

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Rôle de la P-glycoprotéine, un transporteur ABC, sur la  
distribution cardiaque et tissulaire de la dompéridone et  
répercussions possibles sur  
l'intervalle QT**

par

Lucie Couture

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Sciences pharmaceutiques  
option Pharmacologie

Mars 2008

© Lucie Couture, 2008

Université de Montréal

Faculté des études supérieures



Cette thèse intitulée:

**Rôle de la P-glycoprotéine, un transporteur ABC, sur la  
distribution cardiaque et tissulaire de la dompéridone et  
répercussions possibles sur  
l'intervalle QT**

présentée par:

Lucie Couture

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Louis Brazier, Président-rapporteur

Jacques Turgeon, Directeur de recherche

Daniel Lamontagne, Membre du jury

Chantal Guillemette, Examinatrice externe

Représentant du doyen de la FES

## Résumé français

Il est bien établi que les transporteurs ABC ont un rôle de protection de l'organisme au sein de plusieurs tissus tels que l'intestin, le foie, le cerveau, les testicules ou le placenta par leur mécanisme d'extrusion de xénobiotiques vers le milieu extracellulaire. Dans un premier temps, une revue exhaustive de la littérature effectuée et présentée dans cet ouvrage au Chapitre I suggère la présence des transporteurs ABC également au niveau du cœur. Certains médicaments sont reconnus pour posséder la capacité de prolonger l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme en inhibant le canal potassique rectifiant retardé  $I_{Kr}$  responsable de la repolarisation cardiaque. Puisque le site de liaison au canal  $I_{Kr}$  semble être localisé au niveau intracellulaire, nous avons émis l'hypothèse que les transporteurs ABC, telle que la P-glycoprotéine (P-gp), par leur régulation des concentrations intracellulaires cardiaques, pourraient potentiellement contrôler l'accès d'un médicament bloqueur d' $I_{Kr}$  à son site de liaison sur ce canal potassique, et ainsi influencer l'incidence d'un prolongement de l'intervalle QT. Dans le Chapitre III, nous avons vérifié l'implication de la P-gp dans la distribution cardiaque et tissulaire du dompéridone, à la fois un substrat de la P-gp et un bloqueur d' $