including normalization, attenuation, scatter, and random corrections. Image analysis and quantification of radioactivity uptake were performed using PMOD software (version 3.9; PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). A region of interest was drawn over the whole brain to generate time-activity curves (TACs) with time frame durations of 0.25 min, 2×0.5 min, 0.75 min, 4×1 min, 1.5 min, 4×2 min, 3×2.5 min, 3×3 min, and 3.5 min. Brain radioactivity was corrected for ^{11}C decay and expressed as the standardized uptake value (SUV) after correction by injected dose and animal weight.

Brain and plasma exposure of [^{11}C]domperidone was estimated by the area under the TAC between 0 and 30 min and 20 and 30 min in the brain ($AUC_{brain\ 0-30}$; $AUC_{brain\ 20-30}$; $n = 3-4$ per condition) and between 20 and 30 min in the plasma ($AUC_{plasma\ 20-30}$; $n = 2$ per condition). The mean $AUC_{plasma\ 20-30}$ was obtained in each condition to estimate $K_{p,brain} = AUC_{brain\ 20-30} / AUC_{plasma\ 20-30}$, considering the mean metabolite-corrected arterial input function. $K_{p,brain}$ were compared with a two-way ANOVA and a Tukey's post hoc test using Graphpad Prism software (V8.0, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Radiochemistry

Automated radiomethylation under standard conditions using the *O*-desmethyl precursor of metoclopramide afforded ready-to-inject [^{11}C]metoclopramide (1.9 ± 0.2 GBq) in $12\% \pm 3\%$ RCY within 40 min and with a MA of 88 ± 13 GBq/ μ mol ($n = 35$) (Figure 1A). Quality control revealed a chemical and RCP above 99%, making [^{11}C]metoclopramide suitable for in vivo injection in rats.

Automated radiocarbonylation under the SAW conditions developed by Del Vecchio et al. [25] afforded ready-to-inject [^{11}C]domperidone (5.9 ± 0.3 GBq) within 30 min in $47 \pm 4\%$ RCY and 85 ± 15 GBq/ μ mol MA ($n = 12$) (Figure 1B). Quality control revealed a chemical and RCP above 99%, making [^{11}C]domperidone suitable for in vivo injection in rats.

3.2. In Vitro Experiments

The in vitro P-gp inhibitory potency of TQD was tested in P-gp-overexpressing cells using [^{11}C]domperidone as substrate probes. The fitted concentration-inhibition curves for each radiotracer are shown in Figure 2. The estimated IC_{50} of TQD was 221 nM (198–248 nM) for [^{11}C]domperidone compared to 4 nM (2–8 nM) for [^{11}C]metoclopramide. The $\text{CI}_{95\%}$ of the IC_{50} values of the two tested substrates did not overlap, suggesting that each substrate's sensibility to P-gp inhibition was significantly different (Figure 2). Mean uptake ratios were 2.6 ± 0.12 for [^{11}C]domperidone. For comparison, the uptake ratio for [^{11}C]metoclopramide was 1.4 ± 0.07 [24].

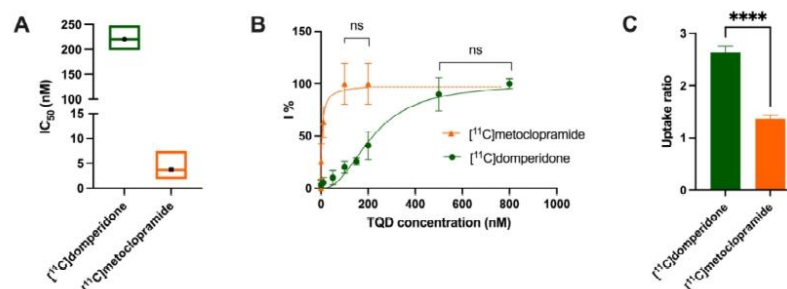


Figure 2. In vitro transport data. Comparison of the in vitro half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}) (A) and uptake ratio (C) of [^{11}C]domperidone and [^{11}C]metoclopramide assessed using increasing doses of tariquidar (TQD) in MDCKII-MDR1 cells. In (B), concentration-inhibition curves (I%, extent of inhibition in percent) are shown. In (A), data are shown as mean \pm $\text{CI}_{95\%}$ (95% confidence interval) with $n = 4$ per condition. In (B,C), data are shown as mean \pm S.D with $n = 4$ per condition. Lines in (B) represent fits of the employed Hill model. **** $p < 0.0001$, ns = non-significant (t -test for comparison).

3.3. PET Imaging Experiments

Under the baseline conditions, the [^{11}C]domperidone PET signal in the rat brain was lower than in surrounding tissues (Figure 3). The brain TACs are represented in Figure 4. The brain area under the curve between 0 and 30 min ($\text{AUC}_{\text{brain};0-30}$) was $3.98 \pm 0.13 \text{ SUV} \cdot \text{min}$. To allow for comparison of the impact of P-gp inhibition on the brain kinetics of [^{11}C]domperidone with [^{11}C]metoclopramide PET data, the $\text{AUC}_{\text{brain};0-30}$ of [^{11}C]domperidone after 8 mg/kg of TQD injection (same TQD dose as [^{11}C]metoclopramide data) was analyzed in one rat and showed no substantial increase compared to the baseline condition ($\text{AUC}_{\text{brain};0-30} = 4.9 \text{ SUV} \cdot \text{min}$). It was then decided to increase the TQD dose to 15 mg/kg to achieve a higher level of P-gp inhibition. However, this dose did not either increase the [^{11}C]domperidone brain exposure compared with baseline, which was confirmed using four animals ($\text{AUC}_{\text{brain};0-30} = 4.6 \pm 0.07 \text{ SUV} \cdot \text{min}$, $p < 0.05$, $n = 4$) (Figure 5).

Arterial input function and metabolism were estimated in two additional rats (Figures 4 and 5). [^{11}C]domperidone metabolism was slower than for [^{11}C]metoclopramide. TQD did not impact the fraction of parent (unmetabolized) [^{11}C]domperidone. This was also observed for [^{11}C]metoclopramide [21] (Figure 5).

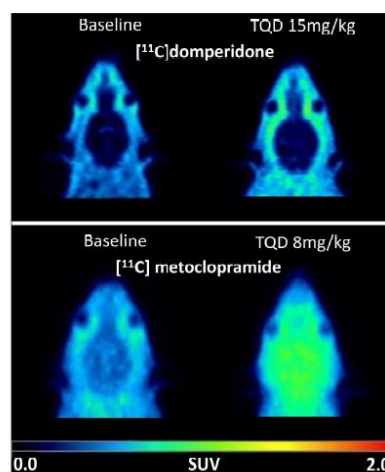


Figure 3. PET images were obtained with $[^{11}\text{C}]\text{domperidone}$ and $[^{11}\text{C}]\text{metoclopramide}$ after selected doses of the P-gp inhibitor tariquidar (TQD). Representative PET images are summed from 0 to 30 min and were obtained at baseline and after P-gp inhibition (8 mg/kg TQD for $[^{11}\text{C}]\text{metoclopramide}$ and 15 mg/kg TQD for $[^{11}\text{C}]\text{domperidone}$).

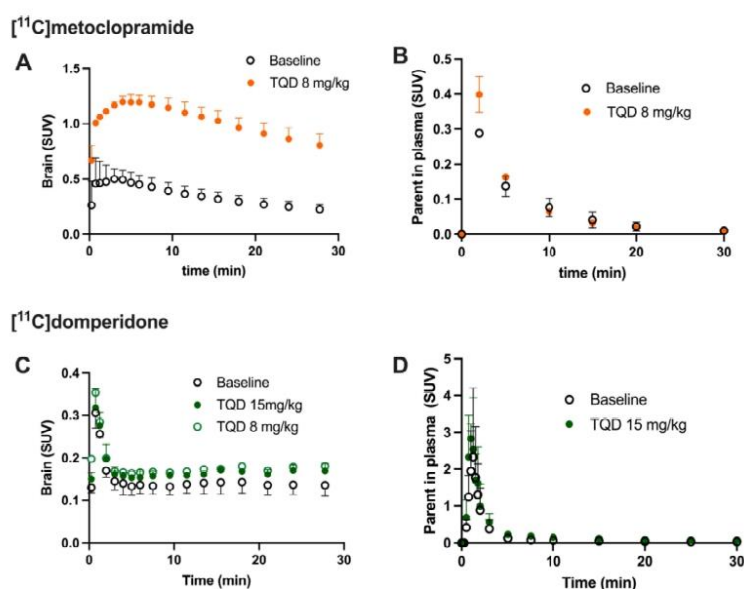


Figure 4. Impact of P-gp inhibition of the brain kinetics of $[^{11}\text{C}]\text{domperidone}$ compared to $[^{11}\text{C}]\text{metoclopramide}$. Time-activity curves (TAC) were obtained with $[^{11}\text{C}]\text{metoclopramide}$ (A,B) and $[^{11}\text{C}]\text{domperidone}$ (C,D) in the absence and presence of P-gp inhibitor tariquidar (TQD). (A,C) present the raw data in the brain, while (B,D) are the corresponding plasma TAC curves corrected from metabolism exposures. Data are reported as mean \pm S.D with $n = 4$ per brain condition and $n = 2$ per plasma condition.

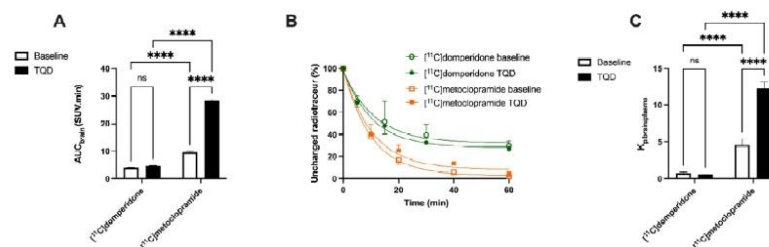


Figure 5. Impact of P-gp inhibition of brain exposure and metabolism of $[^{11}\text{C}]$ domperidone compared to $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide. In (A), brain exposures were obtained with $[^{11}\text{C}]$ domperidone and $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide ($\text{AUC}_{\text{brain}}$) in the presence and absence of P-gp inhibitor tariquidar (TQD). In (B), respective parent fraction in plasma of radiotracer in same conditions. In (C), the corresponding $K_{p,\text{brain/plasma}}$ are shown. Data are reported as mean \pm S.D with $n = 4$ per condition. **** $p < 0.0001$, ns = non-significant (two-way ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparison).

Validation of a compartmental model or a graphical approach to describe the BBB penetration of $[^{11}\text{C}]$ domperidone did not provide reliable results. We, therefore, used the $K_{p,\text{brain}}$ parameter, which describes the brain/plasma ratio. Baseline $K_{p,\text{brain}}$ of $[^{11}\text{C}]$ domperidone was estimated at 2.46 ± 0.42 and was not statistically different with $K_{p,\text{brain}}$ estimated at 1.42 ± 0.11 in the presence of P-gp inhibition. For comparison, the $K_{p,\text{brain}}$ of $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide in absence ($K_{p,\text{brain}} = 10.12 \pm 2.01$) and the presence ($K_{p,\text{brain}} = 46.96 \pm 5.52$) of P-gp inhibition were calculated. For baseline condition, the $K_{p,\text{brain}}$ was statistically higher for $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide than for $[^{11}\text{C}]$ domperidone ($p < 0.05$). P-gp inhibition significantly increased the $K_{p,\text{brain}}$ of $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide ($p < 0.001$) but did not increase the $K_{p,\text{brain}}$ of $[^{11}\text{C}]$ domperidone ($p > 0.05$) (Figure 5).

4. Discussion

PET imaging using isotopically radiolabeled drugs provides a unique method to compare their transporter-mediated brain kinetics in vivo, with translational perspectives [29]. In the present study, domperidone was radiolabeled with carbon-11 to estimate its BBB penetration in rats. Domperidone is considered an avid substrate of the P-gp [9] and may be viewed as an alternative probe to estimate the P-gp function at the BBB. The impact of P-gp inhibition on the P-gp-mediated transport of domperidone was first tested in vitro. Relevance for in vivo neuropharmacokinetics was then assessed in vivo using PET. $[^{11}\text{C}]$ domperidone PET data could then be compared with those of $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide, which belongs to the same pharmacological class and is considered a weak substrate of the P-gp at the BBB [21].

Because metoclopramide bears a methyl group on a phenol moiety, it is a candidate for carbon-11 isotopic labeling by radiomethylation, the most standard approach to incorporate this radioisotope [30]. Radiomethylation was performed using $[^{11}\text{C}]$ methyl triflate, which afforded better yields than $[^{11}\text{C}]$ methyl iodide within shorter reaction times (2 min for $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ versus 5 min for $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$). Sodium hydroxide appeared to be the best base to perform this radiomethylation [26]. Although other solvents with higher boiling points than acetone, such as butanone, can be used to radiolabel $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide [31], yields are comparable, and acetone offers a strong solubility power regarding the desmethyl precursor. Compared with $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide, isotopic radiolabeling of domperidone with carbon-11 brings a real challenge. Domperidone does not offer a position for methylation, and an alternative strategy had to be developed. Domperidone displays two cyclic urea moieties, which could be radiolabeled with $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ through carbonylation reactions either using phosgene [32], phosphazene derivatives [33], or carbon monoxide [34]. However, these methods use very reactive chemical agents and/or harsh conditions incompatible with fully functionalized molecules such as drugs. As a result, these methods were never applied

to the synthesis of radiotracers for in vivo PET imaging purposes. The orthogonal SAW approach enables the isotopic radiolabeling of domperidone, among other functionalized molecules, in high yields and purity [25]. Moreover, this radiosynthesis strategy could be automated, leading to the reproducible production of [^{11}C]domperidone suitable for in vivo injection in rats.

From a translational perspective, the molar activity of ready-to-inject [^{11}C]domperidone allows for the injection of <100 μg of unlabeled domperidone for a classical dose of 370 MBq. This suggests that [^{11}C]domperidone may be further used in humans according to the PET microdosing guidelines [35]. Moreover, preclinical data obtained in rodents showed linear pharmacokinetics, suggesting that a microdose of [^{11}C]domperidone may predict the pharmacokinetics of the pharmacological dose of domperidone [36].

Brain PET images obtained after injection of [^{11}C]domperidone in rats revealed its extremely low brain uptake compared with surrounding tissues, suggesting limited passage across the BBB. Baseline uptake (AUC) of [^{11}C]domperidone was 2.5-fold lower ($p < 0.0001$) than the uptake of [^{11}C]metoclopramide obtained in the same species and under the same conditions. However, brain PET kinetics have to be interpreted in the light of peripheral kinetics to correctly estimate the passage of radiolabeled compounds across the BBB [37]. [^{11}C]Domperidone was slowly metabolized compared with [^{11}C]metoclopramide. Indeed, parent (unmetabolized) [^{11}C]domperidone accounted for more than >30% in plasma at 60 min post-injection, while parent [^{11}C]metoclopramide could hardly be detected at this time. Interestingly, metabolites of domperidone and domperidone itself were shown to poorly cross the BBB in rats using ex vivo determination [36].

Determination of the arterial input function of [^{11}C]domperidone was used to allow for kinetic modeling of the brain penetration across the BBB. However, poor estimation of kinetic parameters was obtained (data not shown). This may be linked with the negligible brain penetration of [^{11}C]domperidone. Moreover, it is challenging to perform arterial blood sampling in rats during PET acquisition, and different animals were used for PET imaging and determining the arterial input function, respectively. This may complicate the kinetic modeling, especially in organs with poor uptake and rapid peak, such as the brain. Therefore, the brain penetration of [^{11}C]domperidone was estimated in a model-independent manner. $K_{p,\text{brain}}$ of [^{11}C]domperidone was 2.46 ± 0.42 . This is 4-fold lower than the K_p of [^{11}C]metoclopramide, confirming a higher BBB passage for metoclopramide when P-gp is fully functional.

Then the importance of P-gp function at the BBB on the brain kinetics of [^{11}C]domperidone was tested. First, the P-gp-mediated transport of [^{11}C]domperidone was tested in vitro using human MDR1 gene-transfected cells. The maximal response to inhibition using TQD was 2-fold higher for domperidone compared with metoclopramide. Using a standardized method, this confirmed that domperidone is a more avid substrate of the P-gp than metoclopramide. Interestingly, testing an extensive range of concentrations of TQD, we show that high concentrations of TQD are needed to achieve maximal inhibition of P-gp in vitro. Indeed, the IC_{50} of TQD using [^{11}C]domperidone as a substrate probe was 221 nM, whereas it was 4 nM when using [^{11}C]metoclopramide as a probe. This IC_{50} value can be directly compared with other PET probes such as [^{11}C]verapamil (45 nM) and [^{11}C]N-desmethyloperamide (19 nM), estimated using the same experimental conditions [24]. This suggests that domperidone is refractory to P-gp inhibition in vitro and consequently that inhibition of the P-gp-mediated transport of domperidone may be challenging to achieve in vivo.

Consistently, the maximal dose of TQD used for the [^{11}C]metoclopramide study (8 mg/kg) did not impact the brain kinetics and BBB penetration of [^{11}C]domperidone in rats ($n = 1$). A higher dose was therefore tested (15 mg/kg, $n = 4$) and did not either enhance the brain penetration of [^{11}C]domperidone in vivo ($p > 0.05$). Using in situ brain perfusion, Dagenais and colleagues reported a 3.1-fold higher passage of domperidone in P-gp-deficient mice than in wild-type animals [38]. Moreover, a massive dose of the P-gp inhibitor cyclosporine (2.5 μM in brain perfusion) increased the brain penetration of [^{11}C]domperidone by 1.87-fold in mice, which enhanced the catalepsy induced by a

pharmacological dose of domperidone [19]. Although species differences in the P-gp-mediated substrates between mice and rats may occur [39], it is likely that the high dose of TQD administered in our study was insufficient to achieve complete inhibition of the P-gp-mediated transport of domperidone in rats.

An explanation for how P-gp can maintain the interaction with domperidone after blocked activity by TQD is the interaction of domperidone with a different binding site of P-gp than TQD. However, TQD seems to have an action on the P-gp conformation and the ATPase activity [40] in a fixation site-independent manner even if a binding site interaction cannot be totally excluded without further investigations [41]. Another possibility is the interaction of domperidone with other efflux transporters at the BBB other than P-gp.

From a clinical perspective, complete P-gp inhibition leading to the situation of knock-out animals is rarely achieved [42]. This especially holds for domperidone, which behaves as an inhibition-refractory substrate compared with metoclopramide or other substrates [24]. This suggests that domperidone shows a limited passage across the BBB compared with metoclopramide. Moreover, our *in vitro* assay using cells expressing the human P-gp and *in vivo* PET experiments performed in rats suggest that inhibition of the P-gp mediated transport of domperidone at the BBB is very unlikely. This supports the use of domperidone for pathological conditions where CNS effects of D2 antagonists have to be avoided, such as the prevention of emesis induced by DOPA therapy. Moreover, our study does not support a risk for DDIs involving P-gp at the BBB between domperidone and co-administered drugs.

5. Conclusions

From an imaging perspective, [^{11}C]domperidone was initially evaluated as an avid substrate probe for PET imaging of P-gp function at the BBB. However, [^{11}C]domperidone is poorly sensitive to changes in P-gp function induced by TQD, a potent and clinically validated inhibitor of P-gp at the BBB. [^{11}C]domperidone is therefore not a suitable radiotracer to assess the importance of P-gp activity at the BBB.

From a neuropharmacology perspective, the direct comparison of the brain kinetics of [^{11}C]domperidone and [^{11}C]metoclopramide illustrates the potential of PET to evaluate the cerebral passage of two molecules of the same family, which could be extended to two drug candidates with a phase 0 design considering the inter-species differences.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14081658/s1>, Figure S1: Reverse-phase semi-preparative HPLC purification of [^{11}C]metoclopramide. UV chromatogram at $\lambda = 220$ nm; Gamma chromatogram (B); Figure S2: Reverse-phase semi-preparative HPLC purification of [^{11}C]domperidone. UV chromatogram at $\lambda = 280$ nm (A); Gamma chromatogram (B); Figure S3: Quality control of [^{11}C]metoclopramide by reverse-phase analytical HPLC. UV chromatogram at $\lambda = 274$ nm (A); Gamma chromatogram (B); Figure S4: Quality control of [^{11}C]domperidone by reverse-phase analytical HPLC. UV chromatogram at $\lambda = 285$ nm (A); Gamma chromatogram (B).

Author Contributions: N.T. and F.C. designed the research; S.G., M.G., D.A., A.D.V., A.S., S.M. and W.S. performed the research; S.G. and L.B. analyzed the data; N.T., F.C. and L.B. drafted the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Louise Breuil received funding from the joined AP-HP/CEA grant. This work was performed on a platform partially funded by the France Life Imaging network (grant ANR-11-INBS-0006); Antonio Del Vecchio fellowship was funded by a Marie Skłodowska-Curie grant agreement No.675071.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by an Ethics Committee of CETA n°44 (protocol code APAFIS#746620161104 17049220 v2 approved the 12 April 2017).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are freely available upon request to the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Arnaud Chevalier and Alex Talbot for helpful assistance in the synthesis of domperidone's precursors and transportation for helpful technical assistance.

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

References

- Patterson, D.; Abell, T.; Rothstein, R.; Koch, K.; Barnett, J. A Double-Blind Multicenter Comparison of Domperidone and Metoclopramide in the Treatment of Diabetic Patients with Symptoms of Gastroparesis. *Am. J. Gastroenterol.* **1999**, *94*, 1230–1234. [CrossRef] [PubMed]
- FDA Center for Drug Evaluation Inhousepharmacy.vu-620327-05/04/2022. Available online: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/warning-letters/inhousepharmacyvu-620327-05042022> (accessed on 17 June 2022).
- Ganzini, L.; Casey, D.E.; Hoffman, W.F.; McCall, A.L. The Prevalence of Metoclopramide-Induced Tardive Dyskinesia and Acute Extrapyramidal Movement Disorders. *Arch. Intern. Med.* **1993**, *153*, 1469–1475. [CrossRef] [PubMed]
- FDA Center for Drug Evaluation and How to Request Domperidone for Expanded Access Use. FDA. 2021. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/investigational-new-drug-ind-application/how-request-domperidone-expanded-access-use> (accessed on 6 July 2022).
- FDA Office of the Commissioner Safety Information-Reglan (Metoclopramide) Tablets, ODT (Orally Disintegrating Tablets), and Injection. Available online: <http://wayback.archive-it.org/7993/20161022205258/http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/ucm170934.htm> (accessed on 27 June 2022).
- EMA Domperidone-Containing Medicines. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/domperidone-containing-medicines> (accessed on 30 June 2022).
- Nicolaï, J.; Chapy, H.; Gillent, E.; Saunders, K.; Ungell, A.-L.; Nicolas, J.-M.; Chanteux, H. Impact of In Vitro Passive Permeability in a P-Gp-Transfected LLC-PK1 Model on the Prediction of the Rat and Human Unbound Brain-to-Plasma Concentration Ratio. *Pharm. Res.* **2020**, *37*, 175. [CrossRef] [PubMed]
- Abbott, N.J. Blood–Brain Barrier Structure and Function and the Challenges for CNS Drug Delivery. *J. Inher. Metab. Dis.* **2013**, *36*, 437–449. [CrossRef] [PubMed]
- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; Mol, C.A.; van Deemter, L. P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier of Mice Influences the Brain Penetration and Pharmacological Activity of Many Drugs. *J. Clin. Investig.* **1996**, *97*, 2517–2524. [CrossRef] [PubMed]
- Feng, B.; Mills, J.B.; Davidson, R.E.; Mireles, R.J.; Janiszewski, J.S.; Troutman, M.D.; de Moraes, S.M. 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.* **2008**, *36*, 268–275. [CrossRef] [PubMed]
- Jolliet, P.; Nion, S.; Allain-Veyrac, G.; Tilloy-Fenart, L.; Vanuxeem, D.; Berezowski, V.; Cecchelli, R. Evidence of Lowest Brain Penetration of an Antiemetic Drug, Metopimazine, Compared to Domperidone, Metoclopramide and Chlorpromazine, Using an in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Pharmacol. Res.* **2007**, *56*, 11–17. [CrossRef]
- Tsinman, O.; Tsinman, K.; Sun, N.; Avdeef, A. Physicochemical Selectivity of the BBB Microenvironment Governing Passive Diffusion—Matching with a Porcine Brain Lipid Extract Artificial Membrane Permeability Model. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 337–363. [CrossRef]
- Mahar Doan, K.M.; Humphreys, J.E.; Webster, L.O.; Wring, S.A.; Shampine, L.J.; Serabjit-Singh, C.J.; Adkison, K.K.; Polli, J.W. Passive Permeability and P-Glycoprotein-Mediated Efflux Differentiate Central Nervous System (CNS) and Non-CNS Marketed Drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *303*, 1029–1037. [CrossRef]
- Faassen, F.; Vogel, G.; Spanings, H.; Vromans, H. Caco-2 Permeability, P-Glycoprotein Transport Ratios and Brain Penetration of Heterocyclic Drugs. *Int. J. Pharm.* **2003**, *263*, 113–122. [CrossRef]
- Doran, A.C.; Osgood, S.M.; Mancuso, J.Y.; Shaffer, C.L. An Evaluation of Using Rat-Derived Single-Dose Neuropharmacokinetic Parameters to Project Accurately Large Animal Unbound Brain Drug Concentrations. *Drug Metab. Dispos.* **2012**, *40*, 2162–2173. [CrossRef]
- Watanabe, R.; Esaki, T.; Ohashi, R.; Kuroda, M.; Kawashima, H.; Komura, H.; Natsume-Kitatani, Y.; Mizuguchi, K. Development of an In Silico Prediction Model for P-Glycoprotein Efflux Potential in Brain Capillary Endothelial Cells toward the Prediction of Brain Penetration. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 2725–2738. [CrossRef]
- Doran, A.; Obach, R.S.; Smith, B.J.; Hosea, N.A.; Becker, S.; Callegari, E.; Chen, C.; Chen, X.; Choo, E.; Cianfroga, J.; et al. The Impact of P-Glycoprotein on the Disposition of Drugs Targeted for Indications of the Central Nervous System: Evaluation Using the MDR1A/1B Knockout Mouse Model. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2005**, *33*, 165–174. [CrossRef]
- Athukuri, B.L.; Neerati, P. Enhanced Oral Bioavailability of Domperidone with Piperine in Male Wistar Rats: Involvement of CYP3A1 and P-Gp Inhibition. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* **2017**, *20*, 28–37. [CrossRef]
- Tsujikawa, K.; Dan, Y.; Nogawa, K.; Sato, H.; Yamada, Y.; Murakami, H.; Ohtani, H.; Sawada, Y.; Iga, T. Potentiation of Domperidone-Induced Catalepsy by a P-Glycoprotein Inhibitor, Cyclosporin A. *Biopharm. Drug Dispos.* **2003**, *24*, 105–114. [CrossRef]

20. Kalvass, J.C.; Polli, J.W.; Bourdet, D.L.; Feng, B.; Huang, S.-M.; Liu, X.; Smith, Q.R.; Zhang, L.K.; Zamek-Gliszczynski, M.J. Why Clinical Modulation of Efflux Transport at the Human Blood–Brain Barrier Is Unlikely: The ITC Evidence-Based Position. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *94*, 80–94. [\[CrossRef\]](#)
21. Pottier, G.; Marie, S.; Goutal, S.; Auvity, S.; Peyronneau, M.-A.; Stute, S.; Boisgard, R.; Dollé, F.; Buvat, I.; Caillé, F.; et al. Imaging the Impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) Function on the Brain Kinetics of Metoclopramide. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 309–314. [\[CrossRef\]](#)
22. Bauer, M.; Tournier, N.; Langer, O. Imaging P-Glycoprotein Function at the Blood–Brain Barrier as a Determinant of the Variability in Response to Central Nervous System Drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2019**, *105*, 1061–1064. [\[CrossRef\]](#)
23. Auvity, S.; Caillé, F.; Marie, S.; Wimberley, C.; Bauer, M.; Langer, O.; Buvat, I.; Goutal, S.; Tournier, N. P-Glycoprotein (ABCB1) Inhibits the Influx and Increases the Efflux of ¹¹C-Metoclopramide Across the Blood–Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1609–1615. [\[CrossRef\]](#)
24. Breuil, L.; Marie, S.; Goutal, S.; Auvity, S.; Truillet, C.; Saba, W.; Langer, O.; Caillé, F.; Tournier, N. Comparative Vulnerability of PET Radioligands to Partial Inhibition of P-Glycoprotein at the Blood–Brain Barrier: A Criterion of Choice? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2022**, *42*, 175–185. [\[CrossRef\]](#)
25. Del Vecchio, A.; Caillé, F.; Chevalier, A.; Loreau, O.; Horkka, K.; Halldin, C.; Schou, M.; Camus, N.; Kessler, P.; Kuhnast, B.; et al. Late-Stage Isotopic Carbon Labeling of Pharmaceutically Relevant Cyclic Ureas Directly from CO₂. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *57*, 9744–9748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Caillé, F.; Goutal, S.; Marie, S.; Auvity, S.; Cisternino, S.; Kuhnast, B.; Pottier, G.; Tournier, N. Positron Emission Tomography Imaging Reveals an Importance of Saturable Liver Uptake Transport for the Pharmacokinetics of Metoclopramide. *Contrast Media Mol. Imaging* **2018**, *2018*, 7310146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Larsen, P.; Ulin, J.; Dahlström, K.; Jensen, M. Synthesis of [¹¹C]Iodomethane by Iodination of [¹¹C]Methane. *Appl. Radiat. Isot.* **1997**, *48*, 153–157. [\[CrossRef\]](#)
28. Jewett, D.M. A Simple Synthesis of [¹¹C]Methyl Triflate. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. A* **1992**, *43*, 1383–1385. [\[CrossRef\]](#)
29. Tournier, N.; Stieger, B.; Langer, O. Imaging Techniques to Study Drug Transporter Function in Vivo. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *189*, 104–122. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Tu, Z.; Mach, R.H. C-11 Radiochemistry in Cancer Imaging Applications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1060–1095. [\[CrossRef\]](#)
31. Pichler, V.; Ozenil, M.; Bamming, K.; Vranka, C.; Hacker, M.; Langer, O.; Wadsak, W. Pitfalls and Solutions of the Fully-Automated Radiosynthesis of [¹¹C]Metoclopramide. *EJNMMI Radiopharm. Chem.* **2019**, *4*, 31. [\[CrossRef\]](#)
32. Labas, R.; Sobrio, F.; Bramoullé, Y.; Hérard, A.-S.; Guillermier, M.; Hantraye, P.; Dollé, F.; Barré, L. Radiosynthesis of N-[4-(4-Fluorobenzyl)Piperidin-1-Yl]-N'-(2-[(¹¹C]Oxo-1,3-Dihydrobenzimidazol-5-Yl)Oxamide, a NR2B-Selective NMDA Receptor Antagonist. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 63–67. [\[CrossRef\]](#)
33. Wilson, A.A.; Garcia, A.; Houle, S.; Sadovski, O.; Vasdev, N. Synthesis and Application of Isocyanates Radiolabeled with Carbon-11. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **2011**, *17*, 259–264. [\[CrossRef\]](#)
34. Kealey, S.; Husbards, S.M.; Bennacef, I.; Gee, A.D.; Passchier, J. Palladium-Mediated Oxidative Carbonylation Reactions for the Synthesis of ¹¹C-Radiolabelled Ureas. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57*, 202–208. [\[CrossRef\]](#)
35. Burt, T.; Young, G.; Lee, W.; Kusuhara, H.; Langer, O.; Rowland, M.; Sugiyama, Y. Phase 0/Microdosing Approaches: Time for Mainstream Application in Drug Development? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 801–818. [\[CrossRef\]](#)
36. Heykants, J.; Knaeps, A.; Meuldermans, W.; Michiels, M. On the Pharmacokinetics of Domperidone in Animals and Man. I. Plasma Levels of Domperidone in Rats and Dogs. Age Related Absorption and Passage through the Blood Brain Barrier in Rats. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1981**, *6*, 27–36. [\[CrossRef\]](#)
37. Pike, V.W. PET Radiotracers: Crossing the Blood–Brain Barrier and Surviving Metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 431–440. [\[CrossRef\]](#)
38. Dagenais, C.; Avdeef, A.; Tsinman, O.; Dudley, A.; Beliveau, R. P-Glycoprotein Deficient Mouse in Situ Blood–Brain Barrier Permeability and Its Prediction Using an Combo PAMPA Model. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2009**, *38*, 121–137. [\[CrossRef\]](#)
39. Chu, X.; Bleasby, K.; Evers, R. Species Differences in Drug Transporters and Implications for Translating Preclinical Findings to Humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2013**, *9*, 237–252. [\[CrossRef\]](#)
40. Loo, T.W.; Clarke, D.M. Tariquidar Inhibits P-Glycoprotein Drug Efflux but Activates ATPase Activity by Blocking Transition to an Open Conformation. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *92*, 558–566. [\[CrossRef\]](#)
41. Loo, T.W.; Clarke, D.M. Mapping the Binding Site of the Inhibitor Tariquidar That Stabilizes the First Transmembrane Domain of P-Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 29389–29401. [\[CrossRef\]](#)
42. Baudou, E.; Lespine, A.; Durrieu, G.; André, F.; Gandia, P.; Durand, C.; Cunat, S. Serious Ivermectin Toxicity and Human ABCB1 Nonsense Mutations. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 787–789. [\[CrossRef\]](#)



Letters

The Risk of P-Glycoprotein-Mediated Drug-Drug Interaction May Also Depend on The Vulnerability of The Victim Substrate to Partial Inhibition



Lazzaro and colleagues provided precious data comparing the outcome of different in vitro assays, performed in different laboratories, to determine the potency of a large panel of P-glycoprotein (P-gp) inhibitors. They used these data to estimate corresponding risk of drug-drug interactions (DDIs).¹ Interestingly, the authors aimed to identify the experimental factors driving discrepancies in IC₅₀ values obtained using the different assays, focusing on the properties of investigated inhibitors.

So far, only a few studies addressed the importance of classically used P-gp substrate probes on the determination of inhibitor's IC₅₀ using in vitro assay.² We recently conducted standardized in vitro uptake assays in MDCK-MDR1 cells to compare the sensitivity of different radiolabeled substrates as probes to detect P-gp inhibition mediated by a concentration range of tariquidar. We found dramatic differences in the IC₅₀ of tariquidar, estimated using either [¹¹C]metoclopramide (IC_{50,tariquidar} = 4 nM), [¹¹C]N-desmethyl-loperamide (19 nM), [¹¹C]verapamil (44 nM) or [¹¹C]domperidone (221 nM) as substrate probes for P-gp.^{3,4} Despite having the lowest efflux ratio, brain PET imaging in rats showed that [¹¹C]metoclopramide was the most sensitive probe, with significantly enhanced brain exposure in the presence of low level of P-gp inhibition at the blood-brain barrier. From a pharmacokinetic perspective, this suggests that the risk of P-gp-mediated DDIs may not exclusively depend on the potency and disposition of the P-gp inhibitor. In the presence of partial inhibition, which is likely to occur in the clinical situation, the "vulnerability" of substrate drugs to inhibition may also account for the impact of the DDI.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgement

Nicolas TOURNIER received funding from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE17-0027).

References

1. Lazzaro S, West MA, Eatemadpour S, et al. Translatability of in vitro inhibition potency to in vivo P-glycoprotein mediated drug interaction risk. *J Pharm Sci*. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.014>. Published online January 2020022-3549(23)00015-1.
2. Rautio J, Humphreys JE, Webster LO, et al. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(5):786–792. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008615>.
3. Breuil L, Marie S, Goutal S, et al. Comparative vulnerability of PET radioligands to partial inhibition of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: a criterion of choice? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2022;42(1):175–185. <https://doi.org/10.1177/0271678X211045444>.
4. Breuil L, Goutal S, Marie S, et al. Comparison of the blood-brain barrier transport and vulnerability to p-glycoprotein-mediated drug-drug interaction of domperidone versus metoclopramide assessed using in vitro assay and PET imaging. *Pharmaceutics*. 2022;14(8):1658. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081658>.

Louise Breuil

Solène Marie

Nicolas Tournier*

Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale (BioMaps), CEA, CNRS, Inserm, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Université Paris-Saclay, Orsay, France

*Corresponding author at: CEA/SHFJ 4 place du Général Leclerc, 91401 ORSAY.

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

Received 28 March 2023

Revised 29 March 2023

Accepted 29 March 2023

Available online 4 April 2023

8.2.5 Données complémentaires

8.2.5.1 Choix de la voie d'administration du tariquidar

Compte tenu de la cinétique plasmatique du tariquidar connue chez le rat, l'administration par injection intrapéritonéale (IP) a été dans un premier temps préférée à l'injection intraveineuse (IV) pour l'étude de la relation dose-effet du tariquidar sur la cinétique cérébrale du [¹¹C]métoclopramide. Ce choix initial avait pour objectif de maintenir une concentration plasmatique la plus stable possible pendant toute la durée d'acquisition des images afin d'entretenir un niveau d'inhibition de la P-gp constant et contrôlé (Matzneller et al. 2018). Un protocole impliquant des doses croissantes de tariquidar administrées par voie IP a donc d'abord été testé.

La solution de tariquidar injectable a été préparée à la concentration désirée comme décrite dans l'article 1. Deux heures avant l'injection du radiotraceur étudié, la solution de tariquidar a été injectée en IP sur animaux vigiles. Les doses administrées en IP ont été de 3, 5, 7, 8, 10, 15, 20 et 30 mg/kg. Un rat contrôle (pas d'inhibition de la P-gp) a reçu une injection IP de 300 µL d'une solution de glucose 2.5%.

Afin de comparer l'intérêt de la voie IP par rapport à la voie IV, la concentration plasmatique du tariquidar et la corrélation entre la dose injectée et la concentration plasmatique retrouvée a été testée à l'aide du coefficient de Spearman sur le logiciel GraphPad Prism. Le cas échéant, un test sur la pente et l'ordonnée à l'origine a été réalisé pour déterminer s'il s'agit d'une fonction linéaire. Pour que la relation soit linéaire, la pente de la droite doit être significativement différente de zéro (intervalle de confiance à 95% qui n'inclut pas la valeur zéro) et l'ordonnée à l'origine ne doit pas être significativement différente de zéro (intervalle de confiance à 95% qui inclut la valeur zéro).

La concentration plasmatique de tariquidar après injection par voie IV a été modélisée par une équation de Hill (équation 1) pour des doses injectées allant de 0 à 8 mg/kg de tariquidar.

$$\text{Concentration plasmatique en tariquidar} = E_{\max} + \frac{d^{\gamma}}{d^{\gamma} + Do^{\gamma}}$$

Equation 1 : modèle de la concentration plasmatique en fonction de la dose injectée par voie IV de tariquidar.

Avec E_{\max} la concentration atteinte pour la dose maximale de tariquidar injectée (8 mg/kg) par voie IV, Do la dose de tariquidar injectée qui permet d'atteindre la moitié de la concentration

maximale et γ le coefficient de Hill.

Avant l'utilisation de la voie IV décrite dans les articles 1 et 2 pour l'administration du tariquidar, 9 acquisitions TEP au $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide ont été obtenues avec différentes doses de tariquidar injecté en IP. Les cinétiques cérébrales du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide obtenues pour chaque dose sont représentées sur la Figure 24 A. De façon inattendue, il n'a pas été montré de relation entre l'exposition cérébrale du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide ($\text{AUC}_{10-30\text{min}}$) et la dose injectée en IP (Figure 24 B). Le dosage plasmatique du tariquidar a permis de montrer qu'il n'y avait pas non plus de corrélation (coefficient de Spearman = 0,43, non significatif, p-value = 0,25) entre la concentration plasmatique de tariquidar mesurée en fin d'acquisition TEP, et l'exposition cérébrale (Figure 24 C).

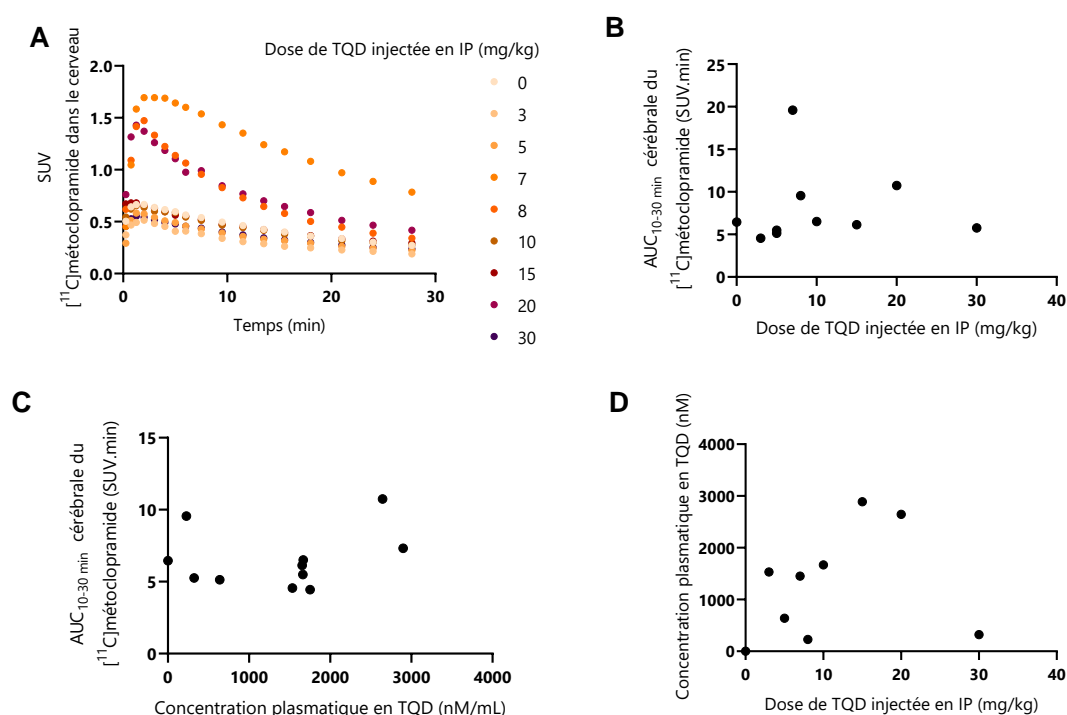


Figure 24 : Etude de l'injection intra péritonéale de tariquidar.

Sont représentées : en A, les TAC cérébrales du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide selon les doses IP de tariquidar (TQD) ; en B, l' $\text{AUC}_{10-30\text{min}}$ cérébrales du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide selon les doses IP de tariquidar ; en C, l' $\text{AUC}_{10-30\text{min}}$ cérébrale du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide selon la concentration plasmatique en tariquidar administré par voie IP et en D, les concentrations plasmatiques de tariquidar sont représentées selon les doses de tariquidar injectées en IP.

La dose de tariquidar IP injectée n'est pas non plus corrélée à la concentration retrouvée dans le plasma (Figure 24 D). Ainsi, la voie IP semble associée à une variabilité importante des concentrations plasmatiques et de l'effet inhibiteur de la P-gp. L'injection IP ne permet donc pas de contrôler l'exposition plasmatique au tariquidar et n'offre donc pas des conditions expérimentales standardisées. De plus, il n'y avait pas de relation évidente entre les doses injectées de tariquidar et l'AUC cérébrale du [^{11}C]métoclopramide (Figure 24 B). La mesure des concentrations plasmatiques en fin d'expérience n'a pas non plus permis de prendre en compte la variabilité cinétique du tariquidar après administration IP (Figure 24 C).

Suite aux résultats préliminaires obtenus avec l'injection IP du tariquidar, il a été décidé de recommencer les expériences TEP au [^{11}C]métoclopramide avec un protocole d'injection IV du tariquidar. Cette fois, les concentrations plasmatiques du tariquidar administré par voie IV (Figure 25) montrent une bonne corrélation avec la dose injectée. Le coefficient de Spearman est égal à 0,96 avec une p-value < 0,05 signifiant une corrélation monotone positive entre la dose injectée de tariquidar et la concentration plasmatique. Cependant cette relation n'est pas représentée par une fonction linéaire (Figure 25 B). La concentration plasmatique du tariquidar en fonction de la dose injectée a pu être modélisée par un modèle de Hill (Figure 25 C) pour des doses injectées allant jusqu'à 8 mg/kg de tariquidar, ce qui est évocateur d'une pharmacocinétique non-linéaire. Cette nouvelle observation renforce la nécessité de mesurer les concentrations plasmatiques du tariquidar pour en modéliser les effets en termes d'inhibition de la P-gp au niveau de la BHE. L'administration IV du tariquidar a donc été préférée pour l'étude décrite dans les articles 1 et 2.

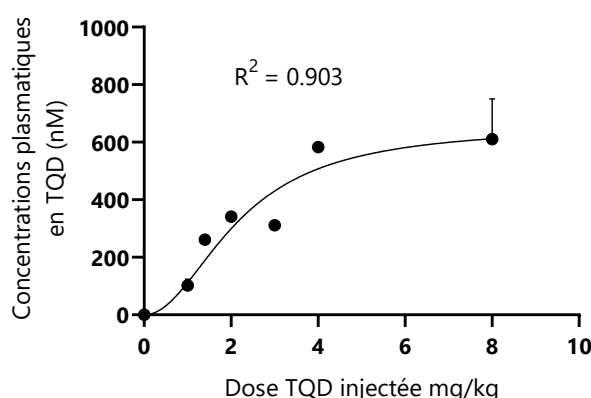


Figure 25 : Etude de l'injection par voie intraveineuse du tariquidar. Sont représentés, les concentrations plasmatiques en tariquidar (nM) en fonction de la dose injectée en IV (mg/kg) et le modèle non linéaire de Hill appliqué (ligne noire).

8.2.5.2 Etude avec un autre inhibiteur

En utilisant la même méthodologie que dans les articles 1 et 2, la sensibilité à l'inhibition des chaque radiotraceurs a pu être comparée vis-à-vis de la ciclosporine, un inhibiteur de la P-gp qui peut être utilisable chez l'Homme, dans un objectif translationnel (Tournier et al. 2019). En effet, il n'existe plus aujourd'hui de formulation de qualité pharmaceutique de tariquidar pour l'étude de la P-gp au niveau de la BHE chez l'Homme. Il faut noter que la ciclosporine ($IC_{50}=0.2\ \mu M$) est connue pour être un inhibiteur de la P-gp moins puissant que le tariquidar ($IC_{50}=0.016\ \mu M$) (Kalvass et al. 2013).

La ciclosporine a été testée *in vitro*. Il a alors pu être observé une toxicité cellulaire au-delà d'une certaine concentration d'inhibiteur ($25\ \mu M$). Aussi, les données *in vitro* suggèrent que l'inhibition maximale du transport du $[^{11}C]NdLop$ n'était pas atteinte à la concentration de $25\ \mu M$ si bien que le maximum d'inhibition du transport du $[^{11}C]NdLop$ n'a pas pu être atteint (Figure 26). Les concentrations inhibitrices 50% de la ciclosporine n'ont donc pas pu être estimées correctement pour l'ensemble des radiotraceurs. Néanmoins, la détermination de l'uptake ratio a permis de confirmer que la $[^{11}C]dompéridone$ et le $[^{11}C]NdLop$ sont de meilleurs substrats que le $[^{11}C]vérapamil$ et le $[^{11}C]métoclopramide$. Les ordres de grandeur de l'uptake ratio sont similaires à ceux obtenus avec le tariquidar, même si l'uptake ratio du $[^{11}C]NdLop$ est probablement sous-estimé (Figure 26).

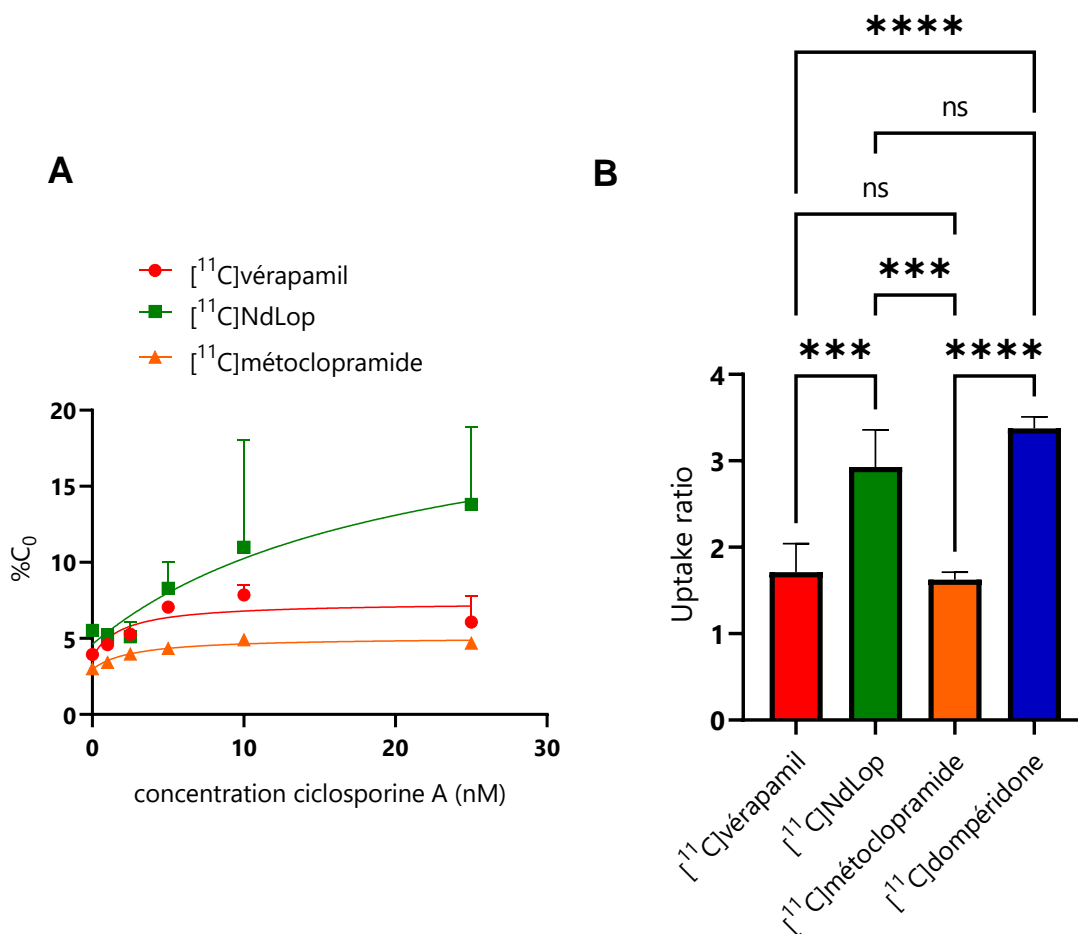


Figure 26 : Pénétration intracellulaire du $[^{11}\text{C}]$ vérapamil, $[^{11}\text{C}]$ N-desmethyl-lopéramide, $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide et $[^{11}\text{C}]$ dompéridone dans les cellules MDCKII-MDR1 en présence de doses croissantes de cyclosporine A.

En A, la pénétration intracellulaire est exprimée en pourcentage de radioactivité dans le lysat cellulaire par rapport au tampon d'incubation (%C₀). En B, les ratios de pénétration intracellulaires (uptake ratio) sont présentés par leur moyenne \pm écart-type ($n = 4$ par condition). **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ns = non significatif (test de ANOVA à un facteur avec test post-hoc de Tukey pour les comparaisons multiples).

Ces résultats complémentaires, obtenus en amont de l'étude principale, ont permis de conforter le choix du tariquidar par voie IV pour les études précliniques décrites dans l'Article 1 et l'Article 2.

8.2.6 Synthèse et perspectives

Le choix de l'inhibiteur et de sa voie d'administration a été décidé à partir de données préliminaires afin de proposer une approche *in vitro* et *in vivo* standardisée permettant de comparer les 3 radiotraceurs substrats de la P-gp utilisés chez l'Homme. Ainsi, il a été décidé d'utiliser le tariquidar en IV par rapport à l'injection IP chez le rat. En effet, l'administration IP n'a pas permis de contrôler suffisamment les concentrations plasmatiques de tariquidar et donc l'inhibition cérébrale de la P-gp. Par contre, l'injection IV a permis de montrer une relation effet/dose non-linéaire entre les doses injectées de tariquidar, ainsi qu'avec les concentrations plasmatiques atteintes. Ainsi, il a été possible de déterminer la concentration inhibitrice 50% *in vivo* du tariquidar vis-à-vis des 3 traceurs comparés.

L'absence de corrélation entre la dose administrée, l'effet inhibiteur, et la dose de tariquidar en IP reste difficile à expliquer. Les données publiées sur la cinétique du tariquidar suggèrent l'existence d'un plateau des concentrations 2 heures après injection (Matzneller et al. 2018). Il est possible que l'anesthésie réalisée pour la mesure de la cinétique chez le rat induise une différence par rapport à nos conditions, où le tariquidar IP était injecté chez l'animal éveillé. Nous n'avons pas pu mesurer la cinétique du tariquidar dans nos conditions expérimentales pour vérifier cette hypothèse.

Concernant le choix de l'inhibiteur, le tariquidar a été préféré à la ciclosporine. La ciclosporine, bien qu'elle soit utilisable en pratique clinique, présente une toxicité pour les cellules au-delà d'une certaine concentration (25 μM), ce qui n'a pas permis d'atteindre l'inhibition maximale de la P-gp pour tous les radiotraceurs. Il n'aurait donc pas été possible de réaliser une étude comparative *in vitro* complète avec la ciclosporine. Le tariquidar a donc été choisi, car il permet d'obtenir une inhibition maximale de la P-gp sans toxicité et d'atteindre un niveau d'inhibition maximal pour tous les radiotraceurs testés. Ainsi, la modélisation de la courbe effet/dose a pu être réalisée avec le tariquidar, pour l'ensemble des traceurs substrats utilisés. De plus, contrairement au tariquidar (Pottier et al. 2016), la ciclosporine est susceptible de modifier le métabolisme périphérique du [^{11}C]métoclopramide (Tournier et al. 2019) et du [^{11}C]vérapamil (Muzi et al. 2009). Ce paramètre aurait alors compliqué l'analyse et l'interprétation des données TEP *in vivo* chez le rat, en rendant indispensable l'acquisition de fonctions d'entrée artérielles corrigée des radiométabolites pour chacune des doses de ciclosporine, et pour chacun des radiotraceurs testés. De plus, l'absence d'effet du tariquidar sur le métabolisme des 3

radiotraceurs étudiés nous a permis d'utiliser un paramètre pharmacocinétique simple (aire sous la courbe), et commun pour tous les radiotraceurs, pour comparer leur passage cérébral et l'effet du tariquidar sur ce passage cérébral.

Ce travail a permis de faire émerger un nouveau critère pour l'évaluation et le développement de radiopharmaceutiques destinés à l'imagerie de la P-gp: la vulnérabilité du substrat vis-à-vis de l'inhibition. Ce paramètre peut être estimé par l'IC₅₀ du tariquidar vis-à-vis d'un radiotraceur donné (Breuil, Marie, et al. 2022). Notre comparaison *in vitro* et *in vivo* montre que ce critère conditionne en grande partie la sensibilité des radiotraceurs à détecter de faibles changements d'activité de la P-gp. Néanmoins, il ne peut être exclu une importance du choix de l'inhibiteur, le tariquidar, pour mesurer l'IC₅₀ et le classement des radiotraceurs en termes de sensibilité. Les données obtenues avec la ciclosporine, bien que moins complètes, confortent la meilleure sensibilité à l'inhibition du [¹¹C]métoclopramide par rapport au du [¹¹C]NdLop ou au [¹¹C]vérapamil. Des études préalables avaient déjà montré une sensibilité différente du [¹¹C]NdLop et du [¹¹C]vérapamil à une variations de l'activité de la P-gp. Pour cela, T. Wanek et ses collègues ont montré que le [¹¹C]vérapamil ou le [¹¹C]NdLop ne permettent pas de détecter une diminution d'expression de la P-gp de ~50%, chez des souris hétérozygote pour les gènes qui codent pour la P-gp (Mdr1a/1b^(+/-)) (Wanek et al. 2015). Depuis nos travaux, une étude menée par S. Mairinger et ses collègues (en révision) a montré que le [¹¹C]métoclopramide est capable de détecter la diminution d'expression de la P-gp chez ces mêmes souris hétérozygotes, confirmant ainsi la meilleure sensibilité du [¹¹C]métoclopramide, indépendamment de tout inhibiteur. Ces résultats sont particulièrement convaincants car il existe plusieurs sites de liaison des substrats et des inhibiteurs sur la P-gp (Martin et al. 2000). L'utilisation de souris hétérozygotes pour le gène de la P-gp permet donc de s'affranchir de ce paramètre mécanistique pour comparer la sensibilité des différents radiotraceurs à de faibles changement d'expression de la P-gp.

Depuis, le critère de sensibilité à l'inhibition a été utilisé pour évaluer le [¹⁸F]MC225, un radiotraceur fluoré développé pour l'imagerie de la P-gp au niveau de la BHE. Cette étude a permis de montrer la meilleure sensibilité du [¹⁸F]MC225 par rapport au [¹¹C]vérapamil (García-Varela, Vállez García, et al. 2021). Malheureusement, les protocoles d'administration du tariquidar sont très différents du nôtre (tariquidar IP, de 0.75 à 12 mg/kg, 120 min avant l'injection du radiotraceur). De plus, les concentrations de tariquidar au moment de l'imagerie n'ont pas été rap-

portées, ce qui ne permet pas de comparer la sensibilité du [^{18}F]MC225 à celle du [^{11}C]métoprolole. Enfin, compte-tenu des propriétés particulières du [^{11}C]vérapamil et du [^{18}F]MC225, les radiotraceurs ont été évalués en termes de K_1 (constante d'influx), ce qui ne donne qu'un aperçu partiel du rôle de la P-gp qui conditionne aussi l'efflux (k_2) du cerveau vers le sang (Pottier et al. 2016; Auvity et al. 2018; Tournier et al. 2019). Dans cet article, García-Varela et ses collègues suggèrent que le caractère de « faible substrat » du [^{18}F]MC225 conditionne une meilleure sensibilité du radiotraceur vis-à-vis de l'inhibition. Nos résultats, obtenus sur un panel plus large de radiotraceurs substrats de la P-gp, ne confirment pas cette hypothèse. En effet, le classement des ligands les plus sensibles *in vitro* n'est pas corrélé au classement des substrats les plus « faibles » (Figure 27). D'un point de vue mécanistique, la sensibilité à l'inhibition ou à la déplétion dépend à la fois de l' IC_{50} et du ratio d'efflux (ER). Ces paramètres pourraient être liés, plus ou moins directement, à l'affinité et à la réversibilité de fixation des traceurs pour les différents sites de liaison au transporteur. Aussi, une étude utilisant un plus grand nombre de substrats dans des conditions standardisée permettrait de définir les propriétés structurales des substrats enclins à une grande sensibilité à de faible changement d'activité de la P-gp.

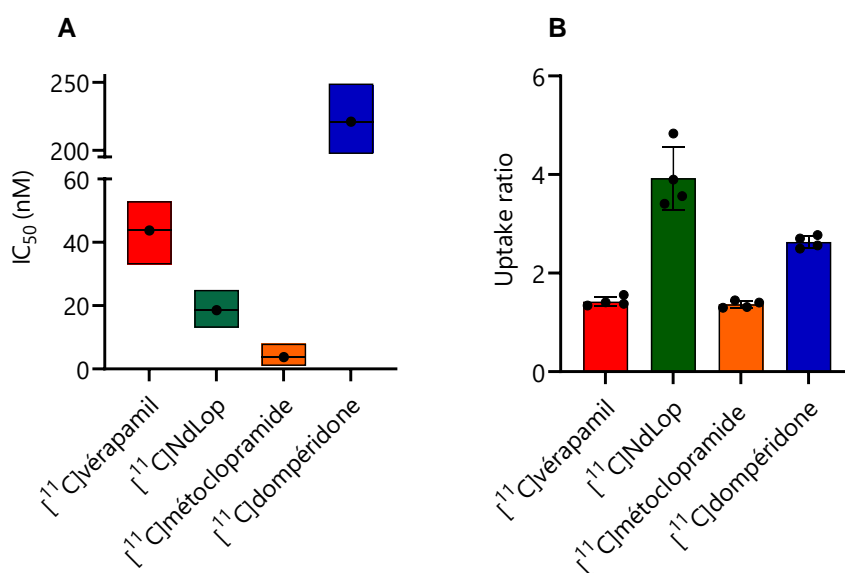


Figure 27 : Comparaison *in vitro* des radiopharmaceutiques pour l'étude de la fonction P-gp au niveau de la BHE.

En A, la concentration inhibitrice 50% *in vitro* (IC_{50}) est représentée par la moyenne avec l'intervalle de confiance à 95 % correspondant ($\text{IC}_{95\%}$), $n=4$ par condition. En B, la moyenne de l'absorption maximale pour chaque radiopharmaceutique est représentée avec l'écart type.

Nos résultats, destinés à optimiser l'imagerie TEP de la P-gp, peuvent avoir des implications en pharmacocinétique en apportant une meilleure compréhension des éléments qui conditionnent la puissance d'un inhibiteur de la P-gp. En effet, les articles 1 et 2 (Breuil, Goutal, et al. 2022) nous ont permis d'introduire le concept de « vulnérabilité » d'un substrat à l'inhibition, qui pourrait contribuer au risque d'interaction médicamenteuse impliquant un substrat et un inhibiteur donnés (Giacomini et al. 2010). D'une manière plus globale, nos travaux suggèrent qu'il est nécessaire de prendre en compte la spécificité du couple substrat/inhibiteur, et pas seulement la puissance d'un inhibiteur vis-à-vis d'un substrat de référence (généralement la digoxine selon les recommandations), afin d'estimer correctement le risque d'interaction médicamenteuse à partir de données de transport *in vitro*.

Dans un article publié récemment, S. Lazzaro et ses collègues ont identifié des facteurs de variabilité entre les différentes méthodes utilisées *in vitro* pour estimer la puissance des inhibiteurs de la P-gp et prédire ainsi le risque d'interaction médicamenteuse *in vivo* (Lazzaro et al. 2023). Parmi les méthodes comparées, certaines utilisaient indifféremment la digoxine comme substrat de la P-gp, et d'autres utilisaient la N-méthyl-quinidine. Les facteurs de variabilité identifiés par les auteurs concernaient seulement les modèles cellulaires ou vésiculaires utilisés, ainsi que les propriétés physico-chimiques des inhibiteurs testés. Sur la base de nos travaux, nous avons souhaité sensibiliser les lecteurs de cet article à la notion de vulnérabilité d'un substrat face à un inhibiteur de la P-gp, et de la nécessité de prendre en compte la sensibilité du substrat utilisé comme sonde pour estimer la puissance (IC_{50}) des inhibiteurs (Breuil et al. 2023).

En conclusion de cette première partie, le [^{11}C]métoclopramide présente des avantages par rapport au [^{11}C]vérapamil ou au [^{11}C]NdLop, qui ont déjà été utilisés dans plusieurs protocoles cliniques, notamment chez des patients atteints d'EPR (Feldmann M. et al. 2013; M. Bauer et al. 2014; Shin et al. 2016). Le [^{11}C]métoclopramide présente notamment un passage basal significatif permettant la détection de l'induction fonctionnelle de la P-gp, en un seul examen d'imagerie TEP. Aussi, le fait que ses radiométabolites ne traversent pas la BHE, comme cela a été montré chez le rat (Pottier et al. 2016), lui confère un avantage certain par rapport au [^{11}C]vérapamil pour quantifier le passage cérébral du radiotraceur. L'amplitude du signal cérébral entre une situation physiologique et une situation d'inhibition totale de la P-gp est certes moindre par rapport au [^{11}C]vérapamil et au [^{11}C]NdLop. Cependant, sa sensibilité à des modifications partielles de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE est plus importante, ce qui en

fait le radiotraceur le plus sensible pour une étude fonctionnelle et quantitative de la P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

8.3 PARTIE II : INFLUENCE DES COMEDICATIONS SUR L'UTILISATION DE L'IMAGERIE TEP AU [¹¹C]METOCLOPRAMIDE DANS L'ETUDE DE L'EPILEPSIE PHARMACO-RESISTANTE

8.3.1 Hypothèses et objectifs

L'imagerie par TEP utilisant le [¹¹C]métoclopramide, un substrat radiomarké de la P-gp, semble être une méthode peu invasive et translationnelle pour estimer la fonction de la P-gp au niveau cérébral, chez l'animal comme chez l'Homme (Pottier et al. 2016; Auvity et al. 2018; Tournier et al. 2019; Breuil, Marie, et al. 2022). En outre, le [¹¹C]métoclopramide permet de détecter une induction fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE (Zoufal et al. 2019) et pourrait donc présenter un intérêt pour étudier la contribution de la P-gp dans certaines situations physiopathologiques telles que l'épilepsie. Cependant, les patients atteints de maladies neurologiques sont fréquemment traités avec des médicaments qui peuvent être responsables d'interactions médicamenteuses par l'inhibition ou l'induction de l'activité de cytochromes P450 (CYPs). Une étude de A. Abraham et al en 2008 a constaté que le métabolisme du [¹¹C]vérapamil, un substrat du cytochrome CYP3A4, est plus important chez des patients épileptiques que chez les sujets témoins. Ils attribuent cette différence à l'induction hépatique des CYP par les médicaments antiépileptiques (Abraham et al. 2008). Les répercussions du métabolisme sur la quantification du passage du [¹¹C]vérapamil sont difficiles à anticiper et pourraient introduire un biais dans l'estimation de la fonction P-gp. Aussi, le développement de sondes P-gp métaboliquement stables ou moins sensibles à l'induction ou à l'inhibition enzymatique, constitue un objectif essentiel à l'utilisation de l'imagerie TEP pour l'imagerie de la P-gp (Kannan et al. 2013).

On peut donc faire l'hypothèse d'un impact des modulateurs enzymatiques sur la pharmacocinétique du [¹¹C]métoclopramide. L'importance d'une telle modulation sur l'estimation de la fonction de la P-gp au niveau de la BHE doit être étudiée afin d'anticiper un éventuel biais dans la quantification du passage cérébral de ce radiotraceur. C'est particulièrement le cas pour les patients souffrant d'EPR chez qui des inducteurs enzymatiques tels que la carbamazépine sont couramment prescrits. La présente étude visait à modéliser cette situation et le risque d'interaction entre inducteurs/inhibiteurs enzymatique et tester l'utilisation du [¹¹C]métoclopramide dans le protocole EPIFLUX. Dans cette étude préclinique réalisée chez le rat, nous avons étudié l'impact de la carbamazépine, un antiépileptique

largement prescrit et puissant inducteur enzymatique, et celui du ritonavir, un puissant inhibiteur des CYP450, sur le métabolisme et les cinétiques périphériques et cérébrales du [^{11}C]métoclopramide. Pour cela, des fonctions d'entrée artérielles ont été prélevées dans les différentes conditions et, en parallèle, des acquisitions dynamiques au [^{11}C]métoclopramide ont été réalisées. La modélisation pharmacocinétique des données a permis d'apprécier l'influence de ces puissants modulateurs des CYP sur l'estimation de la fonction P-gp par le [^{11}C]métoclopramide. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Pharmaceutics* (facteur d'impact=6.5).



Article

Impact of Cytochrome Induction or Inhibition on the Plasma and Brain Kinetics of [¹¹C]metoclopramide, a PET Probe for P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier

Louise Breuil¹, Nora Ziani¹, Sarah Leterrier¹, Gaëlle Hugon¹, Fabien Caillé¹, Viviane Bouilleret^{1,2}, Charles Truillet¹, Maud Goislard¹, Myriam El Biali³, Martin Bauer³, Oliver Langer^{3,4}, Sébastien Goutal¹ and Nicolas Tournier^{1,*}

¹ Laboratoire d'Imagerie Biomédicale Multimodale (BIOMAPS), Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Inserm, Service Hospitalier Frédéric Joliot, 4 Place du Général Leclerc, 91401 Orsay, France

² Neurophysiology and Epileptology Department, Bicêtre Hospital, AP-HP, University Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

³ Department of Clinical Pharmacology, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

⁴ Department of Biomedical Imaging and Image-Guided Therapy, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

* Correspondence: n.tournier@universite-paris-saclay.fr



Citation: Breuil, L.; Ziani, N.; Leterrier, S.; Hugon, G.; Caillé, F.; Bouilleret, V.; Truillet, C.; Goislard, M.; El Biali, M.; Bauer, M.; et al. Impact of Cytochrome Induction or Inhibition on the Plasma and Brain Kinetics of [¹¹C]metoclopramide, a PET Probe for P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2650. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122650>

Academic Editor: Im-Sook Song

Received: 11 November 2022

Accepted: 26 November 2022

Published: 30 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: [¹¹C]metoclopramide PET imaging provides a sensitive and translational tool to explore P-glycoprotein (P-gp) function at the blood-brain barrier (BBB). Patients with neurological diseases are often treated with cytochrome (CYP) modulators which may impact the plasma and brain kinetics of [¹¹C]metoclopramide. The impact of the CYP inducer carbamazepine or the CYP inhibitor ritonavir on the brain and plasma kinetics of [¹¹C]metoclopramide was investigated in rats. Data obtained in a control group were compared with groups that were either orally pretreated with carbamazepine (45 mg/kg twice a day for 7 days before PET) or ritonavir (20 mg/kg, 3 h before PET) ($n = 4$ per condition). Kinetic modelling was performed to estimate the brain penetration (V_T) of [¹¹C]metoclopramide. CYP induction or inhibition had negligible impact on the plasma kinetics and metabolism of [¹¹C]metoclopramide. Moreover, carbamazepine neither impacted the brain kinetics nor V_T of [¹¹C]metoclopramide ($p > 0.05$). However, ritonavir significantly increased V_T ($p < 0.001$), apparently behaving as an inhibitor of P-gp at the BBB. Our data suggest that treatment with potent CYP inducers such as carbamazepine does not bias the estimation of P-gp function at the BBB with [¹¹C]metoclopramide PET. This supports further use of [¹¹C]metoclopramide for studies in animals and patients treated with CYP inducers.

Keywords: ATP-binding cassette; drug–drug interaction; membrane transporter; neuropharmacology; pharmacokinetics

1. Introduction

P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) is the most studied efflux transporter expressed at the blood-brain barrier (BBB). P-gp is well-known to restrict the brain permeation of many xenobiotics, thus protecting the brain from potentially harmful substances and contributing to the sanctuary-site property of the brain [1]. P-gp may also modulate the brain distribution of many central nervous system (CNS)-active drugs, thus controlling the magnitude of their CNS effects [2,3]. Several endogenous compounds were shown to be transported substrates of P-gp, suggesting a physiological role whose importance is increasingly considered in the development of brain disorders [4]. As a consequence, P-gp function may be considered as a biomarker of BBB function which, in addition to the integrity of the BBB, may improve our understanding of the importance of the blood–brain interface in health and disease [5].

Translational methods are needed to investigate the function of P-gp at the BBB in animals and humans. Against this background, positron emission tomography (PET)

imaging using radiolabeled substrates of P-gp proved to be a minimally-invasive and effective method to measure P-gp function in the living brain. PET imaging proved useful to validate protocols to block P-gp function at the human BBB using pharmacological inhibitors such as cyclosporin A or tariquidar [6]. PET imaging using [^{11}C]verapamil as a P-gp substrate has been used to explore impaired P-gp function in aging [7–9] or in neurological disorders such as Alzheimer’s disease [10]. A [^{11}C]verapamil PET protocol in patients suffering from drug-resistant epilepsy showed attenuated response to tariquidar administration in the epileptogenic focus as compared with control subjects, suggesting locally enhanced P-gp function. This protocol required two consecutive PET acquisitions (without and with tariquidar administration) in the same subject [11].

Among available PET radioligands, [^{11}C]metoclopramide benefits from optimal kinetic properties for quantitative determination of P-gp function at the BBB. [^{11}C]metoclopramide is considered a “weak” substrate of P-gp, which means it shows substantial brain PET signal under conditions when P-gp is fully functional at the BBB [12,13]. As a consequence, [^{11}C]metoclopramide PET imaging can be used to detect either a decrease [14,15] or an increase [16] in P-gp function at the BBB using a single PET acquisition. [^{11}C]metoclopramide was shown to be selectively transported by P-gp over breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2), another important efflux transporter at the BBB [12]. Binding of [^{11}C]metoclopramide to brain parenchyma was not displaceable by co-injection of an excess of unlabeled metoclopramide, suggesting the absence of specific binding to any unintended CNS target and confirming the specificity of the PET signal for P-gp function [12,15]. Moreover, compared with other radiolabeled P-gp substrates, [^{11}C]metoclopramide was shown to be more sensitive to detect small changes in P-gp function associated with partial pharmacological P-gp inhibition [14,17]. This suggests that [^{11}C]metoclopramide may provide a sensitive tool to explore the dysregulation of P-gp function which is suspected to occur in many pathophysiological conditions [18].

Similar to many other PET tracers, [^{11}C]metoclopramide is metabolized into radiometabolite(s) whose contribution to the PET signal is difficult to distinguish from parent (unmetabolized) radiotracer in tissues [6,19]. The chemical identity of the radiometabolites of [^{11}C]metoclopramide is not known. However, radio-HPLC analysis of rat brain and plasma samples showed that the radiometabolites of [^{11}C]metoclopramide do not detectably cross the BBB. As a consequence, the PET signal in the brain predominantly consists in unchanged [^{11}C]metoclopramide, which enables accurate quantification of P-gp function at the BBB using this radioligand [12]. Nevertheless, it cannot be excluded that a change in the metabolism of [^{11}C]metoclopramide induced by disease state, genetic polymorphisms or drug-drug interactions (DDI) with modulators of cytochrome P450 (CYP) activity may impact the pharmacokinetics of [^{11}C]metoclopramide. For instance, patients with neurological diseases are frequently treated with drugs that may precipitate DDIs through inhibition or induction of CYP activity. This is particularly the case for patients with drug-resistant epilepsy, bipolar disorders or severe depression, in whom CYP inducers such as phenytoin or carbamazepine are commonly prescribed [20,21]. It is crucial, therefore, to anticipate this situation and avoid biased estimation of P-gp function at the BBB in patients treated with modulators of CYP activity.

In the present study, the impact of the CYP inducer carbamazepine (CBZ) and the potent and broad spectrum CYP inhibitor ritonavir (RIT) on the brain and plasma kinetics of [^{11}C]metoclopramide was investigated in rats. Kinetic modeling was performed to estimate the impact of these drugs on P-gp function at the BBB.

2. Materials and Methods

2.1. Treatments

CBZ (Tegretol® oral suspension 20 mg/mL, 200 mL per bottle) was purchased from Novartis pharma laboratory, Basel, Switzerland. In animals of the CBZ group ($n = 4$), CBZ suspension was administered by oral gavage at a dose of 45 mg/kg, twice a day (8 A.M and 5 P.M) for 7 days before the PET imaging. Each animal received a total of 14 doses of

CBZ before the PET experiment. Chronic administration of CBZ, at least 7 days, is required to induce multiple CYPs in rats [22,23].

RIT (Norvir® powder for oral suspension, 100 mg per bag) was purchased from AbbVie laboratory, North Chicago, IL, USA. A RIT suspension (10 mg/mL) was freshly prepared prior to oral administration by adding 100 mg of RIT powder to 9.4 mL of water for injection. Animals of the RIT group ($n = 4$) received a single dose of 20 mg/kg of RIT 3 hours before the PET experiment. This acute administration protocol was shown to be well-tolerated and to inhibit multiple CYPs in rats [24,25].

Data obtained in the CBZ and the RIT groups were compared with data obtained in drug-naïve animals (baseline, $n = 4$).

2.2. Radiochemistry

[¹¹C]metoclopramide was synthesized by automated radiomethylation using a TRACERlab® FX C Pro module (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and cyclotron-produced [¹¹C]CO₂ according to a method described in the literature [26]. [¹¹C]CO₂ (50–70 GBq) was produced on a cyclone 18/9 cyclotron (18 MeV, IBA, Ottignies-Louvain-la-Neuve, Belgium) via the ¹⁴N(p, α)¹¹C nuclear reaction by irradiation of an [¹⁴N]N₂ target containing 0.15–0.5% of O₂. [¹¹C]CO₂ was subsequently reduced to [¹¹C]CH₄ and iodinated to [¹¹C]CH₃I and finally converted into [¹¹C]methyl triflate ([¹¹C]CH₃OTf). [¹¹C]CH₃OTf was bubbled into a solution of *O*-desmethyl-metoclopramide (ABX advanced biochemical compounds, Radeberg, Germany, 1 mg) and aqueous sodium hydroxide (3 M, 7 µL) in acetone (400 µL) at –20 °C for 3 min. The mixture was heated at 110 °C for 2 min, then the residual solvent was evaporated to dryness at 110 °C under vacuum for 30 s. Under cooling to 60 °C, a mixture of aqueous NaH₂PO₄ (20 mM)/CH₃CN/H₃PO₄ (85/15/0.2 v/v/v) was added. Purification was realized by reversed phase high-performance liquid chromatography (HPLC, column: Waters Symmetry® C18 7.8 × 300 mm, 7 µm) with a 501 HPLC Pump (Waters, Milford, CT, USA) using aqueous NaH₂PO₄ (20 mM)/CH₃CN/H₃PO₄ (85/15/0.2 v/v/v, 5 mL/min) as eluent. UV detection (K2501, Knauer, Berlin, Germany) was performed at 220 nm. The product fraction was diluted with water (20 mL) and passed through a Sep-Pak® C18 cartridge (Waters, Milford, CT, USA). The cartridge was rinsed with water (10 mL) and eluted with ethanol (2 mL). The eluate was diluted with saline (0.9% w/v, 8 mL) to afford ready-to-inject [¹¹C]metoclopramide (1.9 ± 0.2 GBq) in 12 ± 3% radiochemical yield (RCY) within 40 min and with a molar activity (MA) of 88 ± 13 GBq/µmol at the end of bombardment (EOB) ($n = 35$).

2.3. Animals

Twenty-one Sprague Dawley rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were used for the study (mean weight: 277 ± 32 g). Animals were housed and acclimatized for at least 3 days before the experiments. Rats had free access to chow and water. All animal experiments were in accordance with the recommendations of the European Community (2010/63/UE) and the French National Committees (law 2013-118) for the care and use of laboratory animals. The experimental protocol was approved by a local ethics committee for animal use (CETEA) and by the French ministry of agriculture (APAFIS#746620161104 17049220 v2). The sample size for each group was based on previous studies with the aim to compare the brain distribution of another P-gp PET probe [27].

2.4. PET Acquisition

PET acquisitions were performed in Baseline, CBZ and RIT pretreated animals ($n = 4$ per condition) using an Inveon microPET scanner (Siemens, Knoxville, TN, USA). Anesthesia was induced and thereafter maintained using 3.5% and 1.5–2.5% isoflurane in O₂, respectively. Dynamic 30-min PET scans were acquired starting with intravenous bolus injection of [¹¹C]metoclopramide (34 ± 7 MBq, corresponding to 0.8 ± 0.2 µg of unlabeled metoclopramide via a catheter inserted in the caudal lateral vein).

2.5. Arterial Input Function

Repeated arterial blood sampling during PET acquisition is very challenging in rats. Arterial blood sampling, therefore, was conducted in separate groups of rats to measure the metabolism and arterial input function (AIF) of [^{11}C]metoclopramide without (baseline) and with pretreatment with CBZ or RIT ($n = 3$ for each condition).

Blood samples (50 μL) were collected at designated time points from the femoral artery. Plasma was separated from whole blood by centrifugation (5 min, 2054 g, 4 $^{\circ}\text{C}$) and 20 μL aliquots of plasma and whole blood were counted in a PET cross-calibrated gamma well counter (WIZARD2, PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France). Radioactivity concentrations were corrected for radioactive decay from the injection time to obtain the whole-blood and plasma curves of total radioactivity (metabolites and parent). In addition, larger arterial blood samples (200 μL) were collected at designated time points. From these samples, 80 μL plasma was deproteinized with acetonitrile. The supernatant was injected into a HPLC system, equipped with an Atlantis[®] T3 10 μm 10 \times 250 mm column (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with a LB-514 radioactivity flow detector (Berthold, France, MX Z100 cell). The mobile phase was composed of water with 0.1% of trifluoroacetic acid (A) and acetonitrile with 0.1% of trifluoroacetic acid (B) delivered in a gradient elution mode at a flow rate of 5 mL/min. Solvent B increased linearly from 20 to 30% from 0 to 11 min. The [^{11}C]metoclopramide parent fraction was calculated as a percentage of the total radioactivity (metabolites and parent).

For each animal, a 1-exponential decay function was fitted to the [^{11}C]metoclopramide parent fraction over time, which was multiplied with the total radioactivity plasma curve to obtain a metabolite-corrected AIF. The average metabolite-corrected AIF of 3 animals per group was used for kinetic modeling.

2.6. PET Data Analysis

Images were reconstructed with the Fourier rebinning algorithm and the 3-dimensional ordered-subset expectation-maximization algorithm, including normalization, attenuation, scatter, and random corrections. Image analysis was performed using PMOD software (version 3.9, PMOD Technologies LLC, Fällanden, Switzerland). The brain and the blood pool (i.e., from the left ventricle of the heart) were manually delineated, as previously described, to generate corresponding time–activity curves (TACs) [12]. Radioactivity was corrected for ^{11}C decay and expressed as standardized uptake value (SUV, unitless) after correction for injected dose and animal weight. SUV-normalized PET images were generated for visual comparison. Area under the brain curve between 0 and 30 min ($\text{AUC}_{\text{brain}}$) was calculated to estimate brain exposure to [^{11}C]metoclopramide.

Kinetic modeling was also performed using PMOD software. For each animal, the total volume of distribution (V_T) of [^{11}C]metoclopramide in the brain was first estimated with Logan plot analysis [12] using the average metabolite-corrected AIF obtained for each condition (baseline, CBZ or RIT). In addition, TACs obtained from the heart blood pool in each individual were used to generate an image-derived input function (IDIF). Each individual IDIF was corrected by a group-specific, average whole-blood/plasma radioactivity ratio which was obtained from the arterial blood samples collected in the separate groups of animals (see above). This ratio was 1.5 for the baseline group, 1.7 for the CBZ group and 1.6 for the RIT group. The IDIF was then corrected for radiometabolites using the corresponding parent [^{11}C]metoclopramide fraction measured in plasma in each condition in the separate groups of animals (see above) and used to calculate V_T .

Area under the plasma curve between 0 and 30 min was calculated using both methods (AUC_{AIF} , $n = 3$ per condition, and AUC_{IDIF} , $n = 4$ per condition).

2.7. Statistical Analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism software (version 9.1.2, (Graph-Pad, La Jolla, CA, USA). The level of statistical significance was set to $p \leq 0.05$. A one-factor ANOVA test was performed to compare the mean values of $\text{AUC}_{\text{brain}}$, AUC_{AIF} and AUC_{IDIF}

between the three groups, and a Tukey's post hoc test was used for multiple comparisons. The values were considered independent of each other. Normal distribution of the data was verified by the Shapiro–Wilk test and homoscedasticity by a Bartlett's test.

A two-factor ANOVA test was performed to compare the mean values of $V_{T,AIF}$ and $V_{T,IDIF}$ between the three groups, Tukey's post hoc was used for multiple comparisons. The three groups of rats were independent. Normal distribution of the data was verified by the Kolmogorov–Smirnov test and homoscedasticity by a Levene's test.

$V_{T,AIF}$ and $V_{T,IDIF}$ were correlated using a simple linear regression and the goodness of fit was estimated by the correlation coefficient R^2 .

3. Results

Visual comparison of SUV-normalized PET images displayed the typical brain distribution of [^{11}C]metoclopramide, which crosses the BBB, even when P-gp is fully functional [12]. No difference could be observed between the baseline and CBZ-treated animals regarding the distribution of [^{11}C]metoclopramide in the brain and in peripheral tissues. However, a higher PET signal was observed in RIT-treated animals, in both the brain and peripheral tissues, suggesting a substantial change in the kinetics of [^{11}C]metoclopramide (Figure 1).

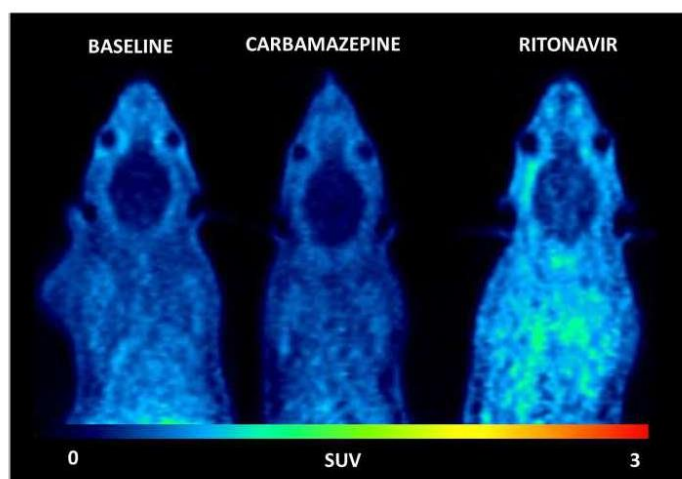


Figure 1. Representative PET summation images (from 0 to 30 min) of [^{11}C]metoclopramide from one baseline rat and one rat pretreated with carbamazepine (45 mg/kg twice a day for 7 days before PET) or ritonavir (20 mg/kg, 3 h before PET).

Whole brain TACs are shown in Figure 2A, confirming the visual observation from the PET images. At the end of the PET acquisition, brain uptake was not significantly different in baseline ($\text{SUV}_{30\text{min}} = 0.263 \pm 0.021$) and CBZ-treated animals ($\text{SUV}_{30\text{min}} = 0.233 \pm 0.061$). Brain uptake was higher in the RIT group ($\text{SUV}_{30\text{min}} = 0.398 \pm 0.041$) compared with baseline ($p < 0.01$) and CBZ-treated rats ($p < 0.01$). Consistently, CBZ did not increase the overall brain exposure ($\text{AUC}_{\text{brain}}$) to [^{11}C]metoclopramide while RIT did ($p < 0.05$; Figure 2B).

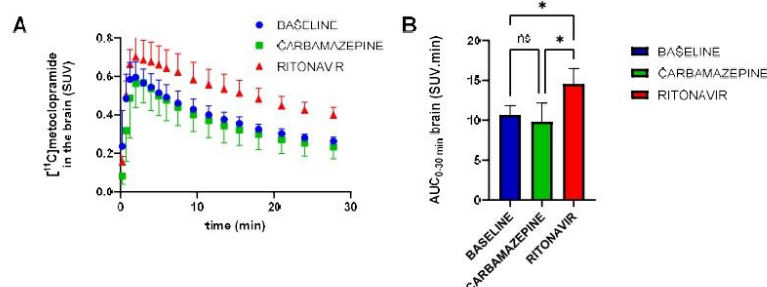


Figure 2. Whole-brain time-activity curves (A) and area under the whole brain curve from 0 to 30 min ($\text{AUC}_{0-30 \text{ min}}$) (B) for groups without (baseline) and with pretreatment with carbamazepine or ritonavir. Data are reported as mean \pm S.D with $n = 4$ per condition. ns = not significant, * $p < 0.05$ (one-factor ANOVA and Tukey's post hoc test for multiple comparisons).

Metabolism of $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide was assessed by determining the fraction of parent (unmetabolized) $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide in plasma over time (Figure 3). The fraction of parent $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide was not significantly different between groups at 30 min after injection, which corresponds to the end of PET acquisition. However, the fraction of parent $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide was significantly lower in the RIT group at 5 min after injection, but became similar to baseline and CBZ thereafter. Importantly, CBZ did not impact the fraction of parent $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide in plasma compared with baseline at any time point (Figure 3).

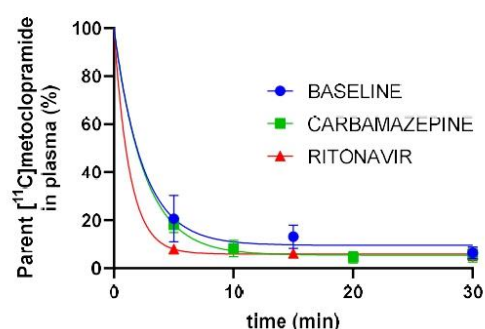


Figure 3. Fraction of parent (unmetabolized) $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide in plasma over time without and with pretreatment with carbamazepine or ritonavir (mean \pm S.D with $n = 3$ per condition).

The mean metabolite-corrected arterial input functions (AIF) obtained in each condition ($n = 3$) are shown in Figure 4A. The area under the TACs (AUC_{AIF}) was not significantly different between conditions, although a trend towards decreased plasma exposure was observed in CBZ or RIT pretreated animals compared with baseline (Figure 4C). Similar results were obtained when comparing the metabolite-corrected IDIFs of $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide in plasma, with a larger number of animals per group ($n = 4$, Figure 4B,C). The IDIF tended to overestimate the AIF. In all tested conditions, AUC_{IDIF} was approximately two-fold higher than AUC_{AIF} . However, for both methods (AIF or IDIF), pretreatment with CBZ or RIT did not significantly impact the plasma exposure to $[^{11}\text{C}]$ metoclopramide (Figure 4C). AUC, expressed in SUV.min, is normalized to the injected dose. Plasma AUC, therefore, is inversely correlated with the plasma clearance ($\text{Clearance} = \text{dose}/\text{AUC}$). It can be concluded,

therefore, that CBZ and RIT did not impact the plasma clearance of [^{11}C]metoclopramide in rats.

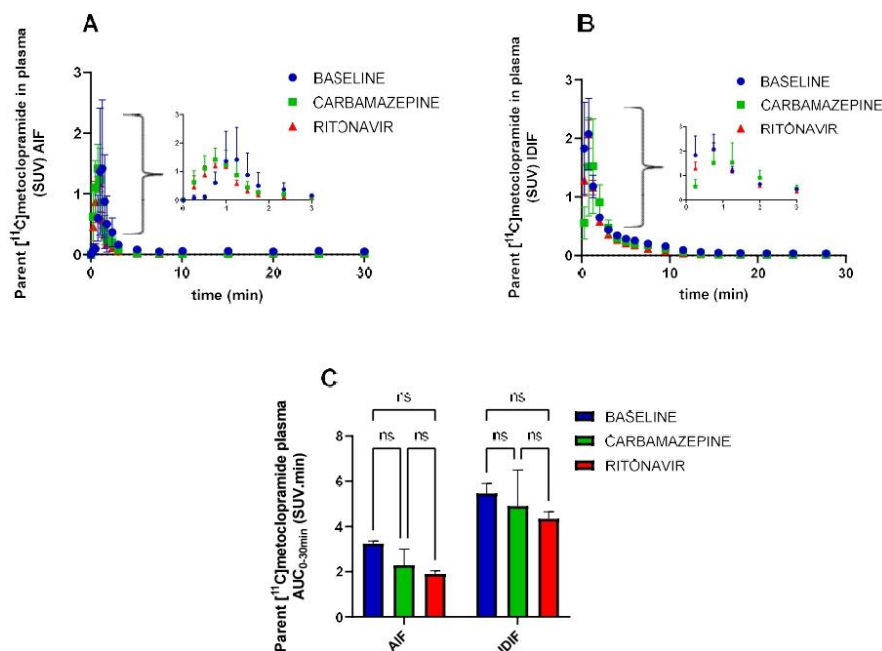


Figure 4. Concentration of parent (unmetabolized) [^{11}C]metoclopramide in plasma over time determined from the sampled arterial input function (AIF, (A)) or from the image-derived input function (IDIF, (B)). In (C), the area under the curve from 0 to 30 min ($\text{AUC}_{0-30\text{ min}}$) of parent [^{11}C]metoclopramide in plasma is shown. Data are reported as mean \pm S.D. with $n = 3$ (AIF) or $n = 4$ (IDIF) per condition. ns = not significant (two-way ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparisons).

The brain distribution volume (V_T), which corresponds to the brain/plasma concentration ratio at steady state [12], was estimated using the Logan graphical method to (i) compare the BBB penetration of [^{11}C]metoclopramide between conditions and (ii) validate the IDIF-based method. There was a good correlation between $V_{T,\text{IDIF}}$ and $V_{T,\text{AIF}}$ ($p < 0.001$, $R^2 = 0.86$). Neither $V_{T,\text{AIF}}$ values nor $V_{T,\text{IDIF}}$ values were significantly different between CBZ-treated and baseline rats. However, both $V_{T,\text{AIF}}$ and $V_{T,\text{IDIF}}$ values were significantly higher in the RIT group than in the baseline ($p < 0.001$) and the CBZ groups ($p < 0.01$), suggesting better passage of [^{11}C]metoclopramide across the BBB in RIT-treated animals (Figure 5).

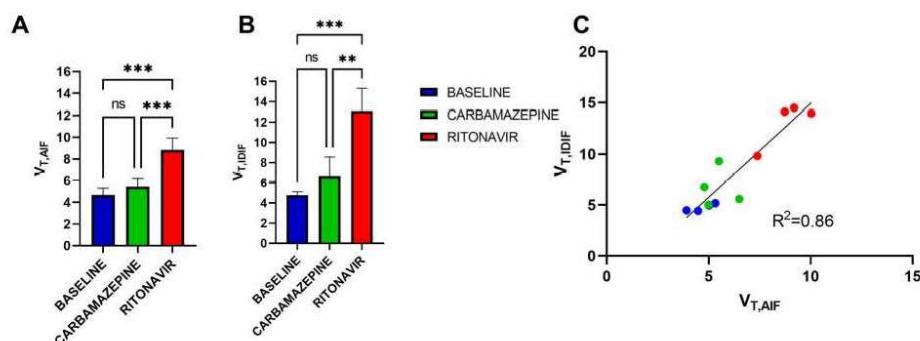


Figure 5. Brain volume of distribution (V_T) of [^{11}C]metoclopramide in groups without (baseline) and with pretreatment with carbamazepine or ritonavir determined with the arterial input function ($V_{T,AIF}$, (A)) or the image-derived input function ($V_{T,IDIF}$, (B)) and linear correlation between $V_{T,IDIF}$ and $V_{T,AIF}$ (C). Data are reported as mean \pm S.D with $n = 3$ (AIF) or $n = 4$ (IDIF) per condition. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns = not significant (two-way ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparison).

4. Discussion

The main objective of this preclinical study was to investigate the potential impact of co-administered drugs on the plasma and brain kinetics of [^{11}C]metoclopramide, a PET tracer used to estimate P-gp function at the BBB.

A large body of translational research suggests that P-gp function at the BBB may provide a potential biomarker of drug-resistant epilepsy [11,28–30]. In contrast to previously developed radiotracers, it was shown that [^{11}C]metoclopramide may be able to detect an induction of P-gp function at the BBB [16]. [^{11}C]metoclopramide PET imaging may provide, therefore, a clinical tool to unveil and localize epileptic foci based on the local overexpression of P-gp at the BBB [11]. However, treatment with antiepileptic drugs (AEDs) cannot reasonably be interrupted before PET imaging, given the risk for increased seizure frequency and magnitude in patients. It is essential, therefore, to anticipate the impact of concomitant drug intake on the kinetics of [^{11}C]metoclopramide, given the high propensity of many AEDs such as phenobarbital, phenytoin or CBZ to precipitate DDIs through induction of CYPs [31].

The anticonvulsant CBZ is widely prescribed in the long-term therapy of epilepsy and is a potent inducer of CYP3A4 and CYP2B6 [32]. It was shown that chronic treatment, at least 7 days, is required to achieve induction of multiple CYPs in Sprague Dawley rats [23]. The dose and administration scheme of CBZ that we selected was shown to be well-tolerated, induce CYPs and increase the plasma clearance of the CYP3A substrate rivaroxaban in Wistar rats [22]. In the present study, determination of effective induction of CYPs in each individual rat has not been performed. However, our results showed that 7 days chronic CBZ treatment did not impact the plasma or the brain kinetics of [^{11}C]metoclopramide in rats. Moreover, the brain penetration of [^{11}C]metoclopramide, estimated as V_T , was not changed by chronic CBZ treatment. First, this shows that [^{11}C]metoclopramide is poorly vulnerable to DDIs precipitated by CYP inducers in rats. This may not be the case in humans as oral administration of rifampicin, another major CYP inducer, led to a significant decrease in the plasma concentration of unlabeled metoclopramide in healthy volunteers [33]. However, this result suggests that CBZ does not substantially induce or inhibit P-gp function at the BBB in healthy Sprague Dawley rats.

Enzymes of the CYP3A subfamily, notably CYP3A4, have the greatest abundance in the liver and intestine, and are responsible for the metabolism of a large number of small-molecule drugs, including PET tracers [19]. Many studies have shown that members

of the CYP3A subfamily are inducible enzymes and the mechanism for induction has been thoroughly explored [34]. As a consequence, most induction DDIs are related to CYP3A enzymes and the risk for such DDIs should be explored during drug development [35]. In comparison, CYP2D6 does not appear to be inducible [31] and investigation of CYP2D6 induction is not recommended during drug development [35]. In vitro studies using human enzymes concluded that metoclopramide is predominantly metabolized by CYP2D6 in humans [36]. From an imaging perspective, the negligible impact of enzyme induction with CBZ on the plasma kinetics of [^{11}C]metoclopramide is a major asset compared with previous P-gp probes such as [^{11}C]verapamil, a CYP3A4 substrate which was shown to be vulnerable to CYP induction [37,38]. In addition, radiometabolites of [^{11}C]verapamil were shown to cross the BBB in rats, thereby potentially confounding the measurement of cerebral P-gp function with this PET tracer [37]. Against this background, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide has been specifically designed as a metabolically-stable PET tracer to study P-gp function at the human BBB [39]. However, this PET probe shows extensive peripheral metabolism and brain uptake of radiolabeled metabolites in mice [40]. Moreover, the very low baseline brain uptake of [^{11}C]N-desmethyl-loperamide does not allow for detection of an induction of P-gp at the BBB. Moreover, [^{11}C]N-desmethyl-loperamide may lack the sensitivity to detect moderate changes in P-gp function compared with other radioligands [14]. Altogether, our preclinical results support the applicability of [^{11}C]metoclopramide as a PET probe in situations in which concomitant therapy with CYP inducers cannot be avoided. The impact of CYP induction on the metabolism of newly proposed ^{18}F -labeled PET probes such as [^{18}F]MC225 has not been reported to our knowledge [41].

Data regarding the impact of concomitant drugs on the peripheral metabolism of [^{11}C]metoclopramide have been reported. In rats, co-injection of a pharmacological dose of metoclopramide (3 mg/kg, i.v) with [^{11}C]metoclopramide was shown to increase the parent fraction of [^{11}C]metoclopramide in plasma [12]. This non-linearity in radiotracer metabolism was attributed to a saturable uptake transport of [^{11}C]metoclopramide by the liver, probably mediated by organic cation transporters (OCT1/2) in rodents [26,42]. However, non-linearity was not observed in humans in whom co-injection of unlabeled metoclopramide (10 mg, i.v) did not impact the plasma kinetics of [^{11}C]metoclopramide [15]. Compared with rodents (fraction of parent [^{11}C]metoclopramide ~10% at 30 min) [12,26], or non-human primates (parent [^{11}C]metoclopramide was barely detectable after 30 min) [43], a microdose of [^{11}C]metoclopramide is considerably less metabolized in humans (fraction of parent [^{11}C]metoclopramide ~60% at 30 min) [13]. This suggests significant species differences in the metabolism of [^{11}C]metoclopramide. Consistently, the rat ortholog of human CYP2D6 comprises six CYP2D isozymes: (CYP2D15 and CYP2D18) and notable differences have been reported in the enzymatic activity between the rat and the human isoforms [44]. The negligible impact of CBZ on the peripheral metabolism of [^{11}C]metoclopramide suggests that inducible enzymes such as CYP3A are poorly involved in the metabolism of metoclopramide in rats. In humans, the impact of genetic polymorphism of the CYP2D6 gene on the plasma kinetics of [^{11}C]metoclopramide remains to be investigated [45]. However, in humans, it is possible to perform arterial blood sampling during brain PET acquisition and estimate P-gp function using pharmacokinetic modeling which takes into account any change in the peripheral metabolism of [^{11}C]metoclopramide [13].

We next investigated the impact of CYP inhibition on the plasma and brain kinetics of [^{11}C]metoclopramide. There is no validated broad spectrum CYP inhibitor among AEDs that can precipitate DDI in rats. Therefore, we selected RIT, which is a potent and well-characterized CYP inhibitor, including CYP3A and CYP2D6 [46]. The selected dose and administration scheme of RIT was shown to inhibit the metabolism of a CYP3A substrate in rats [24,25]. RIT did not impact the plasma clearance of parent [^{11}C]metoclopramide, suggesting a limited vulnerability of [^{11}C]metoclopramide to CYP inhibition-mediated DDIs. However, RIT increased the brain exposure and BBB penetration of [^{11}C]metoclopramide compared with baseline or CBZ-treated rats (Figures 2 and 5). RIT is a potent P-gp in-

hibitor in vitro [47] and at the intestinal level [46]. We first hypothesized that RIT may inhibit P-gp function at the BBB, thus increasing the brain penetration and exposure to [^{11}C]metoclopramide. However, compared with the baseline or the CBZ group, RIT also notably increased the PET signal in tissues surrounding the brain, suggesting a global increase in the tissue distribution of [^{11}C]metoclopramide. Moreover, enhanced diffusion of parent (unmetabolized) [^{11}C]metoclopramide to tissues may decrease the proportion of unchanged [^{11}C]metoclopramide in the circulation, assuming a limited and constant tissue distribution of radiometabolites. This is consistent with the lower percentage of parent [^{11}C]metoclopramide in plasma observed at 5 min in the RIT group. However, an increase in the distribution of [^{11}C]metoclopramide in other tissues than the brain was not observed using the potent P-gp inhibitor tariquidar, which specifically increased the brain uptake of [^{11}C]metoclopramide, with a limited impact on surrounding tissues [12,14]. Further experiments, therefore, are needed to untangle the mechanisms involved in the increased brain uptake of [^{11}C]metoclopramide precipitated by RIT or to validate RIT as an inhibitor of P-gp at the BBB.

5. Conclusions

The present study shows that CYP induction with CBZ as well as CYP inhibition with RIT have a negligible impact on the plasma kinetics of [^{11}C]metoclopramide in rats. This supports the use of [^{11}C]metoclopramide as a PET probe for P-gp function at the BBB in situations in which concomitant drug treatment cannot be avoided. CBZ did also not impact the brain kinetics and BBB penetration of [^{11}C]metoclopramide, thus confirming that estimation of P-gp function at the BBB is not biased by this model CYP inducer. RIT increased the brain exposure to [^{11}C]metoclopramide, thus apparently behaving as an inhibitor of P-gp at the BBB. Further experiments using complementary approaches, however, are needed to confirm this mechanism.

Author Contributions: Conceptualization, L.B. and N.T.; Methodology, L.B., F.C. and N.T.; Validation, M.E.B. and O.L.; Formal analysis, L.B., N.Z., S.L. and S.G.; Investigation, L.B., N.Z., S.L., G.H., M.G., S.G. and N.T.; Resources, F.C.; Data curation, L.B., C.T. and M.G.; Writing—original draft, L.B. and N.T.; Writing—review & editing, L.B., N.Z., S.L., G.H., F.C., V.B., C.T., M.G., M.E.B., M.B., O.L., S.G. and N.T.; Visualization, N.Z., V.B. and M.B.; Supervision, N.T.; Funding acquisition, N.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: L.B. received funding from the joined AP-HP/CEA grant. N.T. received funding from the French National Agency for Research (EPIFLUX project, ANR-19-CE17-0027). This work was performed on a platform partially funded by the France Life Imaging network (grant ANR-11-INBS-0006).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by an Ethics Committee of CETA n°44 (protocol code APAFIS#746620161104 17049220 v2 approved the 12 April 2017).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are freely available upon request to the corresponding author.

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

References

1. Begley, D.J. Delivery of Therapeutic Agents to the Central Nervous System: The Problems and the Possibilities. *Pharmacol. Ther.* **2004**, *104*, 29–45. [\[CrossRef\]](#)
2. Bauer, M.; Tournier, N.; Langer, O. Imaging P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier as a Determinant of the Variability in Response to CNS Drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2019**, *105*, 1061–1064. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Akamine, Y.; Yasui-Furukori, N.; Ieiri, I.; Uno, T. Psychotropic Drug–Drug Interactions Involving P-Glycoprotein. *CNS Drugs* **2012**, *26*, 959–973. [\[CrossRef\]](#)
4. Banks, W.A. From Blood–Brain Barrier to Blood–Brain Interface: New Opportunities for CNS Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 275–292. [\[CrossRef\]](#)
5. Obermeier, B.; Daneman, R.; Ransohoff, R.M. Development, Maintenance and Disruption of the Blood-Brain Barrier. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1584–1596. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

6. Kannan, P.; John, C.; Zoghbi, S.S.; Halldin, C.; Gottesman, M.M.; Innis, R.B.; Hall, M.D. Imaging the Function of P-Glycoprotein with Radiotracers: Pharmacokinetics and in Vivo Applications. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, *86*, 368–377. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Toornvliet, R.; van Berckel, B.N.M.; Luurtsema, G.; Lubberink, M.; Geldof, A.A.; Bosch, T.M.; Oerlemans, R.; Lammertsma, A.A.; Franssen, E.J.F. Effect of Age on Functional P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier Measured by Use of (R)-[(11)C]Verapamil and Positron Emission Tomography. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006**, *79*, 540–548. [\[CrossRef\]](#)
8. Bauer, M.; Karch, R.; Neumann, F.; Abraham, A.; Wagner, C.C.; Kletter, K.; Müller, M.; Zeitlinger, M.; Langer, O. Age Dependency of Cerebral P-Gp Function Measured with (R)-[(11)C]Verapamil and PET. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65*, 941–946. [\[CrossRef\]](#)
9. Bauer, M.; Wulkersdorfer, B.; Karch, R.; Philippe, C.; Jäger, W.; Stanek, J.; Wadsak, W.; Hacker, M.; Zeitlinger, M.; Langer, O. Effect of P-Glycoprotein Inhibition at the Blood-Brain Barrier on Brain Distribution of (R)-[(11)C]Verapamil in Elderly vs. Young Subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2017**, *83*, 1991–1999. [\[CrossRef\]](#)
10. Deo, A.K.; Borson, S.; Link, J.M.; Domino, K.; Eary, J.F.; Ke, B.; Richards, T.L.; Mankoff, D.A.; Minoshima, S.; O'Sullivan, F.; et al. Activity of P-Glycoprotein, a β -Amyloid Transporter at the Blood-Brain Barrier, Is Compromised in Patients with Mild Alzheimer Disease. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 1106–1111. [\[CrossRef\]](#)
11. Feldmann, M.; Asselin, M.-C.; Liu, J.; Wang, S.; McMahon, A.; Anton-Rodriguez, J.; Walker, M.; Symms, M.; Brown, G.; Hinz, R.; et al. P-Glycoprotein Expression and Function in Patients with Temporal Lobe Epilepsy: A Case-Control Study. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 777–785. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Pottier, G.; Marie, S.; Goutal, S.; Auvity, S.; Peyronneau, M.-A.; Stute, S.; Boisgard, R.; Dollé, F.; Buvat, I.; Caillé, F.; et al. Imaging the Impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) Function on the Brain Kinetics of Metoclopramide. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 309–314. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Tournier, N.; Bauer, M.; Pichler, V.; Nics, L.; Klebermass, E.-M.; Bamminger, K.; Matzneller, P.; Weber, M.; Karch, R.; Caillé, F.; et al. Impact of P-Glycoprotein Function on the Brain Kinetics of the Weak Substrate 11C-Metoclopramide Assessed with PET Imaging in Humans. *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 985–991. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Breuil, L.; Marie, S.; Goutal, S.; Auvity, S.; Truillet, C.; Saba, W.; Langer, O.; Caillé, F.; Tournier, N. Comparative Vulnerability of PET Radioligands to Partial Inhibition of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: A Criterion of Choice? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2022**, *42*, 175–185. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Bauer, M.; Bamminger, K.; Pichler, V.; Weber, M.; Binder, S.; Maier-Salamon, A.; Tahir, A.; Jäger, W.; Haslacher, H.; Tournier, N.; et al. Impaired Clearance from the Brain Increases the Brain Exposure to Metoclopramide in Elderly Subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2020**, *109*, 754–761. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Zoufal, V.; Mairinger, S.; Brackhan, M.; Krohn, M.; Filip, T.; Sauberer, M.; Stanek, J.; Wanek, T.; Tournier, N.; Bauer, M.; et al. Imaging P-Glycoprotein Induction at the Blood-Brain Barrier of a β -Amyloidosis Mouse Model with 11C-Metoclopramide PET. *J. Nucl. Med.* **2020**, *61*, 1050–1057. [\[CrossRef\]](#)
17. Breuil, L.; Goutal, S.; Marie, S.; Del Vecchio, A.; Audisio, D.; Soyer, A.; Goislard, M.; Saba, W.; Tournier, N.; Caillé, F. Comparison of the Blood-Brain Barrier Transport and Vulnerability to P-Glycoprotein-Mediated Drug-Drug Interaction of Domperidone versus Metoclopramide Assessed Using In Vitro Assay and PET Imaging. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1658. [\[CrossRef\]](#)
18. Gil-Martins, E.; Barbosa, D.J.; Silva, V.; Remião, F.; Silva, R. Dysfunction of ABC Transporters at the Blood-Brain Barrier: Role in Neurological Disorders. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *213*, 107554. [\[CrossRef\]](#)
19. Pike, V.W. PET Radiotracers: Crossing the Blood-Brain Barrier and Surviving Metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 431–440. [\[CrossRef\]](#)
20. Hefner, G.; Wolff, J.; Hahn, M.; Hiemke, C.; Toto, S.; Roll, S.C.; Messer, T.; Klimke, A. Prevalence and Sort of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions in Hospitalized Psychiatric Patients. *J. Neural Transm.* **2020**, *127*, 1185–1198. [\[CrossRef\]](#)
21. Dalic, L.; Cook, M.J. Managing Drug-Resistant Epilepsy: Challenges and Solutions. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2016**, *12*, 2605–2616. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Ngo, L.T.; Yang, S.; Tran, Q.T.; Kim, S.K.; Yun, H.; Chae, J. Effects of Carbamazepine and Phenytoin on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Rivaroxaban. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1040. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Tateishi, T.; Asoh, M.; Nakura, H.; Watanabe, M.; Tanaka, M.; Kumai, T.; Kobayashi, S. Carbamazepine Induces Multiple Cytochrome P450 Subfamilies in Rats. *Chem. Biol. Interact.* **1999**, *117*, 257–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Rioux, N.; Bellavance, E.; Bourg, S.; Garneau, M.; Ribadeneira, M.D.; Duan, J. Assessment of CYP3A-Mediated Drug-Drug Interaction Potential for Victim Drugs Using an in Vivo Rat Model. *Biopharm. Drug Dispos.* **2013**, *34*, 396–401. [\[CrossRef\]](#)
25. Kageyama, M.; Namiki, H.; Fukushima, H.; Terasaka, S.; Togawa, T.; Tanaka, A.; Ito, Y.; Shibata, N.; Takada, K. Effect of Chronic Administration of Ritonavir on Function of Cytochrome P450 3A and P-Glycoprotein in Rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 130–137. [\[CrossRef\]](#)
26. Caillé, F.; Goutal, S.; Marie, S.; Auvity, S.; Cisternino, S.; Kuhnast, B.; Pottier, G.; Tournier, N. Positron Emission Tomography Imaging Reveals an Importance of Saturable Liver Uptake Transport for the Pharmacokinetics of Metoclopramide. *Contrast Media Mol. Imaging* **2018**, *2018*, 7310146. [\[CrossRef\]](#)
27. Garcia-Varela, L.; Mossel, P.; Aguiar, P.; Vazquez-Matias, D.A.; van Waarde, A.; Willemsen, A.T.M.; Bartels, A.L.; Colabufo, N.A.; Dierckx, R.A.J.O.; Elsinga, P.H.; et al. Dose-Response Assessment of Cerebral P-Glycoprotein Inhibition in Vivo with [18F]MC225 and PET. *J. Controlled Release* **2022**, *347*, 500–507. [\[CrossRef\]](#)
28. Gidal, B.E. P-Glycoprotein Expression and Pharmacoresistant Epilepsy: Cause or Consequence? *Epilepsy Curr.* **2014**, *14*, 136–138. [\[CrossRef\]](#)

29. Bankstahl, J.P.; Bankstahl, M.; Kuntner, C.; Stanek, J.; Wanek, T.; Meier, M.; Ding, X.-Q.; Müller, M.; Langer, O.; Löscher, W. A Novel Positron Emission Tomography Imaging Protocol Identifies Seizure-Induced Regional Overactivity of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 8803–8811. [\[CrossRef\]](#)
30. Liu, J.Y.W.; Thom, M.; Catarino, C.B.; Martinian, L.; Figarella-Branger, D.; Bartolomei, F.; Koepp, M.; Sisodiya, S.M. Neuropathology of the Blood-Brain Barrier and Pharmacoresistance in Human Epilepsy. *Brain* **2012**, *135*, 3115–3133. [\[CrossRef\]](#)
31. Brodie, M.J.; Mintzer, S.; Pack, A.M.; Gidal, B.E.; Vecht, C.J.; Schmidt, D. Enzyme Induction with Antiepileptic Drugs: Cause for Concern? *Epilepsia* **2013**, *54*, 11–27. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Fuhr, L.M.; Marok, F.Z.; Hanke, N.; Selzer, D.; Lehr, T. Pharmacokinetics of the CYP3A4 and CYP2B6 Inducer Carbamazepine and Its Drug-Drug Interaction Potential: A Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling Approach. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 270. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Kaukab, I.; Shah, S.N.H.; Abrar, M.A.; Anwer, N.; Murtaza, G. Influence of Rifampicin Pre-Treatment on the In Vivo Pharmacokinetics of Metoclopramide in Pakistani Healthy Volunteers Following Concurrent Oral Administration. *Curr. Drug Metab.* **2020**, *21*, 301–306. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Zanger, U.M.; Schwab, M. Cytochrome P450 Enzymes in Drug Metabolism: Regulation of Gene Expression, Enzyme Activities, and Impact of Genetic Variation. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 103–141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. *FDA Clinical Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, and Clinical Implications—Guidance for Industry*; FDA: Silver Spring, MD, USA, 2017.
36. Livezey, M.R.; Briggs, E.D.; Bolles, A.K.; Nagy, L.D.; Fujiwara, R.; Furge, L.L. Metoclopramide Is Metabolized by CYP2D6 and Is a Reversible Inhibitor, but Not Inactivator, of CYP2D6. *Xenobiotica* **2014**, *44*, 309–319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Luurtsema, G.; Molthoff, C.F.M.; Schuit, R.C.; Windhorst, A.D.; Lammertsma, A.A.; Franssen, E.J.F. Evaluation of (R)-[11C]Verapamil as PET Tracer of P-Glycoprotein Function in the Blood-Brain Barrier: Kinetics and Metabolism in the Rat. *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 87–93. [\[CrossRef\]](#)
38. Abraham, A.; Luurtsema, G.; Bauer, M.; Karch, R.; Lubberink, M.; Pataria, E.; Joukhadar, C.; Kletter, K.; Lammertsma, A.A.; Baumgartner, C.; et al. Peripheral Metabolism of (R)-[11C]Verapamil in Epilepsy Patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 116–123. [\[CrossRef\]](#)
39. Lazarova, N.; Zoghbi, S.S.; Hong, J.; Seneca, N.; Tuan, E.; Gladding, R.L.; Liow, J.-S.; Taku, A.; Innis, R.B.; Pike, V.W. Synthesis and Evaluation of [N-Methyl-11C]N-Desmethyl-Loperamide as a New and Improved PET Radiotracer for Imaging P-Gp Function. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6034–6043. [\[CrossRef\]](#)
40. Wanek, T.; Römermann, K.; Mairinger, S.; Stanek, J.; Sauberer, M.; Filip, T.; Traxl, A.; Kuntner, C.; Pahnke, J.; Bauer, F.; et al. Factors Governing P-Glycoprotein-Mediated Drug-Drug Interactions at the Blood-Brain Barrier Measured with Positron Emission Tomography. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 3214–3225. [\[CrossRef\]](#)
41. Savolainen, H.; Windhorst, A.D.; Elsinga, P.H.; Cantore, M.; Colabufo, N.A.; Willemsen, A.T.; Luurtsema, G. Evaluation of [18F]MC225 as a PET Radiotracer for Measuring P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier in Rats: Kinetics, Metabolism, and Selectivity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 1286–1298. [\[CrossRef\]](#)
42. Hernández-Lozano, I.; Mairinger, S.; Sauberer, M.; Stanek, J.; Filip, T.; Wanek, T.; Ciarimboli, G.; Tournier, N.; Langer, O. Influence of Cation Transporters (OCTs and MATEs) on the Renal and Hepatobiliary Disposition of [11C]Metoclopramide in Mice. *Pharm. Res.* **2021**, *38*, 127–140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Auvity, S.; Caillé, F.; Marie, S.; Wimberley, C.; Bauer, M.; Langer, O.; Buvat, I.; Goutal, S.; Tournier, N. P-Glycoprotein (ABCB1) Inhibits the Influx and Increases the Efflux of 11C-Metoclopramide Across the Blood-Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59*, 1609–1615. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Venhorst, J.; ter Laak, A.M.; Commandeur, J.N.M.; Funae, Y.; Hiroi, T.; Vermeulen, N.P.E. Homology Modeling of Rat and Human Cytochrome P450 2D (CYP2D) Isoforms and Computational Rationalization of Experimental Ligand-Binding Specificities. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 74–86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Bae, J.-W.; Oh, K.-Y.; Yoon, S.-J.; Shin, H.-B.; Jung, E.H.; Cho, C.-K.; Lim, C.W.; Kang, P.; Choi, C.-I.; Jang, C.-G.; et al. Effects of CYP2D6 Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Metoclopramide. *Arch. Pharm. Res.* **2020**, *43*, 1207–1213. [\[CrossRef\]](#)
46. Wyen, C.; Fuhr, U.; Frank, D.; Aarnoutse, R.E.; Klaassen, T.; Lazar, A.; Seeringer, A.; Doroshenko, O.; Kirchheiner, J.C.; Abdulrazik, F.; et al. Effect of an Antiretroviral Regimen Containing Ritonavir Boosted Lopinavir on Intestinal and Hepatic CYP3A, CYP2D6 and P-Glycoprotein in HIV-Infected Patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *84*, 75–82. [\[CrossRef\]](#)
47. Drewe, J.; Gutmann, H.; Fricker, G.; Török, M.; Beglinger, C.; Huwyler, J. HIV Protease Inhibitor Ritonavir: A More Potent Inhibitor of P-Glycoprotein than the Cyclosporine Analog SDZ PSC 833. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 1147–1152. [\[CrossRef\]](#)

8.3.3 Données complémentaires

8.3.3.1 Fonctions d'entrée artérielles du protocole EPIFLUX

Les données obtenues chez le rat suggèrent un impact minime de l'induction enzymatique, par la carbamazépine, sur les cinétiques périphérique et cérébrale du [^{11}C]métoclopramide. Ces données précliniques ont notamment encouragé l'utilisation du [^{11}C]métoclopramide dans le protocole EPIFLUX, chez des patients encore souvent traités par des modulateurs des CYP. Cependant, les voies métaboliques du métoclopramide chez le rat et chez l'Homme peuvent être différentes. Depuis, les résultats préliminaires du protocole EPIFLUX ont permis de comparer le métabolisme du [^{11}C]métoclopramide à partir de prélèvements artériels réalisés chez les volontaires sains et les patients épileptiques pris en charge à Vienne. Il faut toutefois noter qu'il a été choisi de ne pas réaliser de prélèvement artériel sur le site d'Orsay.

La Figure 28 A présente les courbes temps/activité de l'ensemble des patients et des volontaires sains chez lesquels des prélèvements artériels ont été effectués. Les premiers résultats semblent indiquer que des cinétiques du radiotraceur inchangé sont très similaires entre les deux groupes. On remarque aussi que la proportion de [^{11}C]métoclopramide inchangé au cours du temps chez les patients est semblable à celle des volontaires sains (Figure 28 B). Ces résultats suggèrent un faible impact des cotraitements sur le métabolisme périphérique du [^{11}C]métoclopramide ce qui conforte les données obtenues chez le rat. Ces résultats s'expliquent notamment par le fait que le métoclopramide est principalement métabolisé par le CYP2D6 (Livezey et al. 2014), une enzyme particulièrement peu sensible à l'induction enzymatique (Hellum et al. 2007). Cette caractéristique est particulièrement intéressante car les voies de régulation de la P-gp, qui peuvent être étudiées grâce à l'imagerie TEP au [^{11}C]métoclopramide, sont souvent similaires à celles impliquée dans la régulation des CYP, et en particulier du CYP3A4 (Hakkola et al. 2020).

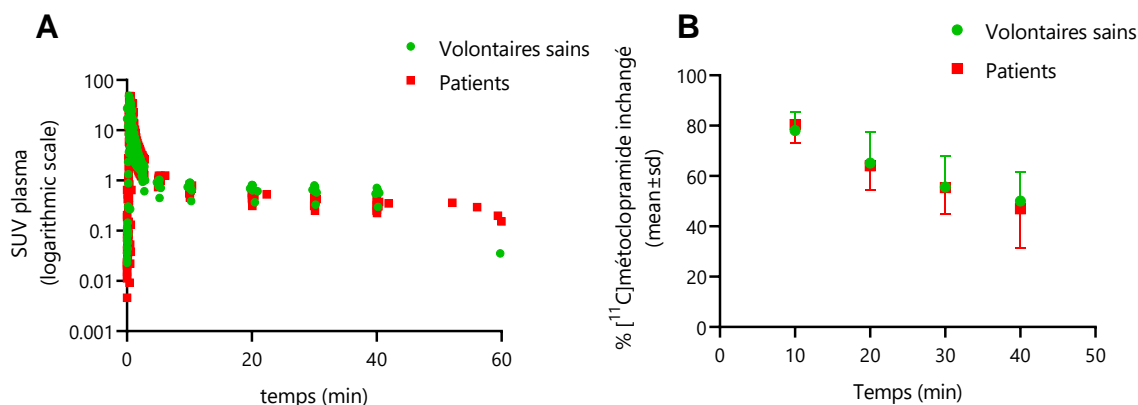


Figure 28 : Cinétique plasmatique et métabolisme du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide chez les patients et les volontaires sains de l'étude EPIFLUX

En A, les courbes temps-activité du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide inchangé dans le plasma des volontaires sains et des patients du protocole EPIFLUX sont représentées en échelle logarithmique entre 0 et 60 minutes. En B, la moyenne du pourcentage de $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide dans le plasma est représentée pour chaque groupe.

Ces premiers résultats cliniques sont en accord avec les résultats précliniques de l'Article 3 (Breuil, Ziani, et al. 2022) qui n'ont pas retrouvé d'impact de la carbamazépine sur le métabolisme périphérique du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide. Néanmoins, tous les sujets atteints d'épilepsie ne sont pas traités par des inducteurs enzymatiques et il sera tout de même intéressant de réaliser une analyse spécifique des sous-groupes de patients traités par des inducteurs ou inhibiteur de CYP connus.

8.3.4 Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus dans l'article 3 (Breuil, Ziani, et al. 2022), ainsi que les données préliminaires obtenues chez les patients de l'étude EPIFLUX, sont prometteurs pour une utilisation en clinique chez les patients atteints d'EPR. En effet, il n'a pas été retrouvé d'influence de la carbamazépine sur la cinétique cérébrale du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide chez le rat. La carbamazépine est un des traitements antiépileptiques les plus largement prescrit et un puissant inducteur des CYPs. Ces résultats semblent se confirmer sur l'étude du métabolisme périphérique du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide chez les patients et les volontaires sains de l'étude EPIFLUX. Il faut toutefois noter que le métabolisme du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide est nettement plus important chez le rat que chez l'Homme, ce qui rend difficile la quantification d'une induction du métabolisme du radiotraceur et donc une diminution du pourcentage de radiotraceur inchangé dans le plasma, même à 5 minutes après l'injection du radiotraceur.

En ce qui concerne le ritonavir, l'inhibiteur enzymatique choisi dans l'étude de l'Article 3, aucune modification du métabolisme périphérique du [^{11}C]métoclopramide n'a été observée. Néanmoins, la visible augmentation du signal cérébral suggère que le ritonavir agit comme un inhibiteur de la P-gp au niveau de la BHE. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une étude *in vitro* de transport bidirectionnel sur des cellules surexprimant la P-gp du rat. Cependant, cela n'a pas été l'objectif de cette étude qui s'est concentré sur le métabolisme périphérique du radiotracer et son impact au niveau cérébral. En revanche, les patients de l'étude EPIFLUX peuvent être traités avec des médicaments inhibiteurs de la P-gp, et cette information devra être prise en compte lors de l'analyse des cinétiques cérébrales du radiotracer et de la comparaison des paramètres pharmacocinétiques entre les groupes de l'étude.

Le [^{11}C]vérapamil a été identifié comme étant particulièrement sensible aux co-traitements utilisés dans le traitement de l'épilepsie, ce qui peut entraîner une modification de sa cinétique périphérique (Abraham et al. 2008). Cette influence doit être prise en compte dans la conception d'une étude clinique, car elle peut avoir des répercussions sur la cinétique cérébrale du radiotracer. Cependant, cela ne semble pas être le cas pour le [^{11}C]métoclopramide, même si des analyses plus approfondies sont nécessaires, conférant un avantage à ce dernier en ce qui concerne la quantification de la fonction de la P-gp au niveau de la BHE chez l'Homme.

Ces données précliniques ont également ouvert la voie pour envisager une fonction d'entrée dérivée de l'image (*image-derived input function*, IDIF) qui s'est avérée être fortement corrélée à la fonction d'entrée artérielle (*arterial input function*, AIF) prélevée chez le rat. En effet, dans une perspective translationnelle, il est souvent difficile de réaliser des prélèvements artériels pour l'ensemble des patients, bien que cela soit possible dans certaines conditions. Il est donc nécessaire de valider une technique de quantification fiable, simple et qui permet de s'affranchir de prélèvements artériels invasifs. Si les traitements concomitants pris par les patients épileptiques n'ont pas ou peu d'impact sur le métabolisme périphérique du métoclopramide, il serait alors possible d'utiliser une courbe moyenne du métabolisme périphérique du [^{11}C]métoclopramide pour estimer la fonction d'entrée afin de modéliser la neuropharmacocinétique du [^{11}C]métoclopramide au travers de la BHE chez tous les sujets, y compris ceux chez ceux qui n'ont pas été prélevés au niveau artériel.

8.4 PARTIE III : METHODE DE QUANTIFICATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DE LA P-GP PAR IMAGERIE TEP AU [^{11}C]METOCLOPRAMIDE CHEZ L'HOMME

8.4.1 Hypothèses et objectifs

L'imagerie TEP présente de nombreux avantages, notamment celui d'une acquisition dynamique qui permet de suivre la cinétique du radiotraceur dans les différentes régions du cerveau. Cette propriété est particulièrement importante pour étudier des phénomènes cinétiques tel que le transport d'efflux par la P-gp au niveau de la BHE. La quantification de paramètres biologiques à partir des données d'imagerie TEP reste un défi et constitue une thématique de recherche à part entière (Sadzot et al. 1994).

Pour l'imagerie fonctionnelle de la protéine P-gp, les modèles à un ou deux compartiments tissulaires (1TCM, 2TCM), ainsi que le modèle de Logan, sont souvent utilisés et comparés entre eux. Des études utilisant le [^{11}C]vérapamil dans des protocoles cliniques ont montré que l'augmentation du volume de distribution V_T était fortement corrélée à l'augmentation de la constante d'influx K_1 après l'inhibition de la P-gp par le tariquidar (Wagner et al. 2009; M. Bauer et al. 2015). Il a été montré que cette augmentation du K_1 était relativement moins importante chez les patients atteints d'EPR (Feldmann M. et al. 2013). Afin d'éviter les problèmes liés aux radiométabolites cérébraux du [^{11}C]vérapamil à des temps plus tardifs, ces études ont estimé le K_1 en utilisant uniquement les dix premières minutes des images TEP. Une étude menée sur des volontaires sains avec le [^{11}C]métoclopramide, modélisé à l'aide d'un modèle 1TCM, a montré une augmentation significative du volume de distribution V_T après l'injection de l'inhibiteur. Cette augmentation du V_T résulte d'une augmentation limitée de la constante d'influx K_1 (9%), mais surtout d'une diminution significative de la constante d'efflux k_2 (15%). Chez les volontaires sains, l'utilisation du [^{11}C]vérapamil n'a pas permis de mettre en évidence une implication de la constante d'efflux suite à l'injection de la ciclosporine (Muzi et al. 2009). Cependant, une étude utilisant la modélisation non-linéaire à effets mixtes a montré une diminution du paramètre Q_{out} lié à l'efflux du radiotraceur vers la circulation sanguine (Müllauer et al. 2012). Cela pourrait être expliqué par le fait que le vérapamil est un substrat avide de la P-gp. En effet, son passage dans le cerveau est très limité dans des conditions physiologiques si bien que les modèles pharmacocinétiques conventionnels ne permettent pas de mettre en évidence une implication de la constance d'efflux k_2 (Tournier et al. 2019). Il en est de même

pour le [^{11}C]NdLop, dont l'exposition cérébrale, modélisée par le volume de distribution V_T avec un modèle 1TCM, est corrélée à l'augmentation du K_1 après l'inhibition de la P-gp (Kreisl et al. 2010). De plus, contrairement au [^{11}C]vérapamil, les radiométabolites du [^{11}C]métoclopramide ne traversent pas la BHE, ce qui constitue un avantage en termes de quantification par imagerie TEP. Cependant, tous ces protocoles nécessitent l'utilisation d'une fonction d'entrée artérielle, ce qui implique un cathétérisme et des prélèvements répétés de sang artériel pendant l'acquisition des images. Dans le cadre d'une utilisation clinique chez des patients, il est difficilement envisageable de réaliser ce type de prélèvements. Il est donc nécessaire de développer une méthode alternative qui ne nécessite pas de fonction d'entrée artérielle pour quantifier l'activité de la P-gp par imagerie TEP chez les patients.

Nous avons choisi de développer une méthode simplifiée, mettant à profit les caractéristiques cinétiques particulières du [^{11}C]métoclopramide, et ne nécessitant pas de prélèvements sanguins. Cette méthode est fondée sur le calcul de la pente d'élimination du radiotraceur du compartiment cérébral $K_{E,\text{brain}}$. En plus de sa mise en œuvre simple, cette méthode permet de générer des cartes paramétrique $K_{E,\text{brain}}$, qui permettent de visualiser plus intuitivement l'activité d'efflux au niveau cérébral. En effet, le paramètre de référence, le V_T , augmente lorsque que la P-gp diminue. Cette méthode simplifiée a été utilisée et validée sur 3 espèces différentes, les rats, les PNH et l'Homme, avec et sans inhibition pharmacologique de la P-gp. Ce travail est actuellement en révision auprès du journal *Molecular imaging and Biology* (facteur d'impact = 3.5). L'article soumis est en libre accès sur la base *Research Square*.



Preprints are preliminary reports that have not undergone peer review.
They should not be considered conclusive, used to inform clinical practice,
or referenced by the media as validated information.

Parametric imaging of P-glycoprotein function at the blood-brain barrier using kE_{brain}-maps generated from [11C]metoclopramide PET data in rats, nonhuman primates and humans

Louise BREUIL

Université Paris-Saclay: Université Paris-Saclay

Myriam ELBIALI

Medical University of Vienna: Medizinische Universität Wien

Dominique VODOVAR

Université Paris Cité: Université Paris Cité

Solène MARIE

Université Paris-Saclay: Université Paris-Saclay

Sylvain AUVITY

Université Paris Cité Faculté de Santé: Université Paris Cité Faculté de Santé

Martin BAUER

Medical University of Vienna: Medizinische Universität Wien

Sébastien GOUTAL

Université Paris-Saclay: Université Paris-Saclay

Sebastian RODRIGO

Université Paris-Saclay: Université Paris-Saclay

Oliver LANGER

Medical University of Vienna: Medizinische Universität Wien

Nicolas Tournier (✉ nicolas.tournier@cea.fr)



Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives Saclay <https://orcid.org/0000-0002-0755-2030>

Research Article

Keywords: ABCB1, ABC transporter, ATP-binding cassette, Pharmacokinetics, Positron Emission Tomography, Multidrug resistance, Neuroimaging

Posted Date: May 22nd, 2023

DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2920574/v1>

License:   This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
[Read Full License](#)

Abstract

Purpose

PET imaging using [^{11}C]metoclopramide revealed the importance of P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) in mediating the brain-to-blood efflux of substrates across the blood-brain barrier (BBB). In this work, the elimination rate constant from the brain ($k_{\text{E,brain}}$), calculated from dynamic PET images without the need for arterial blood sampling, was evaluated as an outcome parameter for the interpretation of [^{11}C]metoclopramide PET data.

Procedures:

$k_{\text{E,brain}}$ parameter was obtained by linear regression of log-transformed brain time-activity curves (TACs). $k_{\text{E,brain}}$ values (h^{-1}) obtained under baseline conditions were compared with values obtained after complete P-gp inhibition using tariquidar in rats ($n = 4$) and baboons ($n = 4$) or after partial inhibition using cyclosporine A in humans ($n = 10$). In baboons, the sensitivity of $k_{\text{E,brain}}$ to measure complete P-gp inhibition was compared with outcome parameters derived from kinetic modeling using a 1-tissue compartment model (1-TCM). Finally, $k_{\text{E,brain}}$ -maps were generated in each species using PMOD software.

Results

The linear part of the log-transformed brain TACs occurred from 10–30 min after radiotracer injection in rats, from 15–60 min in baboons and from 20–60 min in humans. P-gp inhibition significantly decreased $k_{\text{E,brain}}$ values by $39 \pm 12\%$ in rats ($p < 0.01$), by $32 \pm 6\%$ in baboons ($p < 0.001$) and by $37 \pm 22\%$ in humans ($p < 0.001$). In baboons, P-gp inhibition consistently decreased the brain-to-plasma efflux rate constant k_2 ($36 \pm 9\%$, $p < 0.01$) leading to an increase in the total brain volume of distribution (V_T , $101 \pm 12\%$, $p < 0.001$). In all studied species, brain $k_{\text{E,brain}}$ -maps displayed decreased P-gp-mediated efflux across the BBB.

Conclusions

$k_{\text{E,brain}}$ of [^{11}C]metoclopramide provides a simple outcome parameter to describe P-gp function in the living brain when arterial input function data are unavailable, although less sensitive than V_T . $k_{\text{E,brain}}$ -maps represent easy to compute parametric images reflecting the effect of P-gp on [^{11}C]metoclopramide elimination from the brain.

Introduction

P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) is the most studied efflux transporter expressed at the blood-brain barrier (BBB) [1]. Positron Emission Tomography (PET) imaging using radiolabeled substrates of P-gp provides a unique method to investigate P-gp function in the living brain, in animals and humans [2]. This enabled the validation of pharmacological inhibitors of P-gp function at the BBB, including cyclosporine A and tariquidar [3]. Moreover, PET imaging demonstrated impaired P-gp function at the BBB in several CNS diseases, such as Alzheimer's disease [4, 5].

Outcome parameters to describe P-gp function at the BBB from PET data depend on the pharmacokinetic properties of the investigated probe substrates [6]. The total volume of distribution (V_T), which corresponds to the brain/plasma concentration ratio at steady state, is the gold-standard parameter to describe how P-gp restricts the brain distribution of its substrates [7]. Brain V_T increases as P-gp function decreases, which has been reported for the clinically validated P-gp probes racemic [^{11}C]verapamil [8], (*R*)-[^{11}C]verapamil [9], [^{11}C]N-desmethyl-Hoperamide [10] and [^{11}C]metoclopramide [11].

[^{11}C]Metoclopramide has been specifically designed to detect an induction of P-gp function at the BBB and displays substantial baseline brain uptake when P-gp is normally expressed [12, 13]. Moreover, the BBB penetration of radiolabeled metabolite(s) is negligible, so that the brain PET signal is predominantly composed of parent (unmetabolized) [^{11}C]metoclopramide [13]. This enables the correct estimation of both the plasma-to-brain influx rate constant (K_1) and the brain-to-plasma efflux rate constant (k_2) of parent [^{11}C]metoclopramide using kinetic modeling with a 1-tissue compartment model (1-TCM) (Fig. 1) [14]. This highlighted the prime importance of P-gp-mediated brain-to-plasma efflux (k_2) in limiting [^{11}C]metoclopramide brain exposure [11, 13, 15]. Taking advantage of these properties, the elimination rate constant of [^{11}C]metoclopramide from the brain ($k_{E,\text{brain}}$), which can be directly calculated from dynamic PET images without the need of an arterial blood input function (Fig. 1), has been proposed as a parameter to describe P-gp efflux at the BBB in situations of either impaired or induced P-gp function [11, 12, 15].

Parametric maps are useful to represent and visually compare P-gp function in various pathophysiological situations [4, 5]. Parametric maps are also useful for investigating regional changes in P-gp function using voxel-wise statistical mapping. However, the computation of parametric maps describing V_T , K_1 or k_2 requires arterial input function data. In this context, it may be hypothesized that $k_{E,\text{brain}}$ -maps of [^{11}C]metoclopramide may provide a simplified method to display brain P-gp function at the voxel level. The feasibility and relevance of [^{11}C]metoclopramide $k_{E,\text{brain}}$ -maps was evaluated in rats, nonhuman primates and humans.

Material and methods

Data sets

[¹¹C]Metoclopramide PET data used in this analysis, obtained in different species and in different conditions, have been previously reported [11, 15–17]. Details on image acquisition and data analysis to generate time activity curves (TACs) in the brain are described in the corresponding articles. Experimental conditions used to validate $k_{E,brain}$ are briefly described below.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study, as previously described [11]. All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

PET data in rats

[¹¹C]Metoclopramide PET images were obtained in rats over 30 min in baseline conditions (n=4) and after inhibition of P-gp function with tariquidar (n=4). Tariquidar (8 mg/kg) was i.v. injected 15 min before i.v. injection of [¹¹C]metoclopramide [17]. Carbamazepine or ritonavir were used to induce or inhibit cytochrome P450 (CYP) activity, respectively. Carbamazepine suspension (45 mg/kg) was administered orally twice daily for 7 days before the PET imaging (n=4). Animals of the ritonavir group (n=4) received a single oral dose of 20 mg/kg of ritonavir, 3h before [¹¹C]metoclopramide PET imaging [16]. PET data analysis was performed using PMOD software (version 3.9; PMOD Technologies, Zürich, Switzerland). A region of interest (ROI) was drawn over the whole-brain to generate time-activity curves (TACs). Brain radioactivity was corrected for ¹¹C-decay, injected dose and animal weight and expressed as the standardized uptake value (SUV).

PET data in baboons

[¹¹C]Metoclopramide PET data were obtained in 4 different nonhuman primates (baboons) [15]. Each animal underwent [¹¹C]metoclopramide PET imaging at baseline and during P-gp inhibition, achieved by tariquidar infusion (4 mg/kg/h). Tariquidar infusion started at 1 h before radiotracer injection and was continued during the entire PET acquisition (60 min). PET images were generated and reconstructed as previously described. The PET data were analyzed using PMOD software. PET images were coregistered onto corresponding MR images for each baboon. A ROI was drawn over the whole-brain on coregistered dynamic PET images to generate corresponding TACs (SUV vs time). Kinetic modeling was performed using the 1-TCM with the corresponding arterial plasma input function of parent [¹¹C]metoclopramide to estimate the total volume of distribution (V_T ; mL·cm⁻³) as well as the plasma-to-brain influx rate constant (K_1 ; mL·cm⁻³·min⁻¹) and the brain-to-plasma efflux rate constant (k_2 ; min⁻¹, Fig. 1) [15].

PET data in humans

Ten healthy male subjects underwent two consecutive [^{11}C]metoclopramide PET scans without and with P-gp inhibition using cyclosporine A infusion (CsA, 2.5 mg/kg/h), starting 1 h before injection of [^{11}C]metoclopramide and continued for the duration of the PET scan. Individual T1-weighted MR images were segmented with SPM12 (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging) to define gray and white matter. As previously described, the adult brain maximum probability map ("Hammersmith atlas"; n30r83) was used to extract a whole-brain gray matter ROI to generate TACs[11].

Data and statistical analysis

$k_{E,\text{brain}}$ calculation and statistical analysis were performed using GraphPad Prism software (version 9.1.2, GraphPad, La Jolla, CA, USA). $k_{E,\text{brain}}$ represents the slope of the linear part of the log-transformed brain TACs and is obtained by linear regression analysis. The linear part occurred from 10-30 min after radiotracer injection in rats (scan duration: 30 min), from 15-60 min in baboons (scan duration: 60 min) and from 20-60 min in humans (scan duration: 60 min). $k_{E,\text{brain}}$ was expressed in units of h^{-1} rather than min^{-1} to limit the number of decimals.

The level of statistical significance was set to $p < 0.05$. An unpaired Student's t -test was used to compare the mean values of $k_{E,\text{brain}}$ between baseline and P-gp inhibition conditions for rats. The values were considered independent of each other; the normal distribution of the values was verified by the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by an F-test. In addition, a one-way ANOVA with a Dunnett's posthoc test was applied to the rat data to compare baseline $k_{E,\text{brain}}$ with $k_{E,\text{brain}}$ measured in situations of CYP inhibition or induction. Outcome parameters obtained from the same experiment in the same individual (baboons and humans) were compared using a paired Student's t -test. The Shapiro-Wilk test was used to verify the normal distribution of the values.

Construction of $k_{E,\text{brain}}$ -maps

$k_{E,\text{brain}}$ -maps were constructed using modules of the PMOD software. First, all images were converted into SUV images in the Pview module. Masks were used to delineate the whole-brain ROI using the isocontour tool in Pview. ROIs were applied to the dynamic coregistered SUV PET images to set the outside voxels to 0 and keep only the dynamic SUV PET image of the whole-brain. These images were opened in the PXMOD module and the regression model was selected. In the input data setting section, the appropriate frames were selected corresponding to the linear part of the TACs, and the logarithm preprocessing tool was applied. In the model calculation tool, the slope pixel-wise calculation was selected and the parametric slope images were built. A scale of -1 multiplication was applied to obtain positive contrast.

Results

Representative TACs for each species are represented in Figure 2. The logarithmic representation of the SUV values enabled determination of the linear part for $k_{E,\text{brain}}$ calculation in rats, baboons and humans

(Fig. 2). In all three species, $k_{E,brain}$ was significantly lower when P-gp was pharmacologically inhibited as compared with the baseline condition ($p<0.01$).

In rats, $k_{E,brain}$ values were similar in carbamazepine-treated and untreated rats ($p>0.05$), whereas ritonavir significantly decreased $k_{E,brain}$ ($p<0.001$, Fig. 3A).

In baboons, $k_{E,brain}$ was 3.3 ± 0.6 -fold less sensitive than V_T in terms of response to maximal P-gp inhibition ($p<0.01$) while K_1 and k_2 showed comparable sensitivity to $k_{E,brain}$ (Fig. 3B).

$k_{E,brain}$ -maps were generated for each species (Fig. 4). $k_{E,brain}$ -maps enabled direct visualization of the impact of P-gp inhibition on efflux transport function (Fig. 4).

Discussion

We here propose a simplified method for quantification and graphical representation of P-gp function at the BBB derived from dynamic [^{11}C]metoclopramide PET data. This quantification method is inspired by the Nuclear Medicine practice to interpret dynamic scintigraphy data obtained with [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-sestamibi, another P-gp substrate, to predict tumoral multidrug-resistance [18]. Compared with brain V_T , which is the gold-standard parameter to measure P-gp function, $k_{E,brain}$ is calculated from dynamic brain PET data only and does not require an arterial input function, which can be challenging to obtain in small animals and patients.

[^{11}C]Metoclopramide shows rapid and substantial initial uptake in the brain, while being rapidly metabolized and cleared from plasma [11, 13, 15]. Therefore, the later part of the brain PET signal, which primarily consists of unmetabolized [^{11}C]metoclopramide, enables reliable calculation of $k_{E,brain}$. Importantly, such a quantification method cannot be used for other radiolabeled P-gp substrates which do not benefit from such pharmacokinetic properties.

In rats, baboons and humans, $k_{E,brain}$ was shown to display adequate sensitivity to measure the impact of pharmacological P-gp inhibition at the BBB. $k_{E,brain}$ was previously shown to be also sensitive to detect a pharmacological induction of P-gp function at the mouse BBB [12]. The limited impact of CYP induction by carbamazepine on $k_{E,brain}$ suggests that $k_{E,brain}$ may be used as an outcome parameter in patients with drug-resistant epilepsy, who are often treated with CYP-inducing drugs [19]. The significant decrease in $k_{E,brain}$ in ritonavir-treated rats supports previous data suggesting that ritonavir may inhibit P-gp function at the BBB [16]. In baboons, almost maximal inhibition of P-gp could be achieved, which was not possible in humans in the absence of a clinical-grade formulation of tariquidar [15]. Our results show that $k_{E,brain}$ is less sensitive than V_T to detect maximal P-gp inhibition at the BBB. Maximal change in $k_{E,brain}$ after P-gp inhibition was similar to the changes in k_2 and K_1 , the latter being associated with higher variability. It should, however, be noted that the sensitivity of $k_{E,brain}$ to detect partial P-gp inhibition has not been determined in baboons. In humans, $k_{E,brain}$ was more sensitive than V_T to detect partial P-gp

inhibition by cyclosporine A [11]. Moreover, the sensitivity of $k_{E,brain}$ versus V_T to detect induction of P-gp function at the BBB remains to be determined.

Finally, we show that $k_{E,brain}$ -maps can be easily computed as parametric images to display P-gp-mediated efflux at the BBB. However, calculation of $k_{E,brain}$ -maps is associated with some noise and an apparent loss in spatial resolution. $k_{E,brain}$ -maps are therefore probably not suited for regional analysis in small animals. However, in baboon or humans, $k_{E,brain}$ -maps seem relevant with respect to the brain size and the spatial resolution of clinical PET scanners. $k_{E,brain}$ -maps may be particularly suited to detect focal induction of P-gp at the BBB in epilepsy patients using visual assessment or voxel-wise analysis [19].

Declarations

Acknowledgments

Funding by ANR19-CE17-0027 (EPIFLUX). LB AND DV received a joined grant from CEA/AP-HP.

Author Contributions,

NT, LB MB and OL designed the study. LB, ME, DV, SM, SA, MB, SG and and SR analyzed the data. LB and NT wrote the first draft of the manuscript. All authors provided critical review and approved the final manuscript.

Conflict of Interest Statement

None

References

1. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
2. Kannan P, John C, Zoghbi SS, et al (2009) Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: pharmacokinetics and in vivo applications. *Clin Pharmacol Ther* 86:368–377. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.138>
3. Langer O (2016) Use of PET Imaging to Evaluate Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *J Clin Pharmacol* 56 Suppl 7:S143-156. <https://doi.org/10.1002/jcph.722>
4. Deo AK, Borson S, Link JM, et al (2014) Activity of P-glycoprotein, a β -amyloid Transporter at the Blood-Brain Barrier, is Compromised in Patients with Mild Alzheimer's Disease. *J Nucl Med* 55:1106–1111. <https://doi.org/10.2967/jnumed.113.130161>
5. Korteckaas R, Leenders KL, Oostrom JCH van, et al (2005) Blood–brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Annals of Neurology* 57:176–179. <https://doi.org/10.1002/ana.20369>

6. Lubberink M (2016) Kinetic Models for Measuring P-glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier with Positron Emission Tomography. *Curr Pharm Des* 22:5786–5792.
<https://doi.org/10.2174/1381612822666160804093852>
7. Tournier N, Stieger B, Langer O (2018) Imaging techniques to study drug transporter function in vivo. *Pharmacol Ther* 189:104–122. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.04.006>
8. Muzi M, Mankoff DA, Link JM, et al (2009) Imaging of Cyclosporine Inhibition of P-Glycoprotein Activity Using ¹¹C-Verapamil in the Brain: Studies of Healthy Humans. *Journal of Nuclear Medicine* 50:1267–1275. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.059162>
9. Bauer M, Zeitlinger M, Karch R, et al (2012) P-glycoprotein mediated interaction between (R)-[¹¹C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier studied with positron emission tomography, a comparison with rat data. *Clin Pharmacol Ther* 91:227–233.
<https://doi.org/10.1038/clpt.2011.217>
10. Kreisl WC, Liow J-S, Kimura N, et al (2010) P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in humans can be quantified with the substrate radiotracer ¹¹C-N-desmethyl-loperamide. *J Nucl Med* 51:559–566. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.070151>
11. Tournier N, Bauer M, Pichler V, et al (2019) Impact of P-Glycoprotein Function on the Brain Kinetics of the Weak Substrate ¹¹C-Metoclopramide Assessed with PET Imaging in Humans. *J Nucl Med* 60:985–991. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.219972>
12. Zoufal V, Mairinger S, Brackhan M, et al (2020) Imaging P-Glycoprotein Induction at the Blood-Brain Barrier of a β -Amyloidosis Mouse Model with ¹¹C-Metoclopramide PET. *J Nucl Med* 61:1050–1057.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.119.237198>
13. Pottier G, Marie S, Goutal S, et al (2016) Imaging the Impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) Function on the Brain Kinetics of Metoclopramide. *J Nucl Med* 57:309–314.
<https://doi.org/10.2967/jnumed.115.164350>
14. Innis RB, Cunningham VJ, Delforge J, et al (2007) Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1533–1539.
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600493>
15. Auvity S, Caillé F, Marie S, et al (2018) P-Glycoprotein (ABCB1) Inhibits the Influx and Increases the Efflux of ¹¹C-Metoclopramide Across the Blood-Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates. *J Nucl Med* 59:1609–1615. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.210104>
16. Breuil L, Ziani N, Leterrier S, et al (2022) Impact of Cytochrome Induction or Inhibition on the Plasma and Brain Kinetics of [¹¹C]metoclopramide, a PET Probe for P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics* 14:2650. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122650>
17. Breuil L, Marie S, Goutal S, et al (2022) Comparative vulnerability of PET radioligands to partial inhibition of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: A criterion of choice? *J Cereb Blood Flow Metab* 42:175–185. <https://doi.org/10.1177/0271678X211045444>
18. Taki J, Sumiya H, Asada N, et al (1998) Assessment of P-glycoprotein in patients with malignant bone and soft-tissue tumors using technetium-99m-MIBI scintigraphy. *J Nucl Med* 39:1179–1184

19. Feldmann M, Asselin M-C, Liu J, et al (2013) P-glycoprotein expression and function in patients with temporal lobe epilepsy: a case-control study. *Lancet Neurol* 12:777–785.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70109-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70109-1)

Figures

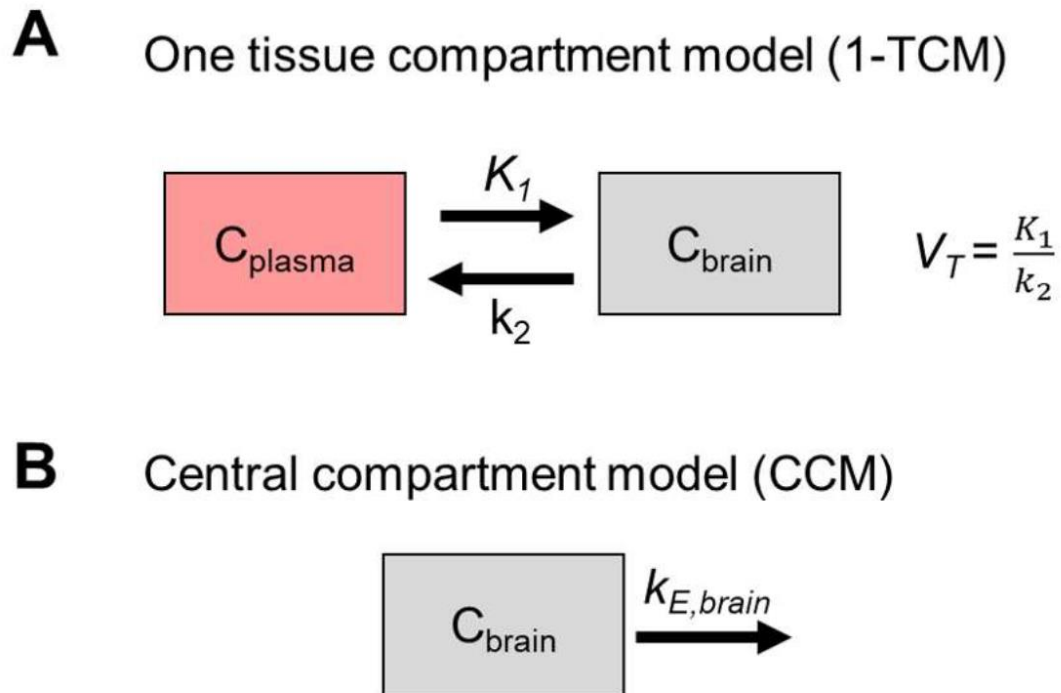


Figure 1

In A, the one tissue compartment model (1-TCM), used to describe [^{11}C]metoclopramide distribution across the BBB, is shown. In B, the central compartment model (CCM) used to determine the elimination rate constant from the brain ($k_{E,brain}$) is shown. C_{plasma} and C_{brain} represent plasma and brain concentrations of parent [^{11}C]metoclopramide, K_1 is the plasma-to-brain influx rate constant, k_2 is the brain-to-plasma efflux rate constant and V_T is the total volume of distribution.

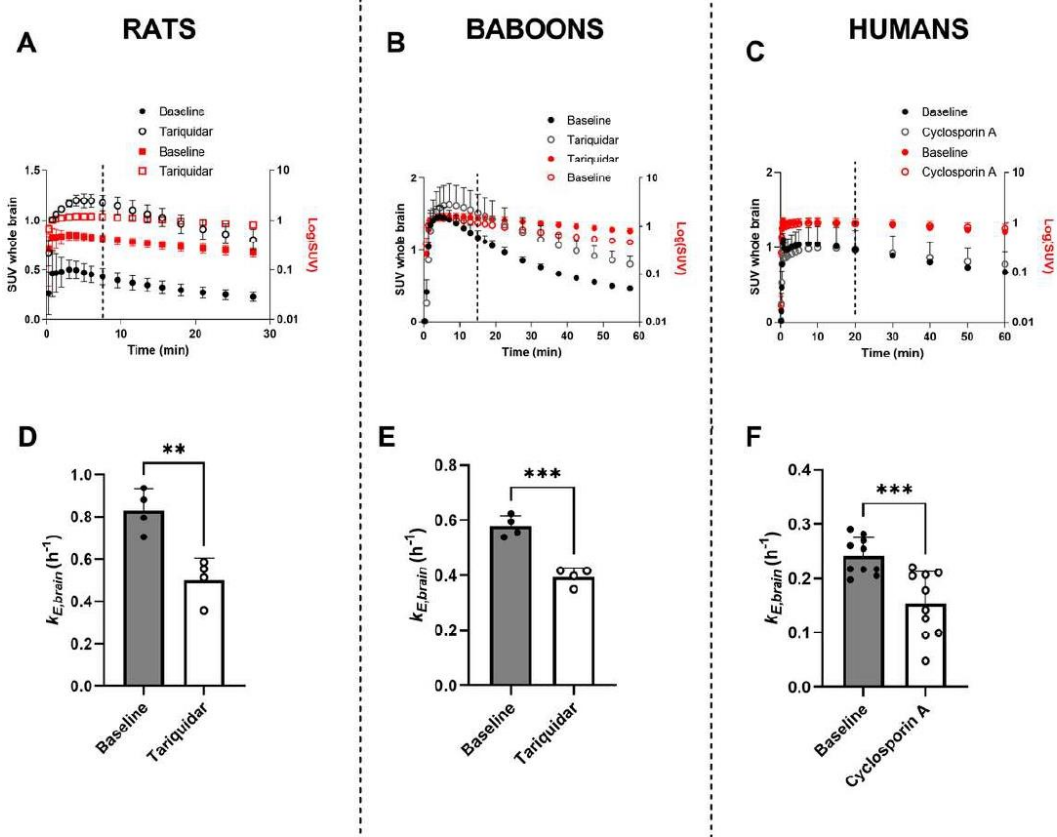


Figure 2

Mean time-activity curves $[^{11}C]$ metoclopramide in the brain obtained under baseline and P-gp inhibited conditions using either linear (black) or logarithmic (red) scales for rats (A), baboons (B) and humans (C). $k_{E,brain}$ values obtained under baseline and P-gp inhibited conditions (tariquidar or cyclosporine A) are shown in D for rats (n=4), E for baboons (n=4), and F for humans (n=10). Data are given as mean \pm SD. ***p<0.001, **p<0.01, unpaired or paired Student's t-test

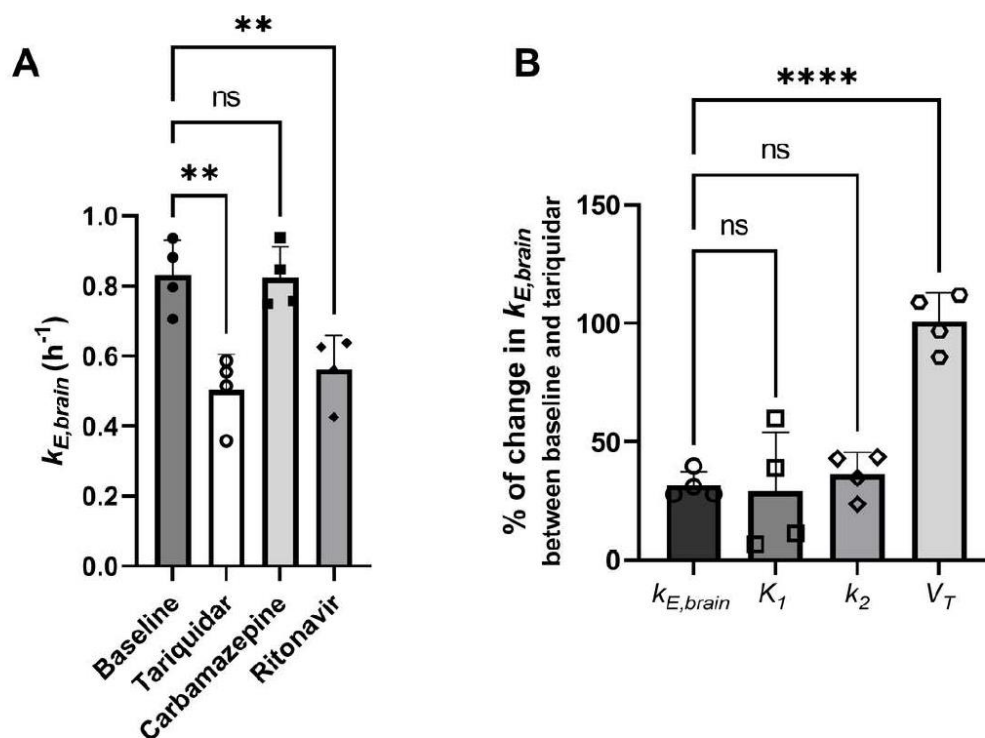


Figure 3

In A, $k_{E,brain}$ values are shown for untreated (baseline) and tariquidar-, carbamazepine- and ritonavir-treated rat groups. In B, the percentage change of modeling-derived parameters (V_T , K_1 , k_2) after P-gp inhibition relative to baseline scans is compared with $k_{E,brain}$ in baboons. ns, not significant, **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA with a Dunett's posthoc test

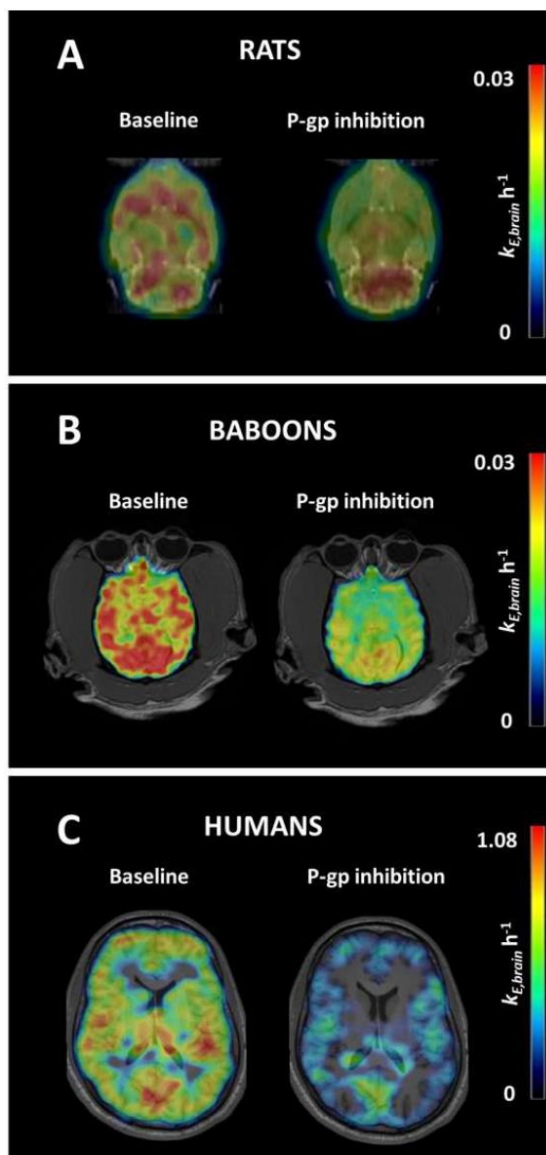


Figure 4

Representative $K_{E,brain}$ -maps under baseline and P-gp inhibited conditions for rats (A), baboons (B), and humans (C).

8.4.3 Données complémentaires

8.4.3.1 Évaluation du muscle temporal comme région de référence

Dans un premier temps, il a été envisagé d'utiliser une région extra-cérébrale, le muscle temporal, comme région de référence pour estimer la fonction de la P-gp au niveau de la BHE. Cette approche se base sur une étude menée par Y. Cui et al. en 2019, qui ont introduit la notion de coefficient de partition entre le cerveau et le muscle ($K_{p, \text{brain/muscle}}$). Dans cette étude, les chercheurs ont montré que les fractions liée et libres, c'est-à-dire la fixation non-spécifiques de 64 composés différents, sont très similaires dans le muscle et le cerveau. En faisant l'hypothèse que le transport d'efflux n'existe pas au niveau de l'interface sang/muscle, ces chercheurs ont proposé d'utiliser le rapport cerveau/muscle comme alternative au rapport cerveau/plasma (Cui et al. 2019). Selon cette hypothèse, la fixation dans le muscle correspondrait à la fixation totale dans le cerveau en l'absence de BHE fonctionnelle, ce qui permettrait d'estimer le transport par la P-gp.

Certains muscles de la tête sont dans le champ de vue des TEP cérébrales. En partant des mêmes hypothèses et en adaptant cette méthode à l'imagerie TEP au [^{11}C]métoclopramide, le coefficient de partition entre le cerveau et le muscle temporal, $\text{AUC}_{\text{cerveau/muscle}}$ a été calculé sur des images obtenues chez l'Homme avant et après inhibition de la P-gp par la ciclosporine. $\text{AUC}_{\text{cerveau/muscle}}$ correspondant au rapport des aires sous la courbe des courbes temps/activité entre le cerveau (matière grise uniquement) et le muscle temporal. Les $\text{AUC}_{\text{cerveau/muscle}}$ et comparés à l'aide d'un test de Student sur données appariées ($p < 0.05$). Les analyses ont été évaluées sur un échantillon de quatre patients. Contrairement aux PNH, chez qui les muscles temporaux sont clairement visibles sur les images TEP, la localisation et le détourage des muscles temporaux chez l'Homme a nécessité l'utilisation de l'IRM. Aussi, le dessin de toutes les régions d'intérêt dans le muscle a été réalisé manuellement.

Les résultats n'ont pas montré de différence significative entre les $\text{AUC}_{\text{cerveau/muscle}}$ avant et après inhibition de la P-gp par la ciclosporine (Figure 29). En revanche, une différence notable a été constatée pour les $\text{AUC}_{\text{cerveau/plasma}}$ chez les mêmes individus. Il en a été conclu que les $\text{AUC}_{\text{cerveau/muscle}}$ ne permettent pas d'estimer correctement la fonction de la P-gp au niveau de la BHE. Il était donc nécessaire de rechercher un autre paramètre permettant d'évaluer la fonction de la P-gp sans nécessiter des prélèvements artériels. C'est pourquoi la méthode utilisant le $K_{E, \text{brain}}$ a été développée dans l'Article 4.

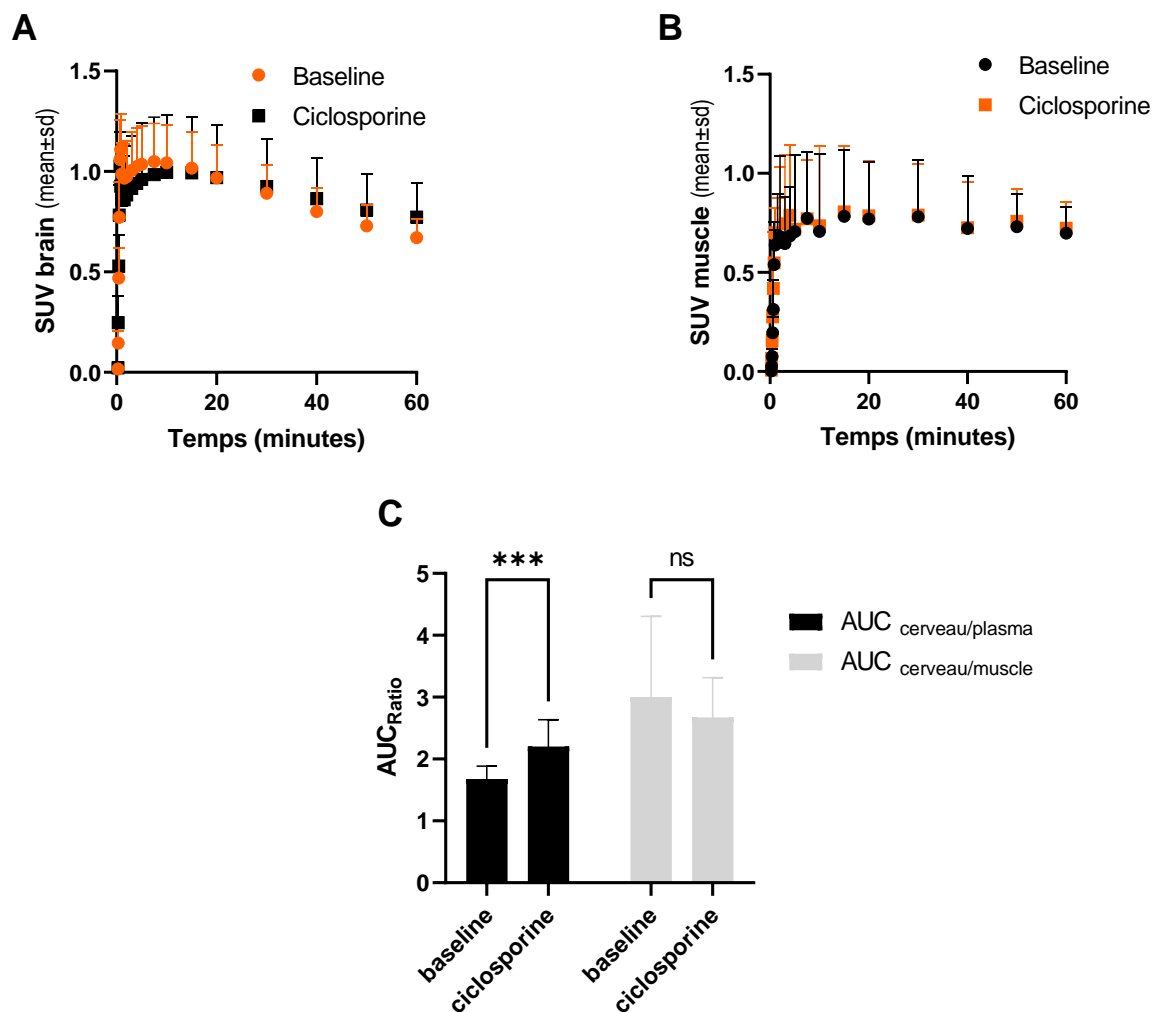


Figure 29 : Etude du muscle temporal comme région de référence chez l'Homme

Les TAC cérébrales (A) et musculaires (B) sont représentées avant et après inhibition de la P-gp par la cyclosporine. En C, la comparaison des AUC_{ratio} est représentée. *** = $p < 0.001$, ns = non significatif.

8.4.3.2 Réalisation de cartes paramétriques de $K_{E,brain}$ sur les images du protocole EPIFLUX

Les premières images de volontaires sains et de patients du protocole EPIFLUX nous ont permis de tester cette approche pour modéliser et représenter la fonction de la P-gp au niveau de la BHE chez les patients atteints d'EPR. La Figure 30 représente une carte paramétrique $K_{E,brain}$ ($K_{E,brain}$ -maps) pour un volontaire sain et un patient atteint d'épilepsie de l'étude EPIFLUX.

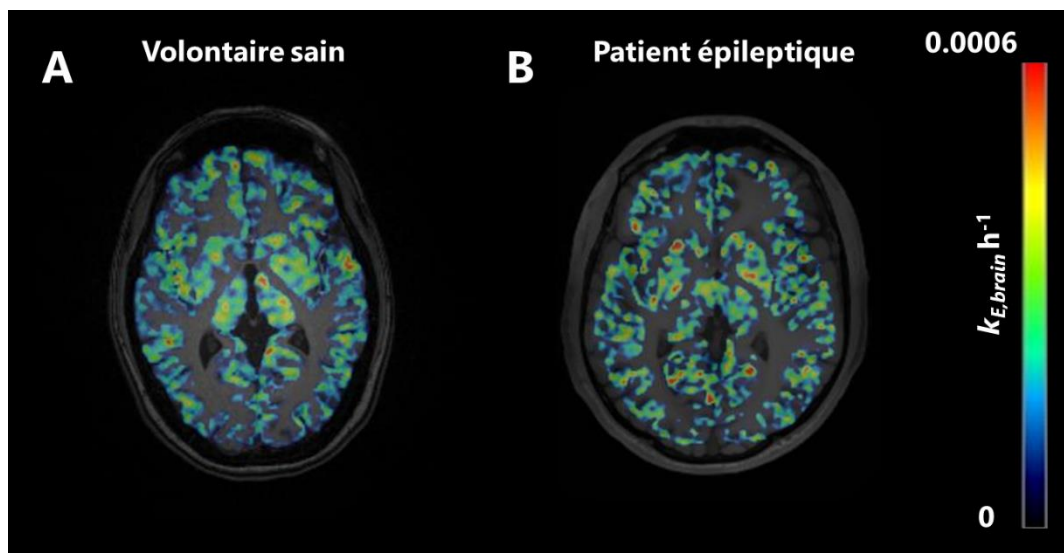


Figure 30 : $K_{E,brain}$ -maps chez deux sujets de l'étude EPIFLUX.

En A un volontaire sain et en B un patient épileptique.

Visuellement il n'est pas possible de distinguer ces deux $K_{E,brain}$ -maps. Cependant, cette approche paramétrique devra être appliquée à l'ensemble des volontaires sains pour pouvoir étudier les spécificités des cartes paramétriques obtenues chez chaque patient ou chaque groupe de patients. De plus, ces cartes paramétriques pourront être utilisées pour réaliser une comparaison voxel-à-voxel grâce à un logiciel dédié (SPM, *statistical parametric mapping*), ce qui n'est pas possible avec les images dynamiques. Cela devrait permettre, avec plus de précision que l'analyse visuelle, d'identifier et de localiser des régions avec une activité de la P-gp induite ou diminuée par rapport à la base de volontaires sains.

8.4.4 Conclusions et perspectives

Le travail préliminaire au traitement des données du protocole clinique EPIFLUX a permis de définir et d'évaluer un nouveau paramètre, nommé $K_{E,brain}$, pour estimer l'activité de la P-gp au niveau de la BHE sans nécessiter de cathétérisme artériel. Ce paramètre et cette méthode tirent avantage des caractéristiques pharmacocinétiques spécifiques du $[^{11}\text{C}]$ métoclopramide. Il s'agit de surcroît d'une méthode de quantification qui ne nécessite pas de définir une fonction d'entrée artérielle dérivée de l'image (IDIF). Ainsi, cette méthode est plus proche de la pratique clinique en médecine nucléaire.

En effet, la réalisation d'une IDIF présente certaines difficultés, notamment la segmentation de l'artère carotide pour extrapoler la cinétique artérielle du radiotraceur au niveau de cette artère.

De plus, l'artère carotide étant un gros vaisseau soumis à une pression artérielle, elle se déforme au fil de l'acquisition des données d'imagerie, ce qui en complique la délimitation. Pour limiter cet effet dynamique, une approche consiste à sélectionner la partie située entre les structures osseuses des pyramides pétreuses, en utilisant des techniques avancées de correction de mouvement et de volume partiel (Traub-Weidinger et al. 2020). Cette technique sera aussi testée sur les sujets participant au protocole EPIFLUX et validée sur certains sujets sains et patients chez qui des prélèvements artériels ont été réalisés. En parallèle, le paramètre $K_{E,brain}$ sera utilisé chez des patients et des cartes paramétriques appelées $K_{E,brain}$ -maps seront générées pour chaque sujet.

L'utilisation du paramètre $K_{E,brain}$ présente néanmoins certaines limites. Tout d'abord, son utilisation est limitée au radiotracer $[^{11}C]$ métoclopramide. Aussi, sa sensibilité aux variations d'activité de la P-gp semble moins importante que le paramètre de référence, le V_T . Enfin, malgré la faible sensibilité du $[^{11}C]$ métoclopramide à l'induction et à l'inhibition enzymatique observée jusqu'alors chez l'animal et chez les patients atteints d'EPR, on ne peut pas exclure la possibilité d'une modification majeure de la cinétique périphérique du $[^{11}C]$ métoclopramide chez certains sujets. Les répercussions d'un tel changement sur l'estimation du $K_{E,brain}$ ne sont pas connues. Il serait judicieux de définir un paramètre de contrôle, qui pourrait être issu de prélèvements veineux plus accessibles, afin de définir et valider les conditions d'application du $K_{E,brain}$.

L'utilisation du muscle temporal comme région de normalisation n'a pas permis de mettre en évidence une influence de la ciclosporine sur le passage cérébral du $[^{11}C]$ métoclopramide. En revanche, cette méthode avait pu être testée et validée chez le PNH avec le $[^{11}C]$ erlotinib, un substrat de la P-gp et de la BCRP (Tournier et al. 2017). Cependant, avec ce radiotracer, l'intensité maximale du signal mesuré au niveau cérébral après inhibition de la P-gp, correspond au signal musculaire. Pour le $[^{11}C]$ métoclopramide, le signal cérébral est supérieur au signal musculaire lorsque la P-gp est inhibée au niveau de la BHE humaine.

Une autre difficulté devra être anticipée pour la quantification de la fonction de la P-gp par imagerie TEP au $[^{11}C]$ métoclopramide au niveau de la BHE chez des patients atteints d'EPR. En effet le $[^{11}C]$ métoclopramide se fixe substantiellement dans les plexus choroïdes. Ce signal

pourrait introduire un biais dans la quantification de la radioactivité dans les régions adjacentes. Cela pourrait notamment concerner l'hippocampe qui est une structure souvent atteinte dans les cas d'EPR.

D'autres approches ont été testées pour quantifier l'augmentation de la fonction de la P-gp au niveau de la BHE dans le cadre de l'épilepsie. Par exemple, un article de Shin et al. utilise l'asymétrie de la fixation du [^{11}C]vérapamil en présence d'une inhibition partielle de la P-gp par la ciclosporine chez des patients atteints d'EPR (Shin et al. 2016). Cette approche pourrait être réalisée pour les données du protocole EPIFLUX car nous disposons de données TEP et IRM acquises de manière simultanées. Néanmoins, cette approche semi-quantitative implique un *a priori* sur la localisation des lésions et ne permettrait pas de détecter une modulation globale de la P-gp dans l'ensemble du cerveau.

9 DISCUSSION GENERALE

L'imagerie moléculaire a pour objectif de permettre une visualisation voire une quantification de processus biologiques qui ont lieu à l'échelle moléculaire ou cellulaire. L'imagerie TEP, de par sa résolution spatiale de plusieurs millimètres, permet d'apprécier la globalité de ces processus biologiques à l'échelle d'un tissu comme, par exemple, dans l'ensemble ou dans certaines régions du cerveau. Cette technique nécessite le développement de radiopharmaceutiques spécifiques qui permettent une meilleure compréhension des interactions moléculaires impliquées dans certaines voies de signalisation ou métabolique. L'imagerie TEP utilisant des molécules radiomarquées permet également d'étudier les paramètres qui régissent la distribution de médicaments et xénobiotiques. C'est ce qu'on appelle l'imagerie pharmacocinétique (Tournier et al. 2018). Cette approche innovante, qui nécessite un équipement et une expertise rares, présente l'avantage considérable de permettre d'étudier la pharmacocinétique de médicaments au niveau d'organes cible ou vulnérables de manière non-invasive, chez l'animal comme chez l'Homme.

Les travaux pionniers, initiés par de nombreuses équipes pour l'étude de la P-gp au niveau de la BHE, ont largement contribué au développement de l'imagerie pharmacocinétique (Mairinger et al. 2011). En effet, en 2005, l'imagerie TEP au [^{11}C]vérapamil avait permis de montrer, pour la première fois chez l'Homme, l'importance de la P-gp sur le passage des médicaments au travers de la BHE (Sasongko et al. 2005). Néanmoins, avec le recul scientifique dont nous disposons aujourd'hui, l'utilisation du [^{11}C]vérapamil comme substrat de la P-gp présente d'importants inconvénients qui ne permettent pas d'apprécier la complexité du rôle de la P-gp au niveau de la BHE. Ces observations ont motivé le développement de radiotraceurs alternatifs permettant d'étudier la fonction d'efflux au niveau de la BHE, l'imagerie TEP restant la technique de choix (Tournier et al. 2018). Les innovations en termes de développement de radiotraceurs bénéficient en premier lieu des progrès de la radiochimie qui permettent un accès à une variété toujours plus grande de composés radiomarqués. C'est le cas pour la [^{11}C]dompéridone, dont le radiomarquage a été possible que grâce au développement d'une approche de radiochimie innovante (Del Vecchio et al. 2018). En parallèle, ces progrès bénéficient de l'amélioration des connaissances de la cible moléculaire et de son interaction avec les ligands pharmacologiques. Pour cela des critères pharmacologiques doivent être établis afin de choisir la

sonde « idéale » pour l'imagerie fonctionnelle d'une cible biologique particulière comme la P-gp (Kannan et al. 2013). L'utilisation d'inhibiteurs de P-gp radiomarqués pour mesurer l'expression de la protéine au niveau de la BHE n'a pas abouti. En effet, les inhibiteurs radiomarqués se sont révélés être aussi des substrats de la P-gp à dose traceuse (faible dose) si bien que le signal TEP cérébral dépendait plutôt de l'activité d'efflux que de la densité de la P-gp au niveau de la BHE (Wanek et al. 2013). De plus, nos travaux et ceux d'autres équipes suggèrent que la corrélation entre l'expression et l'activité de la P-gp au niveau de la BHE n'est pas linéaire (Kalvass et al. 2013). Ainsi, nos travaux suggèrent que les radiotraceurs « avides », qui présentent une réponse particulièrement importante à l'inhibition maximale de la P-gp, ne permettent pas nécessairement de gagner en sensibilité vis-à-vis de faible changement d'activité de la P-gp (Breuil, Goutal, et al. 2022). Cette nouvelle donnée semble particulièrement importante et constitue un critère de choix déterminant pour le développement de nouvelle sonde des transporteurs d'efflux comme la P-gp, quelles qu'en soient les applications précliniques ou cliniques.

Ce travail de thèse avait pour objectif initial de valider de choix de l'utilisation d'un nouveau radiopharmaceutique, le [^{11}C]métoclopramide, développé au sein du laboratoire BioMaps, pour évaluer le transport d'efflux de la P-gp au niveau de la BHE comme un potentiel biomarqueur de l'EPR. Des travaux préliminaires avaient déjà montré les caractéristiques favorables du [^{11}C]métoclopramide, notamment en termes de spécificité pour la P-gp et de pureté radiochimique du signal TEP cérébral (Pottier et al. 2016; Auvity et al. 2018; Tournier et al. 2019). Cependant, à notre connaissance, seul le [^{11}C]vérapamil a fait l'objet d'étude dans le contexte très spécifique de l'EPR (Feldmann M. et al. 2013; Shin et al. 2016). Aussi, bien que le [^{11}C]NdLop possède des caractéristiques avantageuses par rapport au [^{11}C]vérapamil, notamment en termes de stabilité métabolique (Seneca et al. 2009), peu d'études cliniques utilisant ce radiopharmaceutique ont été réalisées. Le [^{11}C]NdLop a uniquement été étudié chez des volontaires sains, et jamais chez des patients atteints d'épilepsie (Kreisl et al. 2010). Aussi, on peut légitimement se demander si les critères établis (Kannan et al. 2009) sont suffisants pour déterminer le choix d'un radiotraceur pour une utilisation clinique dans un contexte pathologique.

En plus des critères définis par Kannan en 2009, d'autres critères, plus généraux concernant les sondes d'imagerie doivent être pris en compte. Tout d'abord, le choix du radionucléide qui va déterminer la technique d'imagerie utilisée et le type de radiochimie associée. Concernant les sondes P-gp, le carbone-11 a été utilisé pour tous les radiotraceurs P-gp validés chez l'Homme

(Sasongko et al. 2005; Kreisl et al. 2010; Tournier et al. 2019). En effet, le carbone-11 permet de réaliser un marquage isotopique, en remplaçant un atome de carbone stable de la molécule (carbone-12) par son isotope radioactif émetteur de positons. De cette façon, les sondes P-gp correspondent à des médicaments radiomarqués (pour le [^{11}C]vérapamil et le [^{11}C]métoclopramide) ou à leur métabolite (pour le [^{11}C]NdLop) dont la toxicité, la tolérance clinique et la pharmacocinétique sont parfaitement connues. Aussi, d'un point de vue réglementaire, le fait que les molécules radiomarquées soient des analogues de médicaments connus facilite grandement leur utilisation chez l'Homme en tant que radiopharmaceutiques expérimentaux. En effet, il n'est pas nécessaire de produire de nouvelles données de toxicologie préclinique dans ce contexte, ce qui réduit les coûts et accélère le développement clinique de ces radiotraceurs (Burt et al. 2020). L'immense majorité des principes actifs présentent un atome de carbone dans leur structure. En théorie, et dans la limite de la faisabilité technique du radiomarquage, le carbone-11 offre un potentiel de repositionnement de molécules thérapeutiques en radiopharmaceutique considérable.

L'utilisation de radionucléides émetteurs de rayonnements (rayonnement β^+) permet la réalisation d'une acquisition tomographique TEP, et donc la quantification absolue de la radioactivité volumique cérébrale (Tournier et al. 2018). Cette approche, combinée à la quantification absolue de la fonction d'entrée, permet de réaliser une imagerie paramétrique quantitative avec des performances qui, à ce jour, ne sont pas atteintes par d'autres modalités d'imagerie médicales comme la tomographie d'émission mono-photonique (TEMP) ou l'IRM. Par ailleurs, l'utilisation du carbone-11, du fait de sa courte période physique (20,4 minutes), constitue un avantage dosimétrique et permet d'envisager de réaliser deux examens successifs chez un même sujet au cours d'une même journée (Marie et al. 2022). Dans le cadre de l'imagerie de la P-gp, il a ainsi été possible d'acquérir des données TEP avant et après inhibition pharmacologique de la P-gp. Néanmoins, l'utilisation du carbone-11 est réservée à quelques centres experts équipés d'un cyclotron, ce qui limite considérablement la dissémination de la technique, notamment dans les services de médecine nucléaire conventionnels. De ce point de vue, le radiomarquage au fluor-18, qui possède une période physique de 110 minutes, possède un avantage pour les applications cliniques à plus large échelle. Il faut toutefois noter que le métoclopramide ne possède pas de fluor dans sa structure et que l'introduction d'un fluor-18 aboutirait à un dérivé dont les propriétés et l'innocuité devraient être démontrées. Ainsi, une approche

séquentielle, utilisant dans un premier temps le radiomarquage au carbone-11 pour établir une preuve de concept clinique, suivie dans un second temps du développement d'un radiotraceur dérivé marqué au fluor-18, pourrait être envisagée si la preuve de concept suscite un besoin clinique.

Concernant spécifiquement l'imagerie de la P-gp dans le contexte de l'EPR, le [^{11}C]métoclopramide possède l'avantage, par rapport au [^{11}C]vérapamil et au [^{11}C]NdLop, de pouvoir détecter une induction fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE, ce qui a été démontrée chez la souris (Zoufal et al. 2019). Le [^{11}C]métoclopramide est un substrat dit « faible » de la P-gp, qui possède un passage cérébral substantiel en condition basale (Tournier et al. 2019). Cela permet de détecter une diminution du signal cérébral associé à une augmentation fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE. Cependant, le [^{11}C]vérapamil avait pu mettre en évidence, de façon indirecte, une induction fonctionnelle de la P-gp chez des patients atteints d'EPR, en montrant une réponse atténuée à l'inhibition de la P-gp au niveau des foyers épileptogènes de patient atteints d'EPR (Feldmann M. et al. 2013). Ce type de protocole a apporté la preuve de concept concernant l'induction fonctionnelle de la P-gp dans l'EPR, mais reste difficilement réalisable en recherche clinique. En effet, les formulations pharmaceutiques de tariquidar, utilisées pour l'inhibition partielle de la P-gp, ne sont plus disponibles pour usage humain. L'utilisation d'un inhibiteur alternatif et disponible, tel que la ciclosporine A, entraîne un risque d'interaction médicamenteuse car elle est susceptible de modifier le métabolisme du [^{11}C]vérapamil ce qui pourrait introduire un biais compte tenu de la forte prévalence de radiométabolites dans le cerveau pour ce radiotraceur (Luurtsema et al. 2005). Néanmoins, la capacité du [^{11}C]métoclopramide à détecter une induction fonctionnelle dans le contexte de l'EPR reste à être démontrée, ce dernier point faisant l'objet du protocole EPIFLUX.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à comparer les radiopharmaceutiques actuellement disponible comme sonde P-gp chez l'Homme au regard d'un nouveau critère : la vulnérabilité à l'inhibition. Ce critère se définit comme la réponse, en termes de rehaussement du signal, à une inhibition pharmacologique partielle de la P-gp. Nous pensons que ce critère, qui peut être facilement évalué *in vitro* et *in vivo* chez l'animal (Breuil, Marie, et al. 2022), traduit la capacité des différents traceurs à générer du signal en présence d'un faible changement d'activité de P-gp. En cela, ce critère résulte d'un compromis entre l'avidité du radiotraceur, et

sa sensibilité intrinsèque à l'inhibition. Notre étude a permis de montrer une vulnérabilité particulièrement importante du [^{11}C]métoclopramide par rapport au [^{11}C]vérapamil et au [^{11}C]NdLop. Cette observation a permis de lever une inquiétude quant à la capacité du [^{11}C]métoclopramide, qualifié de « faible substrat », à détecter de fines modulations de l'activité de la P-gp selon les critères proposés par Kannan (Kannan et al. 2009). Cela a encouragé le développement clinique du [^{11}C]métoclopramide en vue de son utilisation chez les patients atteints d'EPR.

Une des limites potentielles à l'utilisation d'analogues de principe actif pour l'étude de la P-gp cérébrale concerne la possibilité d'une fixation spécifique du radiotraceur sur sa cible pharmacologique, ce qui pourrait introduire un biais dans l'étude de la P-gp. Il faut toutefois noter que cette limite existe également pour de nouvelles molécules dont le profil des récepteurs n'a pas été étudié (Pike 2009). Le métoclopramide est un antagoniste connu des récepteurs dopaminergique D_2 , et il présente une affinité moindre pour les récepteurs sérotoninergiques 5-HT_3 et 5-HT_4 (Sanger 2009). La cinétique cérébrale du [^{11}C]métoclopramide a été étudiée en présence d'une co-injection de métoclopramide non-radiomarké à dose pharmacologique de 3 mg/kg chez le rat (Pottier et al. 2016), et de 10 mg chez l'Homme (M. Bauer et al. 2021), ce qui n'a pas mis en évidence de réversibilité de la fixation cérébrale. On peut donc considérer que la fixation cérébrale du [^{11}C]métoclopramide est irréversible et non-spécifique. En cela, le [^{11}C]métoclopramide se distingue du [^{11}C]raclopride, pourtant chimiquement proche, qui présente une affinité suffisante, avec une fixation non-spécifique probablement plus faible, et permet de réaliser une imagerie des récepteurs D_2 (Ikoma et al. 2022). Les mécanismes impliqués dans la fixation cérébrale du [^{11}C]métoclopramide ne sont pas connus. Néanmoins, il ne semble pas qu'elle soit due à une séquestration lysosomale irréversible, comme c'est le cas pour le [^{11}C]NdLop (Kannan et al. 2011), car il est possible d'observer un efflux du cerveau vers le sang qui est représenté par le k_2 ou le $K_{E,\text{brain}}$ avec le [^{11}C]métoclopramide (Tournier et al. 2019) (Article 4). Cette observation renforce la spécificité du [^{11}C]métoclopramide vis-à-vis de la P-gp.

Le paramètre de potentiel de fixation (Binding Potential, BP), utilisé pour décrire l'interaction d'un radioligand avec sa cible, correspond à la nomenclature d'étude des récepteurs (Pike 2009). Aussi, l'interaction du [^{11}C]métoclopramide avec la P-gp ne saurait être décrite par les mêmes constantes d'affinité (K_D) ou de densité de la cible (B_{max}) qu'un ligand de neurorécepteur. Dans le cas des radiotraceurs de la P-gp, il semble que le rehaussement du signal suite à

une inhibition correspond à la capacité totale de transport (ER pour efflux ratio) et à la puissance de l'inhibiteur vis-à-vis du substrat étudié (IC_{50}). La pertinence d'un paramètre composite (ER/IC_{50}) pour prédire la réponse à l'inhibition reste à être évaluée pour l'étude de traceurs des transporteurs en général. Il est possible que les paramètres ER et IC_{50} n'influent pas de manière parallèle sur le rehaussement du signal. Par exemple, la [^{11}C]dompéridone souffre d'un IC_{50} particulièrement élevé qui la rend particulièrement peu vulnérable à l'inhibition par le tariquidar. Ainsi, on peut faire l'hypothèse d'une sensibilité médiocre de la [^{11}C]dompéridone à de faibles changement d'activité de la P-gp, ce qui réduit considérablement son intérêt pour de prochaines études. Dans ce projet de thèse, quatre radioligands différents ont été comparés dans des conditions standardisées. Aussi, cette première étude n'a pas permis de montrer de corrélation entre l'ER et la IC_{50} (Figure 27). Cela nécessite une confirmation sur un plus grand nombre de substrats afin de savoir s'il existe une corrélation inverse entre la vulnérabilité à l'inhibition et la capacité de transport. D'un point de vue moléculaire, on peut toutefois faire l'hypothèse d'une affinité différente des substrats pour le site de transport de la P-gp, qui pourrait influencer sur la réversibilité de la fixation et conditionner la sensibilité à l'inhibition et/ou la capacité de transport.

Le radiomarquage de la dompéridone au carbone-11 a été développé à l'instar du [^{11}C]métoclopramide par l'équipe de radiochimie du laboratoire BioMaps. Les résultats ont été décevants et n'ont pas montré d'avantage de ce nouveau radiotraceur par rapport au [^{11}C]métoclopramide pour l'imagerie de la P-gp. Néanmoins, d'un point de vue thérapeutique, les résultats ont permis la comparaison des répercussions neuropharmacocinétiques de l'inhibition de la P-gp au niveau de la BHE entre deux médicaments de la même classe pharmacologique, puisque la dompéridone et le métoclopramide sont tous les deux des antiémétiques. Ces travaux précliniques suggèrent qu'il n'y a pas de lien direct entre le caractère averse d'un substrat de la P-gp et l'augmentation du risque d'interaction médicamenteuse médiée par les inhibiteurs de la P-gp. Néanmoins, le risque d'interaction médicamenteuse pourrait dépendre du couple substrat/inhibiteur de la P-gp, et conditionner la vulnérabilité, l'intensité et les répercussions pharmacologiques de l'interaction (Breuil, Goutal, et al. 2022). Toutefois, lors du développement d'une nouvelle molécule candidat médicament, il n'est pas envisageable de tester toutes les

combinaisons substrat/inhibiteur possibles. On pourrait cependant imaginer un panel de substrats de sensibilité différentes pour apprécier le risque d'interactions médicamenteuses impliquant la P-gp avec une meilleure acuité.

L'influence des comédications sur la cinétique sanguine et cérébrale du [^{11}C]métoclopramide a été étudiée chez le rat et suggère une faible sensibilité à la modulation des CYP. Cependant, les résultats obtenus chez le rat ne peuvent pas être entièrement prédictifs des résultats de l'étude clinique. Il existe des différences importantes entre CYPs humain et du rongeur (Baillie et al. 2011), avec des différences de métabolisme des médicaments concomitant et du radiopharmaceutique lui-même (M. Bauer et al. 2012). Bien que rassurante quant à l'influence de la carbamazépine sur la cinétique du [^{11}C]métoclopramide, ce résultat encourageant a dû être vérifié sur les données cliniques. L'analyse préliminaire des données de l'étude EPIFLUX n'a pas montré de différence significative de métabolisme du [^{11}C]métoclopramide entre les patients traités et les volontaires sains. Néanmoins, ces données restent très incomplètes, avec peu de patients traités par des médicaments inducteurs enzymatiques, ce qui correspond aux molécules antiépileptiques modernes (Figure 28).

Ainsi, les critères du « radiopharmaceutique idéal » pour mesurer l'activité de la P-gp au niveau de la BHE proposés par Kannan et ses collègues en 2009 peuvent être complétés en regard de l'évolution des connaissances de la P-gp. Aussi, nos données suggèrent que ces critères doivent être adaptés en fonction de la situation physiopathologique étudiée. Le Tableau 4 présente les avantages (+) et les inconvénients (-) du [^{11}C]métoclopramide vis-à-vis de l'étude fonctionnelle de la P-gp dans le contexte d'EPR.

Tableau 4 : Critères du radiopharmaceutique idéal pour l'étude fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE adaptés de Kannan et al., 2009 et appliqués au [¹¹C]métoclopramide mettant en évidence les avantages (+) et les inconvénients (-) du [¹¹C]métoclopramide dans l'imagerie fonctionnelle de la P-gp au niveau de la BHE chez des patients atteints d'EPR

Radiotracteur TEP	+
Radiomarquage isotopique	++
Dosimétrie	++
Période physique	-
Spécificité	++
Pureté radiochimique	+++
Amplitude du signal	+
Vulnérabilité	++
Métabolisme	+++
Capacité à détecter une induction	+++

On peut légitimement supposer que ces nouveaux critères pourraient être utiles au développement de radiotraceurs d'autres transporteurs. C'est le cas par exemple pour la BCRP, pour lequel il n'existe pas aujourd'hui de radiotracteur spécifique (Hosten et al. 2013). Ces critères pourraient également concerner les transporteurs d'influx, qui sont principalement de la famille des SLC (Marie et al. 2022).

Ce travail de thèse illustre le potentiel translationnel de l'imagerie TEP. Aussi, les données acquises chez l'Homme bénéficient de travaux précliniques *in vitro* ou chez l'animal qui peuvent être réalisés à postériori, et offrir une interprétation moléculaire des données

d'imagerie. Cependant, les contraintes imposées à l'animal, et notamment le prélèvement d'une fonction d'entrée artérielle, ne sont pas toujours envisageable chez les patients. Pour cela, nous avons évalué un nouveau critère, le $k_{E,brain}$, pour l'interprétation des données TEP au [^{11}C]métoclopramide à partir des seules images dynamiques, sans recours à des prélèvements artériels. Les limites de cette approche, décrites dans l'Article 4, sont nombreuses et on peut considérer qu'il s'agit plus d'une approximation que d'une quantification absolue du transport par la P-gp comme pourrait le faire une modélisation compartimentale. Aussi, nous ne connaissons pas aujourd'hui la capacité du $k_{E,brain}$ à détecter une induction fonctionnelle et focale chez les patients atteints d'EPR. La pertinence du $k_{E,brain}$ ne saurait donc se substituer à l'approche de modélisation conventionnelle sans plus ample validation, idéalement chez les sujets pour lesquels nous disposons d'une fonction d'entrée.

La variabilité de la réponse aux médicaments agissant sur le système nerveux central pourrait être, du moins en partie, liée à l'implication de la P-gp (M. Bauer et al. 2019; Chaves et al. 2017), ce qui est encore peu pris en compte en neuropharmacologie, hormis pour les médicaments antiépileptiques (§7.8). Aussi, les propriétés neuropharmacocinétiques du métoclopramide le rapprochent des médicaments à visée neurologique qui sont de faibles substrats de la P-gp. Les résultats obtenus avec le [^{11}C]métoclopramide chez l'Homme, interrogent sur l'hypothèse des transporteurs proposée pour expliquer la pharmaco-résistance. En effet, les données obtenues chez l'Homme, chez qui l'expression protéique de la P-gp est environ 10 fois plus faible que chez le rat, montrent un effet significatif, mais de faible intensité (Uchida, Ohtsuki, Katsukura, et al. 2011; Al Feteisi et al. 2018). Compte tenu de l'adaptation possible des doses administrées, cette observation n'est pas en accord avec le concept de pharmaco-résistance ou MDR tel qu'il est observé en oncologie avec des substrats particulièrement avides de la P-gp. Nos observations chez les patients atteints d'EPR nous permettront peut-être de montrer une augmentation fonctionnelle de la P-gp chez ces patients. Néanmoins, compte tenu des faibles répercussions pharmacocinétiques de la P-gp sur l'exposition cérébrale, il est peu probable que nos résultats soutiennent l'hypothèse d'un lien causal entre l'activité de la P-gp et le manque d'efficacité des médicaments antiépileptiques. Toutefois, au regard des données histologiques et d'imagerie disponibles, on peut penser qu'il existe une corrélation entre l'EPR et l'expression de la P-gp (M. Bauer et al. 2014). Ainsi, l'imagerie TEP au [^{11}C]métoclopramide

pourrait permettre d'envisager la P-gp comme biomarqueur de l'épilepsie ou de la pharmacorésistance, sans nécessairement établir de lien causal neuro-pharmacocinétique.

10 CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse a permis d'améliorer les connaissances sur les radiotraceurs de la P-gp et d'initier l'étude de la fonction de la P-gp comme biomarqueur de l'EPR. Ce travail s'inscrit dans le contexte global de la recherche sur l'imagerie moléculaire et cherche à optimiser l'imagerie de la P-gp en affinant les critères de choix des radiotraceurs. Historiquement, les traceurs de la P-gp ont été conçus et évalués en se basant soit sur des critères pharmacocinétiques, soit sur des critères d'imagerie TEP. Cependant, il est nécessaire de développer des critères spécifiques qui prennent en compte la complexité de l'interaction des substrats avec ces transporteurs. Il est fort probable que de plus amples connaissances de la biologie moléculaire des transporteurs puissent orienter encore le choix des radiotraceurs et de sondes dédiées à l'avenir.

À ce jour, il existe un réel besoin de développer des méthodes permettant d'évaluer de manière fiable et peu invasive l'activité de la P-gp au niveau de la BHE chez les patients atteints d'EPR. Cette thèse a permis de rationaliser le choix du [^{11}C]métoclopramide pour étudier la fonction de la P-gp en tant que biomarqueur de l'EPR.

11 BIBLIOGRAPHIE

Abbott, N. J. 2013. « Blood–Brain Barrier Structure and Function and the Challenges for CNS Drug Delivery ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 36 (3): 437-49. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>.

Abbott, N. J., L. Rönnbäck, et E. Hansson. 2006. « Astrocyte–Endothelial Interactions at the Blood–Brain Barrier ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (1): 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>.

Abbott, N. Joan, A.A.K. Patabendige, D.E.M. Dolman, S.R. Yusof, et D.J. Begley. 2010. « Structure and function of the blood–brain barrier ». *Neurobiology of Disease*, Special Issue: Blood Brain Barrier, 37 (1): 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.

Abraham, A., G. Luurtsema, M. Bauer, R. Karch, M. Lubberink, E. Patariaia, C. Joukhadar, et al. 2008. « Peripheral Metabolism of (R)-[11C]Verapamil in Epilepsy Patients ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 35 (1): 116-23. <https://doi.org/10.1007/s00259-007-0556-5>.

Abuznait, A.H., et A. Kaddoumi. 2012. « Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *ACS Chemical Neuroscience* 3 (11): 820-31. <https://doi.org/10.1021/cn300077c>.

Agarwal, S., A.M.S. Hartz, W.F. Elmquist, et B. Bauer. 2011. « Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein in Brain Cancer: Two Gatekeepers Team Up ». *Current Pharmaceutical Design* 17 (26): 2793-2802. <https://doi.org/10.2174/138161211797440186>.

Al Feteisi, H., Z.M. Al-Majdoub, B. Achour, N. Couto, A. Rostami-Hodjegan, et J. Barber. 2018. « Identification and Quantification of Blood–Brain Barrier Transporters in Isolated Rat Brain Microvessels ». *Journal of Neurochemistry* 146 (6): 670-85. <https://doi.org/10.1111/jnc.14446>.

Aller, S.G., J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P.M. Harrell, et al. 2009. « Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding ». *Science* 323 (5922): 1718-22. <https://doi.org/10.1126/science.1168750>.

Ambroziak, K., K. Kuteykin-Teplyakov, C. Luna-Tórtos, M. Al-Falah, M. Fedrowitz, et W. Löscher. 2010. « Exposure to Antiepileptic Drugs Does Not Alter the Functionality of P-Glycoprotein in Brain Capillary Endothelial and Kidney Cell Lines ». *European Journal of Pharmacology* 628 (1): 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.051>.

Ambudkar, S.V., S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, et M.M. Gottesman. 1999. « Biochemical, Cellular, and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 361-98. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>.

Assema, D.M. van, M. Lubberink, P. Rizzu, J.C. van Swieten, R.C. Schuit, J. Eriksson, P. Scheltens, M. Koepp, A.A. Lammertsma, et B.N. van Berckel. 2012. « Blood-Brain Barrier P-Glycoprotein Function in Healthy Subjects and Alzheimer's Disease Patients: Effect of Polymorphisms in the ABCB1 Gene ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research* 2 (1): 57.

<https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-57>.

Auvity, S., F. Caillé, S. Marie, C. Wimberley, M. Bauer, O. Langer, I. Buvat, S. Goutal, et N. Tournier. 2018. « P-Glycoprotein (ABCB1) Inhibits the Influx and Increases the Efflux of ¹¹ C-Metoclopramide Across the Blood–Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates ». *Journal of Nuclear Medicine* 59 (10): 1609-15. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.210104>.

Baillie, T.A., et A.E. Rettie. 2011. « Role of Biotransformation in Drug-Induced Toxicity: Influence of Intra- and Inter-Species Differences in Drug Metabolism ». *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 26 (1): 15-29. <https://doi.org/10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-089>.

Baltes, S., M. Fedrowitz, C.L. Tortós, H. Potschka, et W. Löscher. 2007. « Valproic Acid Is Not a Substrate for P-Glycoprotein or Multidrug Resistance Proteins 1 and 2 in a Number of in Vitro and in Vivo Transport Assays ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320 (1): 331-43. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.102491>.

Baltes, S., A.M. Gastens, M. Fedrowitz, H. Potschka, V. Kaeffer, et W. Löscher. 2007. « Differences in the Transport of the Antiepileptic Drugs Phenytoin, Levetiracetam and Carbamazepine by Human and Mouse P-Glycoprotein ». *Neuropharmacology* 52 (2): 333-46. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.038>.

Banks, W.A., N. Ercal, et T.O. Price. 2006. « The Blood-Brain Barrier in NeuroAIDS ». *Current HIV Research* 4 (3): 259-66. <https://doi.org/10.2174/157016206777709447>.

Bankstahl, J.P., M. Bankstahl, C. Kuntner, J. Stanek, T. Wanek, M. Meier, X.-Q. Ding, M. Müller, O. Langer, et W. Löscher. 2011. « A Novel Positron Emission Tomography Imaging Protocol Identifies Seizure-Induced Regional Overactivity of P-Glycoprotein at the Blood–Brain Barrier ». *The Journal of Neuroscience* 31 (24): 8803-11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6616-10.2011>.

Bankstahl, M., S. Klein, K. Römermann, et W. Löscher. 2016. « Knockout of P-Glycoprotein Does Not Alter Antiepileptic Drug Efficacy in the Intrahippocampal Kainate Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy in Mice ». *Neuropharmacology* 109: 183-95. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.007>.

Baudou, E., A. Lespine, G. Durrieu, F. André, P. Gandia, C. Durand, et S. Cunat. 2020. « Serious Ivermectin Toxicity and Human ABCB1 Nonsense Mutations ». *The New England Journal of Medicine* 383 (8): 787-89. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1917344>.

Bauer, B., A.M.S. Hartz, A. Pekcec, K. Toellner, D.S. Miller, et H. Potschka. 2008. « Seizure-Induced up-Regulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier through Glutamate and Cyclooxygenase-2 Signaling ». *Molecular Pharmacology* 73 (5): 1444-53. <https://doi.org/10.1124/mol.107.041210>.

Bauer, M., K. Bamminger, V. Pichler, M. Weber, S. Binder, A. Maier-Salamon, A. Tahir, et al. 2021. « Impaired Clearance From the Brain Increases the Brain Exposure to Metoclopramide in Elderly Subjects ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 109 (3): 754-61. <https://doi.org/10.1002/cpt.2052>.

Bauer, M., R. Karch, M. Zeitlinger, J. Liu, M.J. Koeppe, M.-C. Asselin, S.M. Sisodiya, et al. 2014. « In Vivo P-Glycoprotein Function before and after Epilepsy Surgery ». *Neurology* 83 (15): 1326-31. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000858>.

Bauer, M., R. Karch, M. Zeitlinger, C. Philippe, K. Römermann, J. Stanek, A. Maier-Salamon, et al. 2015. « Approaching complete inhibition of P-glycoprotein at the human blood–brain barrier: an (R)-[11C]verapamil PET study ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 35 (5): 743-46. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.19>.

Bauer, M., N. Tournier, et O. Langer. 2019. « Imaging P-Glycoprotein Function at the Blood–Brain Barrier as a Determinant of the Variability in Response to Central Nervous System Drugs ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 105 (5): 1061-64. <https://doi.org/10.1002/cpt.1402>.

Bauer, M., M. Zeitlinger, R. Karch, P. Matzneller, J. Stanek, W. Jäger, M. Böhmendorfer, et al. 2012. « P-glycoprotein mediated interaction between (R)-[11C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier studied with positron emission tomography, a comparison with rat data ». *Clinical pharmacology and therapeutics* 91 (2): 227-33. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.217>.

Bazzoni, G., et E. Dejana. 2004. « Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis ». *Physiological Reviews* 84 (3): 869-901. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003>.

Berezowski, V., C. Landry, M.-P. Dehouck, R. Cecchelli, et L. Fenart. 2004. « Contribution of Glial Cells and Pericytes to the MRNA Profiles of P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Proteins in an in Vitro Model of the Blood–Brain Barrier ». *Brain Research* 1018 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.092>.

Borlot, F., R.G. Wither, A. Ali, N. Wu, F. Verocai, et D.M. Andrade. 2014. « A Pilot Double-Blind Trial Using Verapamil as Adjuvant Therapy for Refractory Seizures ». *Epilepsy Research* 108 (9): 1642-51. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.08.009>.

Breuil, L., S. Goutal, S. Marie, A. Del Vecchio, D. Audisio, A. Soyer, M. Goislard, W. Saba, N. Tournier, et F. Caillé. 2022. « Comparison of the Blood–Brain Barrier Transport and Vulnerability to P-Glycoprotein-Mediated Drug–Drug Interaction of Domperidone versus Metoclopramide Assessed Using In Vitro Assay and PET Imaging ». *Pharmaceutics* 14 (8): 1658. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081658>.

Breuil, L., S. Marie, S. Goutal, S. Auvity, C. Truillet, W. Saba, O. Langer, F. Caillé, et N. Tournier. 2022. « Comparative Vulnerability of PET Radioligands to Partial Inhibition of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: A Criterion of Choice? » *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 42 (1): 175-85. <https://doi.org/10.1177/0271678X211045444>.

Breuil, L., S. Marie, et N. Tournier. 2023. « The Risk of P-Glycoprotein-Mediated Drug-Drug Interaction May Also Depend on The Vulnerability of The Victim Substrate to Partial Inhibition ». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, S0022-3549(23)00143-0. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.03.023>.

Breuil, L., N. Ziani, S. Leterrier, G. Hugon, F. Caillé, V. Bouilleret, C. Truillet, et al. 2022. « Impact

of Cytochrome Induction or Inhibition on the Plasma and Brain Kinetics of [11C]metoclopramide, a PET Probe for P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier». *Pharmaceutics* 14 (12): 2650. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122650>.

Brooks, T.A., B.T. Hawkins, J.D. Huber, R.D. Egleton, et T.P. Davis. 2005. « Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations ». *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289 (2): H738-43. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01288.2004>.

Bundgaard, C., C.J.N. Jensen, et M. Garmer. 2012. « Species Comparison of In Vivo P-Glycoprotein-Mediated Brain Efflux Using Mdr1a-Deficient Rats and Mice ». *Drug Metabolism and Disposition* 40 (3): 461-66. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.043083>.

Burt, T., G. Young, W. Lee, H. Kusuha, O. Langer, M. Rowland, et Y. Sugiyama. 2020. « Phase 0/Microdosing Approaches: Time for Mainstream Application in Drug Development? » *Nature Reviews. Drug Discovery* 19 (11): 801-18. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0080-x>.

Burton, C.R., J.E. Meredith, D.M. Barten, M.E. Goldstein, C.M. Krause, C.J. Kieras, L. Sisk, et al. 2008. « The Amyloid- β Rise and γ -Secretase Inhibitor Potency Depend on the Level of Substrate Expression ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (34): 22992-3. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804175200>.

Calatozzolo, C., M. Gelati, E. Ciusani, F.L. Sciacca, B. Pollo, L. Cajola, C. Marras, et al. 2005. « Expression of Drug Resistance Proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 AND GST- π in Human Glioma ». *Journal of Neuro-Oncology* 74 (2): 113-21. <https://doi.org/10.1007/s11060-004-6152-7>.

Carrano, A., H. Snkhchyan, G. Kooij, S. van der Pol, J. van Horssen, R. Veerhuis, J. Hoozemans, A. Rozemuller, et H.E. de Vries. 2014. « ATP-Binding Cassette Transporters P-Glycoprotein and Breast Cancer Related Protein Are Reduced in Capillary Cerebral Amyloid Angiopathy ». *Neurobiology of Aging* 35 (3): 565-75. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.015>.

Castro Dias, M., J.A. Mapunda, M. Vladymyrov, et B. Engelhardt. 2019. « Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215372>.

Chai, A.B., R. Callaghan, et I.C. Gelissen. 2022. « Regulation of P-Glycoprotein in the Brain ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (23): 14667. <https://doi.org/10.3390/ijms232314667>.

Chapy, H., P. André, X. Declèves, J.-M. Scherrmann, et S. Cisternino. 2015. « A polyspecific drug/proton antiporter mediates diphenhydramine and clonidine transport at the mouse blood-retinal barrier ». *British Journal of Pharmacology* 172 (19): 4714-25. <https://doi.org/10.1111/bph.13246>.

Chapy, H., L. Goracci, P. Vayer, Y. Parmentier, P. Carrupt, X. Declèves, J. Scherrmann, S. Cisternino, et G. Cruciani. 2015. « Pharmacophore-based discovery of inhibitors of a novel drug/proton antiporter in human brain endothelial hCMEC/D3 cell line ». *British Journal of Pharmacology* 172 (20): 4888-4904. <https://doi.org/10.1111/bph.13258>.

Chapy, H., M. Smirnova, P. André, J. Schlatter, F. Chiadmi, P.-O. Couraud, J.-M. Scherrmann, X. Declèves, et S. Cisternino. 2014. « Carrier-Mediated Cocaine Transport at the Blood-Brain Barrier as a Putative Mechanism in Addiction Liability ». *International Journal of Neuropsychopharmacology* 18 (1). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu001>.

Chaves, C., F. Remião, S. Cisternino, et X. Declèves. 2017. « Opioids and the Blood-Brain Barrier: A Dynamic Interaction with Consequences on Drug Disposition in Brain ». *Current Neuropharmacology* 15 (8): 1156-73. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170504095823>.

Cisternino, S., H. Chapy, P. André, M. Smirnova, M. Debray, et J.-M. Scherrmann. 2012. « Coexistence of Passive and Proton Antiporter-Mediated Processes in Nicotine Transport at the Mouse Blood-Brain Barrier ». *The AAPS Journal* 15 (2): 299-307. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9434-6>.

Citron, M. 2010. « Alzheimer's Disease: Strategies for Disease Modification ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 9 (5): 387-98. <https://doi.org/10.1038/nrd2896>.

Cox, B., J. Nicolaï, et B. Williamson. 2023. « The Role of the Efflux Transporter, P-Glycoprotein, at the Blood-Brain Barrier in Drug Discovery ». *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 44 (1): 113-26. <https://doi.org/10.1002/bdd.2331>.

Crowe, A., et Y.-K. Teoh. 2006. « Limited P-Glycoprotein Mediated Efflux for Anti-Epileptic Drugs ». *Journal of Drug Targeting* 14 (5): 291-300. <https://doi.org/10.1080/10611860600720814>.

Cui, Y., R. Lotz, H. Rapp, K. Klinder, A. Himstedt, et A. Sauer. 2019. « Muscle to Brain Partitioning as Measure of Transporter-Mediated Efflux at the Rat Blood-Brain Barrier and Its Implementation into Compound Optimization in Drug Discovery ». *Pharmaceutics* 11 (11): 595. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110595>.

Daneman, R. 2012. « The Blood-Brain Barrier in Health and Disease ». *Annals of Neurology* 72 (5): 648-72. <https://doi.org/10.1002/ana.23648>.

Daneman, R., et A. Prat. 2015. « The Blood-Brain Barrier ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (1): a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>.

De Klerk, O.L., F.J. Bosker, G. Luurtsema, I.M. Nolte, R. Dierckx, J.A. Den Boer, et H. Potschka. 2011. « The Role of P-Glycoprotein in Psychiatric Disorders: A Reliable Guard of the Brain? ». *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 11 (3): 197-209. <https://doi.org/10.2174/187152411798047744>.

Dean, M., et T. Annilo. 2005. « Evolution of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily in Vertebrates ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6: 123-42. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.6.080604.162122>.

Del Vecchio, A., F. Caillé, A. Chevalier, O. Loreau, K. Horkka, C. Halldin, M. Schou, et al. 2018. « Late-Stage Isotopic Carbon Labeling of Pharmaceutically Relevant Cyclic Ureas Directly from CO₂ ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 57 (31): 9744-48. <https://doi.org/10.1002/anie.201804838>.

Dickens, D., S.R. Yusof, N.J. Abbott, B. Weksler, I.A. Romero, P.-O. Couraud, A. Alfievic, M. Pirmohamed, et A. Owen. 2013. « A Multi-System Approach Assessing the Interaction of Anticonvulsants with P-Gp ». *PLoS One* 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064854>.

Doran, A., R.S. Obach, B.J. Smith, N.A. Hosea, S. Becker, E. Callegari, C. Chen, et al. 2005. « The Impact of P-Glycoprotein on the Disposition of Drugs Targeted for Indications of the Central Nervous System: Evaluation Using the Mdr1a/1b Knockout Mouse Model ». *Drug Metabolism and Disposition* 33 (1): 165-74. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001230>.

Dörner, B., C. Kuntner, J.P. Bankstahl, M. Bankstahl, J. Stanek, T. Wanek, G. Stundner, et al. 2009. « Synthesis and small-animal positron emission tomography evaluation of [11C]-elacridar as a radiotracer to assess the distribution of P-glycoprotein at the blood-brain barrier ». *Journal of medicinal chemistry* 52 (19): 6073-82. <https://doi.org/10.1021/jm900940f>.

Eilers, M., U. Roy, et D. Mondal. 2008. « MRP (ABCC) transporters-mediated efflux of anti-HIV drugs, saquinavir and zidovudine, from human endothelial cells ». *Experimental biology and medicine* 233 (9): 1149-60. <https://doi.org/10.3181/0802-RM-59>.

Enerson, B.E., et L.R. Drewes. 2006. « The Rat Blood—Brain Barrier Transcriptome ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26 (7): 959-73. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600249>.

Feldmann M., Asselin M-C., Liu J., Wang S., McMahon, Anton-Rodriguez J., Walker M., et al. 2013. « P-Glycoprotein Expression and Function in Patients with Temporal Lobe Epilepsy: A Case-Control Study ». *The Lancet Neurology* 12 (8): 777-85. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70109-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70109-1).

Feldmann, M., et M. Koepp. 2012. « P-Glycoprotein Imaging in Temporal Lobe Epilepsy: In Vivo PET Experiments with the Pgp Substrate [11C]-Verapamil ». *Epilepsia* 53 (s6): 60-63. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03704.x>.

Feng, B., J.B. Mills, R.E. Davidson, R.J. Mireles, J.S. Janiszewski, M.D. Troutman, et S.M. de Morais. 2008. « In Vitro P-Glycoprotein Assays to Predict the in Vivo Interactions of P-Glycoprotein with Drugs in the Central Nervous System ». *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36 (2): 268-75. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.017434>.

Foll, B.L., S.I. Chefer, A.S. Kimes, D. Shumway, S.R. Goldberg, E.A. Stein, et A.G. Mukhin. 2007. « Validation of an Extracerebral Reference Region Approach for the Quantification of Brain Nicotinic Acetylcholine Receptors in Squirrel Monkeys with PET and 2-18F-Fluoro-A-85380 ». *Journal of Nuclear Medicine* 48 (9): 1492-1500. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.039776>.

García-Varela, L., M. Rodríguez-Pérez, A. Custodia, R. Moraga-Amaro, N.A. Colabufo, P. Aguiar, T. Sobrino, et al. 2021. « In Vivo Induction of P-Glycoprotein Function can be Measured with [18F]MC225 and PET ». *Molecular Pharmaceutics* 18 (8): 3073-85. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00302>.

García-Varela, L., D. Vázquez García, P. Aguiar, T. Kakiuchi, H. Ohba, N. Harada, S. Nishiyama, et al. 2021. « Head-to-head comparison of (R)-[11C]verapamil and [18F]MC225 in non-human primates, tracers for measuring P-glycoprotein function ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 48 (13): 4307-17. <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05411->

2.

Giacomini, K.M., D.J. Tweedie, L.Z. Benet, K.L.R. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, et al. 2010. « Membrane Transporters in Drug Development ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 9 (3): 215-36. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>.

Gil-Martins, E., D.J. Barbosa, V. Silva, F. Remião, et R. Silva. 2020. « Dysfunction of ABC Transporters at the Blood-Brain Barrier: Role in Neurological Disorders ». *Pharmacology & Therapeutics* 213: 107554. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107554>.

Gomez-Zepeda, D., M. Taghi, J.-M. Scherrmann, X. Decleves, et M.-C. Menet. 2019. « ABC Transporters at the Blood-Brain Interfaces, Their Study Models, and Drug Delivery Implications in Gliomas ». *Pharmaceutics* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010020>.

Gustafsson, S., J. Eriksson, S. Syvänen, O. Eriksson, M. Hammarlund-Udenaes, et G. Antoni. 2017. « Combined PET and Microdialysis for in Vivo Estimation of Drug Blood-Brain Barrier Transport and Brain Unbound Concentrations ». *NeuroImage* 155: 177-86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.04.068>.

Hakkola, J., J. Hukkanen, M. Turpeinen, et O. Pelkonen. 2020. « Inhibition and Induction of CYP Enzymes in Humans: An Update ». *Archives of Toxicology* 94 (11): 3671-3722. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>.

Harris, W.J., M.-C. Asselin, R. Hinz, L.M. Parkes, S. Allan, I. Schiessl, H. Boutin, et B.R. Dickie. 2023. « In vivo methods for imaging blood-brain barrier function and dysfunction ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 50 (4): 1051-83. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05997-1>.

Hellum, B.H., Z. Hu, et O.G. Nilsen. 2007. « The Induction of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by Six Trade Herbal Products in Cultured Primary Human Hepatocytes ». *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 100 (1): 23-30. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00011.x>.

Höcht, C., A. Lazarowski, N.N. Gonzalez, M.A. Mayer, J.A.W. Opezzo, C.A. Taira, et E. Girardi. 2009. « Differential Hippocampal Pharmacokinetics of Phenobarbital and Carbamazepine in Repetitive Seizures Induced by 3-Mercaptopropionic Acid ». *Neuroscience Letters* 453 (1): 54-57. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.079>.

Hosten, B., R. Boisgard, A. Jacob, S. Goutal, B. Saubaméa, F. Dollé, J.-M. Scherrmann, S. Cisternino, et N. Tournier. 2013. « [11C]Befloxatone Brain Kinetics Is Not Influenced by Bcrp Function at the Blood-Brain Barrier: A PET Study Using Bcrp TGEM Knockout Rats ». *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 50 (3): 520-25. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.015>.

Ikoma, Y., Y. Kimura, M. Yamada, T. Obata, T. Suhara, et H. Ito. 2022. « Measurement of Striatal Dopamine Release Induced by Neuropsychological Stimulation in Positron Emission Tomography With Dual Injections of [11C]Raclopride ». *Frontiers in Psychiatry* 13: 811136. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.811136>.

Ilyas-Feldmann, M., M.-C. Asselin, S. Wang, A. McMahon, J. Anton-Rodriguez, G. Brown, R. Hinz, J.S. Duncan, S.M. Sisodiya, et M. Koepp. 2020. « P-Glycoprotein Overactivity in Epileptogenic

Developmental Lesions Measured in Vivo Using (R)-[11C]Verapamil PET ». *Epilepsia* 61 (7): 1472-80. <https://doi.org/10.1111/epi.16581>.

Innis, R.B., V.J. Cunningham, J. Delforge, M. Fujita, A. Gjedde, R.N. Gunn, J. Holden, et al. 2007. « Consensus Nomenclature for in Vivo Imaging of Reversibly Binding Radioligands ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27 (9): 1533-39. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600493>.

J. W. Jonker, G. Merino, S. Musters, A. E. van Herwaarden, E. Bolscher, E. Wagenaar, E. Mesman, T.C. Dale, et A.H. Schinkel. 2005. « The Breast Cancer Resistance Protein BCRP (ABCG2) Concentrates Drugs and Carcinogenic Xenotoxins into Milk ». *Nature Medicine* 11 (2): 127-29. <https://doi.org/10.1038/nm1186>.

Jacobs, A.H., H. Li, A. Winkeler, R. Hilker, C. Knoess, A. Roger, N. Galldiks, et al. 2003. « PET-Based Molecular Imaging in Neuroscience ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 30 (7): 1051-65. <https://doi.org/10.1007/s00259-003-1202-5>.

Juliano, R.L., et V. Ling. 1976. « A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants ». *Biochimica et Biophysica Acta* 455 (1): 152-62. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7).

Junqueira, D.R., D. Bennett, S.Y. Huh, K. Fahrbach, B. Neupane, et M. Betts. 2023. « Risk of Adverse Events Associated with Domperidone and Metoclopramide in Gastroparesis: Systematic Review and Meta-analysis ». *Drugs in R&D* 23 (1): 1-20. <https://doi.org/10.1007/s40268-023-00413-x>.

Juvalé, I.I.A., A.A. Abdul Hamid, K.B. Abd Halim, et A.T. Che Has. 2022. « P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease ». *Heliyon* 8 (6): e09777. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09777>.

Kage, K., T. Fujita, et Y. Sugimoto. 2005. « Role of Cys-603 in Dimer/Oligomer Formation of the Breast Cancer Resistance Protein BCRP/ABCG2 ». *Cancer Science* 96 (12): 866-72. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00126.x>.

Kalvass, J.C., J.W. Polli, D.L. Bourdet, B. Feng, S.-M. Huang, X. Liu, Q.R. Smith, L.K. Zhang, et M.J. Zamek-Gliszczynski. 2013. « Why Clinical Modulation of Efflux Transport at the Human Blood–Brain Barrier Is Unlikely: The ITC Evidence-Based Position ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 94 (1): 80-94. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.34>.

Kannan, P., K.R. Brimacombe, W.C. Kreisl, J.-S. Liow, S.S. Zoghbi, S. Telu, Y. Zhang, et al. 2011. « Lysosomal Trapping of a Radiolabeled Substrate of P-Glycoprotein as a Mechanism for Signal Amplification in PET ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (6): 2593-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014641108>.

Kannan, P., C. John, S.S. Zoghbi, C. Halldin, M.M. Gottesman, R.B. Innis, et M.D. Hall. 2009. « Imaging the Function of P-Glycoprotein With Radiotracers: Pharmacokinetics and In Vivo Applications ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 86 (4): 368-77. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.138>.

Kannan, P., V.W. Pike, C. Halldin, O. Langer, M.M. Gottesman, R.B. Innis, et M.D. Hall. 2013. « Factors That Limit Positron Emission Tomography Imaging of P-Glycoprotein Density at the Blood–Brain Barrier ». *Molecular Pharmaceutics* 10 (6): 2222-29. <https://doi.org/10.1021/mp400011g>.

Katayama, K., K. Noguchi, et Y. Sugimoto. 2014. « Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells ». *New Journal of Science* 2014 (mai): e476974. <https://doi.org/10.1155/2014/476974>.

Kim, J.A., N.D. Tran, Z. Li, F. Yang, W. Zhou, et M.J. Fisher. 2006. « Brain Endothelial Hemostasis Regulation by Pericytes ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26 (2): 209-17. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600181>.

Klerk, O.L. de, A.T.M. Willemsen, M. Roosink, A.L. Bartels, N. Harry Hendrikse, F.J. Bosker, et J.A. den Boer. 2009. « Locally Increased P-Glycoprotein Function in Major Depression: A PET Study with [11C]Verapamil as a Probe for P-Glycoprotein Function in the Blood–Brain Barrier ». *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 12 (07): 895. <https://doi.org/10.1017/S1461145709009894>.

Kooij, G., R. Backer, J.J. Koning, A. Reijerkerk, J. van Horssen, S.M.A. van der Pol, J. Drexhage, et al. 2009. « P-Glycoprotein Acts as an Immunomodulator during Neuroinflammation ». *PloS One* 4 (12): e8212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008212>.

Kooij, G., J. van Horssen, E.C.M. de Lange, A. Reijerkerk, S.M.A. van der Pol, B. van het Hof, J. Drexhage, et al. 2010. « T Lymphocytes Impair P-Glycoprotein Function during Neuroinflammation ». *Journal of Autoimmunity* 34 (4): 416-25. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.10.006>.

Kortekaas, R., K.L. Leenders, J.C.H. van Oostrom, W. Vaalburg, J. Bart, A.T.M. Willemsen, et N.H. Hendrikse. 2005. « Blood–Brain Barrier Dysfunction in Parkinsonian Midbrain in Vivo ». *Annals of Neurology* 57 (2): 176-79. <https://doi.org/10.1002/ana.20369>.

Kreisl, W.C., J.-S. Liow, N. Kimura, N. Seneca, S.S. Zoghbi, C.L. Morse, P. Herscovitch, V.W. Pike, et R.B. Innis. 2010. « P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in humans can be quantified with the substrate radiotracer 11C-N-desmethyl-loperamide ». *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine* 51 (4): 559-66. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.070151>.

Kusuhara, H., et Y. Sugiyama. 2005. « Active Efflux across the Blood-Brain Barrier: Role of the Solute Carrier Family ». *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2 (1): 73-85. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.73>.

Kuteykin-Teplyakov, K., C. Luna-Tortós, K. Ambroziak, et W. Löscher. 2010. « Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport ». *British Journal of Pharmacology* 160 (6): 1453-63. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00801.x>.

Kwan P. 2011. « Drug-Resistant Epilepsy ». *The New England Journal of Medicine* 365 (10): 919-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004418>.

Lai, C.-H., et K.-H. Kuo. 2005. « The Critical Component to Establish in Vitro BBB Model: Pericyte ». *Brain Research Reviews* 50 (2): 258-65. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.07.004>.

Lai, J.-I., Y.-J. Tseng, M.-H. Chen, C.-Y.F. Huang, et P.M.-H. Chang. 2020. « Clinical Perspective of FDA Approved Drugs With P-Glycoprotein Inhibition Activities for Potential Cancer Therapeutics ». *Frontiers in Oncology* 10: 561936. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.561936>.

Lakshmikanthcharan, S., M. Hisham, S.K. Chaitanya Juluri, et S.M. Nandakumar. 2018. « Verapamil as an Adjuvant Treatment for Drug-Resistant Epilepsy ». *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine* 22 (9): 680-82. https://doi.org/10.4103/ijccm.IJCCM_250_18.

Lammertsma, A.A., et S.P. Hume. 1996. « Simplified Reference Tissue Model for PET Receptor Studies ». *NeuroImage* 4 (3 Pt 1): 153-58. <https://doi.org/10.1006/nimg.1996.0066>.

Langer, O. 2016. « Use of PET Imaging to Evaluate Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions ». *The Journal of Clinical Pharmacology* 56 (S7): S143-56. <https://doi.org/10.1002/jcph.722>.

Langer, O., M. Bauer, A. Hammers, R. Karch, E. Patariaia, M.J. Koepp, A. Abraham, et al. 2007. « Pharmacoresistance in Epilepsy: A Pilot PET Study with the P-Glycoprotein Substrate R-[11C]Verapamil ». *Epilepsia* 48 (9): 1774-84. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01116.x>.

Langer, O., et M. Müller. 2004. « Methods to Assess Tissue-Specific Distribution and Metabolism of Drugs ». *Current Drug Metabolism* 5 (6): 463-81. <https://doi.org/10.2174/1389200043335379>.

Lazzaro, S., M.A. West, S. Eatemadpour, B. Feng, M.V.S. Varma, A.D. Rodrigues, C. Temesszentandrás-Ambrus, et al. 2023. « Translatability of in Vitro Inhibition Potency to in Vivo P-Glycoprotein Mediated Drug Interaction Risk ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 112 (6): 1715-23. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.014>.

Lee, A., et B. Kuo. 2010. « Metoclopramide in the treatment of diabetic gastroparesis ». *Expert review of endocrinology & metabolism* 5 (5): 653-62.

Lin, L., S.W. Yee, R.B. Kim, et K.M. Giacomini. 2015. « SLC Transporters as Therapeutic Targets: Emerging Opportunities ». *Nature reviews. Drug discovery* 14 (8): 543-60. <https://doi.org/10.1038/nrd4626>.

Liu, J.Y.W., M. Thom, C.B. Catarino, L. Martinian, D. Figarella-Branger, F. Bartolomei, M. Koepp, et S.M. Sisodiya. 2012. « Neuropathology of the Blood-Brain Barrier and Pharmaco-Resistance in Human Epilepsy ». *Brain* 135 (10): 3115-33. <https://doi.org/10.1093/brain/aws147>.

Liu, X. 2019a. « ABC Family Transporters ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1141: 13-100. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2.

———. 2019b. « Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions and Their Significance ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1141: 241-91. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_5.

Livezey, M.R., E.D. Briggs, A.K. Bolles, L.D. Nagy, R. Fujiwara, et L.L. Furge. 2014. « METOCLOPRAMIDE IS METABOLIZED BY CYP2D6 AND IS A REVERSIBLE INHIBITOR, BUT NOT INACTIVATOR, OF CYP2D6 ». *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 44 (4): 309-19. <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.835885>.

Logan, J., J.S. Fowler, N.D. Volkow, A.P. Wolf, S.L. Dewey, D.J. Schlyer, R.R. MacGregor, R. Hitzemann, B. Bendriem, et S.J. Gatley. 1990. « Graphical Analysis of Reversible Radioligand Binding from Time-Activity Measurements Applied to [N-11C-Methyl]-(-)-Cocaine PET Studies in Human Subjects ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 10 (5): 740-47. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1990.127>.

Lombardo, L., R. Pellitteri, M. Balazy, et V. Cardile. 2008. « Induction of Nuclear Receptors and Drug Resistance in the Brain Microvascular Endothelial Cells Treated with Antiepileptic Drugs ». *Current Neurovascular Research* 5 (2): 82-92. <https://doi.org/10.2174/156720208784310196>.

Löscher, W. 2005. « How to Explain Multidrug Resistance in Epilepsy? » *Epilepsy Currents* 5 (3): 107-12. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2005.05311.x>.

Löscher, W., C. Luna-Tortós, K. Römermann, et M. Fedrowitz. 2011. « Do ATP-Binding Cassette Transporters Cause Pharmacoresistance in Epilepsy? Problems and Approaches in Determining Which Antiepileptic Drugs Are Affected ». *Current Pharmaceutical Design* 17 (26): 2808-28. <https://doi.org/10.2174/138161211797440212>.

Löscher, W., et H. Potschka. 2005a. « Drug Resistance in Brain Diseases and the Role of Drug Efflux Transporters ». *Nature Reviews Neuroscience* 6 (8): 591-602. <https://doi.org/10.1038/nrn1728>.

———. 2005b. « Role of Drug Efflux Transporters in the Brain for Drug Disposition and Treatment of Brain Diseases ». *Progress in Neurobiology* 76 (1): 22-76. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.006>.

Luna-Tortós, C., M. Fedrowitz, et W. Löscher. 2008. « Several Major Antiepileptic Drugs Are Substrates for Human P-Glycoprotein ». *Neuropharmacology* 55 (8): 1364-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.032>.

Luna-Tortós, C., B. Rambeck, U.H. Jürgens, et W. Löscher. 2009. « The Antiepileptic Drug Topiramate Is a Substrate for Human P-Glycoprotein but Not Multidrug Resistance Proteins ». *Pharmaceutical Research* 26 (11): 2464-70. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9961-8>.

Luurtsema, G., C.F.M. Molthoff, R.C. Schuit, A.D. Windhorst, A.A. Lammertsma, et E.J.F. Franssen. 2005. « Evaluation of (R)-[11C]Verapamil as PET Tracer of P-Glycoprotein Function in the Blood-Brain Barrier: Kinetics and Metabolism in the Rat ». *Nuclear Medicine and Biology* 32 (1): 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.06.007>.

Ma, A., C. Wang, Y. Chen, et W. Yuan. 2013. « P-glycoprotein alters blood-brain barrier penetration of antiepileptic drugs in rats with medically intractable epilepsy ». *Drug Design, Development and Therapy* 7: 1447-54. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S52533>.

Mahar Doan, K.M., J.E. Humphreys, L.O. Webster, S.A. Wring, L.J. Shampine, C.J. Serabjit-Singh,

- K.K. Adkison, et J.W. Polli. 2002. « Passive Permeability and P-Glycoprotein-Mediated Efflux Differentiate Central Nervous System (CNS) and Non-CNS Marketed Drugs ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303 (3): 1029-37. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.039255>.
- Mairinger, S., T. Erker, M. Müller, et O. Langer. 2011. « PET and SPECT Radiotracers to Assess Function and Expression of ABC Transporters in Vivo ». *Current drug metabolism* 12 (8): 774-92. <https://doi.org/10.2174/138920011798356980>.
- Marchi, N., K.L. Hallene, K.M. Kight, L. Cucullo, G. Moddel, W. Bingaman, G. Dini, A. Vezzani, et D. Janigro. 2004. « Significance of MDR1 and Multiple Drug Resistance in Refractory Human Epileptic Brain ». *BMC Medicine* 2: 37. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-2-37>.
- Marie, S., L. Breuil, Z. Chalampalakakis, L. Becquemont, C. Verstuyft, A.-L. Lecoq, F. Caillé, et al. 2022. « [11C]Glyburide PET Imaging for Quantitative Determination of the Importance of Organic Anion-Transporting Polypeptide Transporter Function in the Human Liver and Whole-Body ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 156: 113994. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113994>.
- Martin, C., G. Berridge, C.F. Higgins, P. Mistry, P. Charlton, et R. Callaghan. 2000. « Communication between Multiple Drug Binding Sites on P-Glycoprotein ». *Molecular Pharmacology* 58 (3): 624-32. <https://doi.org/10.1124/mol.58.3.624>.
- Matzneller, P., M. Kussmann, S. Eberl, A. Maier-Salamon, W. Jäger, M. Bauer, O. Langer, M. Zeitlinger, et W. Poepl. 2018. « Pharmacokinetics of the P-Gp Inhibitor Tariquidar in Rats After Intravenous, Oral, and Intraperitoneal Administration ». *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 43 (5): 599-606. <https://doi.org/10.1007/s13318-018-0474-x>.
- Miller, D.S., B. Bauer, et A.M.S. Hartz. 2008. « Modulation of P-glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Opportunities to Improve CNS Pharmacotherapy ». *Pharmacological reviews* 60 (2): 196-209. <https://doi.org/10.1124/pr.107.07109>.
- Mo, W., et J.-T. Zhang. 2011. « Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance ». *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 3 (1): 1-27.
- Moerman, L., L. wyffels, D. Slaets, R. Raedt, P. Boon, et F. De Vos. 2011. « Antiepileptic Drugs Modulate P-Glycoproteins in the Brain: A Mice Study with 11C-Desmethyloperamide ». *Epilepsy Research* 94 (1): 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2010.12.013>.
- Mohamed, L.A., S. Markandaiah, S. Bonanno, P. Pasinelli, et D. Trotti. 2019. « Excess glutamate secreted from astrocytes drives upregulation of P-glycoprotein in endothelial cells in amyotrophic lateral sclerosis ». *Experimental neurology* 316: 27-38. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.04.002>.
- Moons, T., M. de Roo, S. Claes, et G. Dom. 2011. « Relationship between P-Glycoprotein and Second-Generation Antipsychotics ». *Pharmacogenomics*. [Http://Dx.Doi.Org/10.2217/Pgs.11.55](http://Dx.Doi.Org/10.2217/Pgs.11.55). 2011. <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/pgs.11.55>.

Müllauer, J., C. Kuntner, M. Bauer, J.P. Bankstahl, M. Müller, R.A. Voskuyl, O. Langer, et S. Syvänen. 2012. « Pharmacokinetic modeling of P-glycoprotein function at the rat and human blood–brain barriers studied with (R)-[11C]verapamil positron emission tomography ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research* 2 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-58>.

Muzi, M., D.A. Mankoff, J.M. Link, S. Shoner, A.C. Collier, L. Sasongko, et J.D. Unadkat. 2009. « Imaging of Cyclosporine Inhibition of P-Glycoprotein Activity Using 11C-Verapamil in the Brain: Studies of Healthy Humans ». *Journal of Nuclear Medicine* 50 (8): 1267-75. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.059162>.

Nakanishi, H., A. Yonezawa, K. Matsubara, et I. Yano. 2013. « Impact of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on the Brain Distribution of Antiepileptic Drugs in Knockout Mouse Models ». *European Journal of Pharmacology* 710 (1-3): 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.049>.

Nicita, F., A. Spalice, L. Papetti, M. Nikanorova, P. Iannetti, et P. Parisi. 2014. « Efficacy of Verapamil as an Adjunctive Treatment in Children with Drug-Resistant Epilepsy: A Pilot Study ». *Seizure* 23 (1): 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.09.009>.

Nicolazzo, J.A., S.A. Charman, et W.N. Charman. 2006. « Methods to Assess Drug Permeability across the Blood-Brain Barrier ». *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58 (3): 281-93. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.3.0001>.

Nies, A.T., G. Jedlitschky, J. König, C. Herold-Mende, H.H. Steiner, H.-P. Schmitt, et D. Keppler. 2004. « Expression and Immunolocalization of the Multidrug Resistance Proteins, MRP1–MRP6 (ABCC1–ABCC6), in Human Brain ». *Neuroscience* 129 (2): 349-60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.051>.

Noell, S., K. Wolburg-Buchholz, A.F. Mack, A.M. Beedle, J.S. Satz, K.P. Campbell, H. Wolburg, et P. Fallier-Becker. 2011. « Evidence for a role of dystroglycan regulating the membrane architecture of astroglial endfeet ». *The European Journal of Neuroscience* 33 (12): 2179-86. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07688.x>.

O'Brien, F.E., T.G. Dinan, B.T. Griffin, et J.F. Cryan. 2012. « Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood–brain barrier: clinical significance of in vitro and in vivo findings ». *British Journal of Pharmacology* 165 (2): 289-312. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01557.x>.

Ohno, K., K.D. Pettigrew, et S.I. Rapoport. 1978. « Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 235 (3): H299-307. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1978.235.3.H299>.

Pardridge, W.M. 2012. « Drug transport across the blood–brain barrier ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32 (11): 1959-72. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.126>.

Parrish, K.E., J.N. Sarkaria, et W.F. Elmquist. 2015. « Improving Drug Delivery to Primary and Metastatic Brain Tumors: Strategies to Overcome the Blood–Brain Barrier ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 97 (4): 336-46. <https://doi.org/10.1002/cpt.71>.

Passeleu-Le Bourdonnec, C., P.-A. Carrupt, J.M. Scherrmann, et S. Martel. 2013. « Methodologies to Assess Drug Permeation Through the Blood–Brain Barrier for Pharmaceutical Research ». *Pharmaceutical Research* 30 (11): 2729-56. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1119-z>.

Patlak, C.S., R.G. Blasberg, et J.D. Fenstermacher. 1983. « Graphical Evaluation of Blood-to-Brain Transfer Constants from Multiple-Time Uptake Data ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 3 (1): 1-7. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1983.1>.

Pike, V.W. 2009. « PET Radiotracers: Crossing the Blood–Brain Barrier and Surviving Metabolism ». *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (8): 431-40. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.005>.

Polli, J. W., S.A. Wring, J.E. Humphreys, L. Huang, J.B. Morgan, L.O. Webster, et C.S. Serabjit-Singh. 2001. « Rational Use of in Vitro P-Glycoprotein Assays in Drug Discovery ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (2): 620-28.

Polli, Joseph W., K.L. Olson, J.P. Chism, L.S. John-Williams, R.L. Yeager, S.M. Woodard, V. Otto, S. Castellino, et V.E. Demby. 2009. « An Unexpected Synergist Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on the Central Nervous System Penetration of the Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib (N-{3-Chloro-4-[(3-Fluorobenzyl)Oxy]Phenyl}-6-[5-({[2-(Methylsulfonyl)Ethyl]Amino}methyl)-2-Furyl]-4-Quinazolinamine; GW572016) ». *Drug Metabolism and Disposition* 37 (2): 439-42. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024646>.

Potschka, H., et W. Löscher. 2001. « In Vivo Evidence for P-Glycoprotein-Mediated Transport of Phenytoin at the Blood-Brain Barrier of Rats ». *Epilepsia* 42 (10): 1231-40. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.01901.x>.

Potschka, Heidrun, S. Baltes, et W. Löscher. 2004. « Inhibition of Multidrug Transporters by Verapamil or Probenecid Does Not Alter Blood-Brain Barrier Penetration of Levetiracetam in Rats ». *Epilepsy Research* 58 (2-3): 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2003.12.007>.

Potschka, Heidrun, M. Fedrowitz, et W. Löscher. 2001. « P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein Are Involved in the Regulation of Extracellular Levels of the Major Antiepileptic Drug Carbamazepine in the Brain ». *NeuroReport* 12 (16): 3557-60. <https://doi.org/10.1097/00001756-200111160-00037>.

———. 2002. « P-Glycoprotein-Mediated Efflux of Phenobarbital, Lamotrigine, and Felbamate at the Blood-Brain Barrier: Evidence from Microdialysis Experiments in Rats ». *Neuroscience Letters* 327 (3): 173-76. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00423-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00423-8).

Pottier, G., S. Marie, S. Goutal, S. Auvity, M.-A. Peyronneau, S. Stute, R. Boisgard, et al. 2016. « Imaging the Impact of the P-Glycoprotein (ABCB1) Function on the Brain Kinetics of Metoclopramide ». *Journal of Nuclear Medicine* 57 (2): 309-14. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.164350>.

Rascher, G., A. Fischmann, S. Kröger, F. Duffner, E.-H. Grote, et H. Wolburg. 2002. « Extracellular Matrix and the Blood-Brain Barrier in Glioblastoma Multiforme: Spatial Segregation of Tenascin

and Agrin ». *Acta Neuropathologica* 104 (1): 85-91. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0524-x>.

Rautio, J., J.E. Humphreys, L.O. Webster, A. Balakrishnan, J.P. Keogh, J.R. Kunta, C.J. Serabjit-Singh, et J.W. Polli. 2006. « In Vitro P-Glycoprotein Inhibition Assays for Assessment of Clinical Drug Interaction Potential of New Drug Candidates: A Recommendation for Probe Substrates ». *Drug Metabolism and Disposition* 34 (5): 786-92. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008615>.

Reese, T.S., et M.J. Karnovsky. 1967. « Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase ». *The Journal of Cell Biology* 34 (1): 207-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.34.1.207>.

Remy, S., et H. Beck. 2006. « Molecular and Cellular Mechanisms of Pharmacoresistance in Epilepsy ». *Brain* 129 (1): 18-35. <https://doi.org/10.1093/brain/awh682>.

Rizzi, M., S. Caccia, G. Guiso, C. Richichi, J.A. Gorter, E. Aronica, M. Aliprandi, et al. 2002. « Limbic Seizures Induce P-Glycoprotein in Rodent Brain: Functional Implications for Pharmacoresistance ». *The Journal of Neuroscience* 22 (14): 5833-39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-14-05833.2002>.

Robey, R.W., K.M. Pluchino, M.D. Hall, A.T. Fojo, S.E. Bates, et M.M. Gottesman. 2018. « Revisiting the Role of ABC Transporters in Multidrug-Resistant Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 18 (7): 452-64. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>.

Rodríguez-Arellano, J.J., V. Parpura, R. Zorec, et A. Verkhratsky. 2016. « Astrocytes in Physiological Aging and Alzheimer's Disease ». *Neuroscience* 323: 170-82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.007>.

Ronaldson, P.T., Y. Persidsky, et R. Bendayan. 2008. « Regulation of ABC Membrane Transporters in Glial Cells: Relevance to the Pharmacotherapy of Brain HIV-1 Infection ». *Glia* 56 (16): 1711-35. <https://doi.org/10.1002/glia.20725>.

Roux, G.L., R. Jarray, A.-C. Guyot, S. Pavoni, N. Costa, F. Théodoro, F. Nassor, et al. 2019. « Proof-of-Concept Study of Drug Brain Permeability Between in Vivo Human Brain and an in Vitro iPSCs-Human Blood-Brain Barrier Model ». *Scientific Reports* 9 (1): 16310. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52213-6>.

Rubin, L.L., et J.M. Staddon. 1999. « The Cell Biology of the Blood-Brain Barrier ». *Annual Review of Neuroscience* 22 (1): 11-28. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.11>.

Sadzot, B., R. Debets, P. Maquet, C. Comar, et G. Franck. 1994. « PET Studies of Patients with Partial Epilepsy: Visual Interpretation vs. Semi-Quantification/Quantification ». *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum* 152: 175-78. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1994.tb05216.x>.

Saidijam, M., F. Karimi Dermani, S. Sohrabi, et S.G. Patching. 2018. « Efflux Proteins at the Blood-Brain Barrier: Review and Bioinformatics Analysis ». *Xenobiotica* 48 (5): 506-32. <https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1328148>.

Sanger, G.J. 2009. « Translating 5-HT₄ Receptor Pharmacology ». *Neurogastroenterology &*

Motility 21 (12): 1235-38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01425.x>.

Sasongko, L., J.M. Link, M. Muzi, D.A. Mankoff, X. Yang, A.C. Collier, S.C. Shoner, et J.D. Unadkat. 2005. « Imaging P-Glycoprotein Transport Activity at the Human Blood-Brain Barrier with Positron Emission Tomography ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 77 (6): 503-14. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.01.022>.

Savolainen, H., A.D. Windhorst, P.H. Elsinga, M. Cantore, N.A. Colabufo, A.T. Willemsen, et G. Luurtsema. 2017. « Evaluation of [18F]MC225 as a PET radiotracer for measuring P-glycoprotein function at the blood–brain barrier in rats: Kinetics, metabolism, and selectivity ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 37 (4): 1286-98. <https://doi.org/10.1177/0271678X16654493>.

Schinkel, A.H., et J.W. Jonker. 2003. « Mammalian Drug Efflux Transporters of the ATP Binding Cassette (ABC) Family: An Overview ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (1): 3-29. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00169-2).

Schinkel, A.H., 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, et H.P. te Riele. 1994. « 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 (4): 491-502. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90212-7).

Schinkel, A.H., E. Wagenaar, C.A. Mol, et L. van Deemter. 1996. « P-Glycoprotein in the Blood-Brain Barrier of Mice Influences the Brain Penetration and Pharmacological Activity of Many Drugs ». *The Journal of Clinical Investigation* 97 (11): 2517-24. <https://doi.org/10.1172/JCI118699>.

Seelig, A. 1998. « A General Pattern for Substrate Recognition by P-Glycoprotein ». *European Journal of Biochemistry* 251 (1-2): 252-61. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2510252.x>.

Seneca, N., S.S. Zoghbi, J.-S. Liow, W. Kreisl, P. Herscovitch, K. Jenko, R.L. Gladding, A. Taku, V.W. Pike, et R.B. Innis. 2009. « Human Brain Imaging and Radiation Dosimetry of 11C-N-Desmethyl-Loperamide, a PET Radiotracer to Measure the Function of P-Glycoprotein ». *Journal of nuclear medicine* 50 (5): 807-13. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.058453>.

Seo, J., C. Lee, J.C. Paeng, H.W. Kwon, D. Lee, S. Kim, J. Han, et al. 2020. « Biallelic mutations in ABCB1 display recurrent reversible encephalopathy ». *Annals of Clinical and Translational Neurology* 7 (8): 1443-49. <https://doi.org/10.1002/acn3.51125>.

Sharif, Y., F. Jumah, L. Coplan, A. Krosser, K. Sharif, et R.S. Tubbs. 2018. « Blood Brain Barrier: A Review of Its Anatomy and Physiology in Health and Disease ». *Clinical Anatomy* 31 (6): 812-23. <https://doi.org/10.1002/ca.23083>.

Sharom, F.J. 2011. « The P-Glycoprotein Multidrug Transporter ». *Essays in Biochemistry* 50 (1): 161-78. <https://doi.org/10.1042/bse0500161>.

Shin, J.-W., K. Chu, S.A. Shin, K.-H. Jung, S.-T. Lee, Y.-S. Lee, J. Moon, et al. 2016. « Clinical Applications of Simultaneous PET/MR Imaging Using (R)-[11C]-Verapamil with Cyclosporin A: Preliminary Results on a Surrogate Marker of Drug-Resistant Epilepsy ». *American Journal of*

Neuroradiology 37 (4): 600-606. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4566>.

Sills, G.J., P. Kwan, E. Butler, E.C.M. de Lange, D.J. van den Berg, et M.J. Brodie. 2002. « P-Glycoprotein-Mediated Efflux of Antiepileptic Drugs: Preliminary Studies in Mdr1a Knockout Mice ». *Epilepsy & Behavior* 3 (5): 427-32. [https://doi.org/10.1016/s1525-5050\(02\)00511-5](https://doi.org/10.1016/s1525-5050(02)00511-5).

Silva, R., V. Vilas-Boas, H. Carmo, R.J. Dinis-Oliveira, F. Carvalho, M. de Lourdes Bastos, et F. Remião. 2015. « Modulation of P-Glycoprotein Efflux Pump: Induction and Activation as a Therapeutic Strategy ». *Pharmacology & Therapeutics* 149: 1-123. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>.

Sisodiya, S.M., W. -R. Lin, B.N. Harding, M.V. Squier, et M. Thom. 2002. « Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy ». *Brain* 125 (1): 22-31. <https://doi.org/10.1093/brain/awf002>.

Srivalli, K.M.R., et P.K. Lakshmi. 2012. « Overview of P-Glycoprotein Inhibitors: A Rational Outlook ». *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 48 (3): 353-67. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300002>.

Stacy, A.E., P.J. Jansson, et D.R. Richardson. 2013. « Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in Chemoresistance ». *Molecular Pharmacology* 84 (5): 655-69. <https://doi.org/10.1124/mol.113.088609>.

Stieger, B., et B. Gao. 2015. « Drug Transporters in the Central Nervous System ». *Clinical Pharmacokinetics* 54 (3): 225-42. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0241-y>.

Summers, M.A., J.L. Moore, et J.W. McAuley. 2004. « Use of Verapamil as a Potential P-Glycoprotein Inhibitor in a Patient with Refractory Epilepsy ». *Annals of Pharmacotherapy* 38 (10): 1631-34. <https://doi.org/10.1345/aph.1E068>.

Sweeney, M.D., Z. Zhao, A. Montagne, A.R. Nelson, et B.V. Zlokovic. 2019. « Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back ». *Physiological Reviews* 99 (1): 21-78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>.

Thijs, R.D., R. Surges, T.J. O'Brien, et J.W. Sander. 2019. « Epilepsy in Adults ». *Lancet (London, England)* 393 (10172): 689-701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0).

Tishler, D.M., K.I. Weinberg, D.R. Hinton, N. Barbaro, G.M. Annett, et C. Raffel. 1995. « MDR1 Gene Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy ». *Epilepsia* 36 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1995.tb01657.x>.

Tournier, N., M. Bauer, V. Pichler, L. Nics, E.-M. Klebermass, K. Bamminger, P. Matzneller, et al. 2019. « Impact of P-Glycoprotein Function on the Brain Kinetics of the Weak Substrate 11C-Metoclopramide Assessed with PET Imaging in Humans ». *Journal of Nuclear Medicine* 60 (7): 985-91. <https://doi.org/10.2967/jnumed.118.219972>.

Tournier, N., S. Goutal, S. Auvity, A. Traxl, S. Mairinger, T. Wanek, O.-B. Helal, et al. 2017. « Strategies to Inhibit ABCB1- and ABCG2-Mediated Efflux Transport of Erlotinib at the Blood-Brain Barrier: A PET Study on Nonhuman Primates ». *Journal of Nuclear Medicine* 58 (1): 117-22. <https://doi.org/10.2967/jnumed.116.178665>.

Tournier, N., B. Stieger, et O. Langer. 2018. « Imaging techniques to study drug transporter function in vivo ». *Pharmacology & Therapeutics* 189: 104-22. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.04.006>.

Tracy, T.S., K.R. Korzekwa, F.J. Gonzalez, et I.W. Wainer. 1999. « Cytochrome P450 isoforms involved in metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 47 (5): 545-52. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00923.x>.

Traub-Weidinger, T., O. Muzik, L.K.S. Sundar, S. Aull-Watschinger, T. Beyer, M. Hacker, A. Hahn, et al. 2020. « Utility of Absolute Quantification in Non-Lesional Extratemporal Lobe Epilepsy Using FDG PET/MR Imaging ». *Frontiers in Neurology* 11: 54. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00054>.

Uchida, Y., S. Ohtsuki, J. Kamiie, et T. Terasaki. 2011. « Blood-Brain Barrier (BBB) Pharmacoproteomics: Reconstruction of in Vivo Brain Distribution of 11 P-Glycoprotein Substrates Based on the BBB Transporter Protein Concentration, in Vitro Intrinsic Transport Activity, and Unbound Fraction in Plasma and Brain in Mice ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339 (2): 579-88. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.184200>.

Uchida, Y., S. Ohtsuki, Y. Katsukura, C. Ikeda, T. Suzuki, J. Kamiie, et T. Terasaki. 2011. « Quantitative Targeted Absolute Proteomics of Human Blood-Brain Barrier Transporters and Receptors ». *Journal of Neurochemistry* 117 (2): 333-45. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07208.x>.

Van Vliet, E.A., R. Van Schaik, P.M. Edelbroek, S. Redeker, E. Aronica, W.J. Wadman, N. Marchi, A. Vezzani, et J.A. Gorter. 2006. « Inhibition of the Multidrug Transporter P-Glycoprotein Improves Seizure Control in Phenytoin-Treated Chronic Epileptic Rats ». *Epilepsia* 47 (4): 672-80. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00496.x>.

Varma, M. 2003. « P-Glycoprotein Inhibitors and Their Screening: A Perspective from Bioavailability Enhancement ». *Pharmacological Research* 48 (4): 347-59. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(03\)00158-0](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00158-0).

Vishwakarma, S., S. Singh, et T.G. Singh. 2022. « Pharmacological Modulation of Cytokines Correlating Neuroinflammatory Cascades in Epileptogenesis ». *Molecular Biology Reports* 49 (2): 1437-52. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06896-8>.

Vogelgesang, S., I. Cascorbi, E. Schroeder, J. Pahnke, H.K. Kroemer, W. Siegmund, C. Kunert-Keil, L.C. Walker, et R.W. Warzok. 2002. « Deposition of Alzheimer's β -Amyloid Is Inversely Correlated with P-Glycoprotein Expression in the Brains of Elderly Non-Demented Humans ». *Pharmacogenetics and Genomics* 12 (7): 535-41. <https://doi.org/10.1097/00008571-200210000-00005>.

Volk, H.A., et W. Löscher. 2005. « Multidrug Resistance in Epilepsy: Rats with Drug-Resistant Seizures Exhibit Enhanced Brain Expression of P-Glycoprotein Compared with Rats with Drug-Responsive Seizures ». *Brain* 128 (6): 1358-68. <https://doi.org/10.1093/brain/awh437>.

Vries, N.A. de, J. Zhao, E. Kroon, T. Buckle, J.H. Beijnen, et O. van Tellingen. 2007. « P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein: Two Dominant Transporters Working

Together in Limiting the Brain Penetration of Topotecan ». *Clinical Cancer Research* 13 (21): 6440-49. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1335>.

Wagner, C.C., M. Bauer, R. Karch, T. Feurstein, S. Kopp, P. Chiba, K. Kletter, et al. 2009. « A pilot study to assess the efficacy of tariquidar to inhibit P-glycoprotein at the human blood-brain barrier with (R)-11C-verapamil and PET ». *Journal of nuclear medicine* 50 (12): 1954-61. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.063289>.

Wanek, T., S. Mairinger, et O. Langer. 2013. « Radioligands Targeting P-Glycoprotein and Other Drug Efflux Proteins at the Blood-Brain Barrier ». *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 56 (3-4): 68-77. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2993>.

Wanek, T., K. Römermann, S. Mairinger, J. Stanek, M. Sauberer, T. Filip, A. Traxl, et al. 2015. « Factors Governing P-Glycoprotein-Mediated Drug-Drug Interactions at the Blood-Brain Barrier Measured with Positron Emission Tomography ». *Molecular Pharmaceutics* 12 (9): 3214-25. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00168>.

Westerlund, M., A.C. Belin, L. Olson, et D. Galter. 2008. « Expression of Multi-Drug Resistance 1 mRNA in Human and Rodent Tissues: Reduced Levels in Parkinson Patients ». *Cell and Tissue Research* 334 (2): 179-85. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0686-5>.

Whiting, R.L., A. Choppin, G. Luehr, et J.R. Jasper. 2021. « Preclinical Evaluation of the Effects of Trazpiroben (TAK-906), a Novel, Potent Dopamine D2/D3 Receptor Antagonist for the Management of Gastroparesis ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 379 (1): 85-95. <https://doi.org/10.1124/jpet.121.000698>.

Xu, L., A. Nirwane, et Y. Yao. 2018. « Basement membrane and blood-brain barrier ». *Stroke and Vascular Neurology* 4 (2): 78-82. <https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198>.

Yang, Z.-H., et X.-D. Liu. 2008. « P-Glycoprotein-Mediated Efflux of Phenobarbital at the Blood-Brain Barrier Evidence from Transport Experiments in Vitro ». *Epilepsy Research* 78 (1): 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.10.006>.

Yano, K., S. Takimoto, T. Motegi, T. Tomono, M. Hagiwara, Y. Idota, K. Morimoto, A. Takahara, et T. Ogihara. 2014. « Role of P-Glycoprotein in Regulating Cilnidipine Distribution to Intact and Ischemic Brain ». *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 29 (3): 254-58. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-13-RG-072>.

Zamek-Gliszczynski, M.J., C.A. Lee, A. Poirier, J. Bentz, X. Chu, H. Ellens, T. Ishikawa, et al. 2013. « ITC Recommendations for Transporter Kinetic Parameter Estimation and Translational Modeling of Transport-Mediated PK and DDIs in Humans ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 94 (1): 64-79. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.45>.

Zhang, C., P. Kwan, Z. Zuo, et L. Baum. 2010. « In Vitro Concentration Dependent Transport of Phenytoin and Phenobarbital, but Not Ethosuximide, by Human P-Glycoprotein ». *Life Sciences* 86 (23-24): 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.04.008>.

———. 2012. « The Transport of Antiepileptic Drugs by P-Glycoprotein ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Antiepileptic drug delivery, 64 (10): 930-42.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.003>.

Zhou, S., J.D. Schuetz, K.D. Bunting, A.M. Colapietro, J. Sampath, J.J. Morris, I. Lagutina, et al. 2001. « The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 Is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and Is a Molecular Determinant of the Side-Population Phenotype ». *Nature Medicine* 7 (9): 1028-34. <https://doi.org/10.1038/nm0901-1028>.

Zoufal, V., S. Mairinger, M. Brackhan, M. Krohn, T. Filip, M. Sauberer, J. Stanek, et al. 2019. « Imaging P-Glycoprotein Induction at the Blood-Brain Barrier of a Beta-Amyloidosis Mouse Model with ¹¹C-Metoclopramide PET ». *Journal of Nuclear Medicine* 61 (7): 1050-1057 <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.237198>.

Zschiedrich, K., I.R. König, N. Brüggemann, N. Kock, M. Kasten, K.L. Leenders, V. Kostić, et al. 2009. « MDR1 Variants and Risk of Parkinson Disease: Association with Pesticide Exposure? » *Journal of Neurology* 256 (1): 115-20. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-0089-x>.

12 PUBLICATIONS

Publications relatives au travail de thèse

Articles internationaux

Breuil L, El Biali M, Vodovar D, Marie S, Auvity S, Goutal S, Rodrigo S, Bauer M, Langer O, Tournier N.

Parametric imaging of P-glycoprotein function at the blood-brain barrier using KE, brain-maps generated from dynamic [¹¹C]metoclopramide PET data in rodents, monkeys, and humans.

Molecular imaging and biology. En revision.

Breuil L, Ziani N, Leterrier S, Hugon G, Caillé F, Bouilleret V, Truillet C, Goislard M, El Biali M, Bauer M, Langer O, Goutal S, Tournier N.

Impact of Cytochrome Induction or Inhibition on the Plasma and Brain Kinetics of [¹¹C]metoclopramide, a PET Probe for P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier.

Pharmaceutics. 2022 Nov 30;14(12):2650. doi: 10.3390/pharmaceutics14122650.

PMID: 36559144

Breuil L, Goutal S, Marie S, Del Vecchio A, Audisio D, Soyer A, Goislard M, Saba W, Tournier N, Caillé F.

Comparison of the Blood-Brain Barrier Transport and Vulnerability to P-Glycoprotein-Mediated Drug-Drug Interaction of Domperidone versus Metoclopramide Assessed Using In Vitro Assay and PET Imaging.

Pharmaceutics. 2022 Aug 9;14(8):1658. doi: 10.3390/pharmaceutics14081658.

PMID: 36015284

Breuil L, Marie S, Goutal S, Auvity S, Truillet C, Saba W, Langer O, Caillé F, Tournier N.
Comparative vulnerability of PET radioligands to partial inhibition of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: A criterion of choice?

J Cereb Blood Flow Metab. 2022 Jan;42(1):175-185. doi: 10.1177/0271678X211045444. Epub 2021 Sep 9.

PMID: 34496661

Communications orales en congrès

Breuil L, Goutal S, Marie S, Del Vecchio A, Audisio D, Soyer A, Goislard M, Saba W, Tournier N, Caillé F

Comparison of the Blood-Brain Barrier Transport and Vulnerability to P-Glycoprotein-Mediated Drug-Drug Interaction of Domperidone versus Metoclopramide Assessed Using In Vitro Assay and PET Imaging

EANM, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2022, Barcelona, Spain.

Breuil L., Caillé F., Marie S., Goutal S., Auvity S., Goislard M., Coulon C., Lekieffre T., Saba W., Tournier N.

In vivo comparison of the sensitivity of PET radioligands to detect moderate changes in P-gp

function at the blood-brain barrier

EANM, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2020, virtual.

Breuil L., Saba W., Marie S., Goutal S., Auvity S., Goislard M., Coulon C., Lekieffre T., Caillé F., Tournier N.

Refining the use of PET imaging to detect moderate changes in P-gp function at the blood-brain barrier

Congrès de la **SEISC** (Société pour l'Etude des Interfaces Sang-Cerveau), 2019, Orsay, France.

Communications affichées présentée en congrès

Breuil L., Ziani N., Leterrier S., Hugon G., Caillé F., Bouilleret V., Truillet C., Goislard M., El Biali M., Bauer M., Langer O., Goutal S., Tournier N.

Impact of Cytochrome Induction or Inhibition on the Plasma and Brain Kinetics of [¹¹C]metoclopramide, a PET Probe for P-Glycoprotein Function at the Blood-Brain Barrier

EMIM (European molecular imaging meeting), 2023, Salzburg, Austria.

Breuil L., Goutal S., Marie S., Del Vecchio A., Audisio D., Soyer A., Goislard M., Saba W., Tournier N., Caillé F.

Interactions médicamenteuses médiées par la P-gp au niveau de la barrière hémato-encéphalique : comparaison in vitro et in vivo par imagerie TEP de la dompéridone et du métoclopramide

SFMN (Société française de Médecine nucléaire), 2023, Montrouge, France.

Communications affichées en congrès

Breuil L., El Biali M., Vodovar D., Marie S., Auvity S., Goutal S., Rodrigo S., Bauer M., Langer O., Tournier N. Parametric imaging of P-glycoprotein function at the blood-brain barrier using KE, brain-maps generated from dynamic [¹¹C]metoclopramide PET data in rodents, monkeys, and humans.

EANM, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2023, Vienne, Autriche.

Breuil L., Marie S., Goutal S., Auvity S., Truillet C., Saba W., Langer O., Caillé F., Tournier N.

Comparative sensitivity of PET radioligands to partial inhibition of P-glycoprotein at the blood-brain barrier

Neuroreceptor mapping congress, 2021, virtual.

Breuil L., Saba W., Marie S., Goutal S., Auvity S., Goislard M., Coulon C., Lekieffre T., Caillé F., Tournier N.

Refining the use of PET imaging to detect moderate changes in P-gp function at the blood-brain barrier

SFMN (Société française de Médecine nucléaire), 2020, Montrouge, France.

Breuil L., Marie S., Goislard M., Langer O., Del Vecchio A., Audisio D., Caillé F., Tournier N.

Tailoring the sensitivity of PET tracers to detect P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions at the blood-brain barrier: a comparative *in vitro* study

EANM, 2019, Barcelona, Spain.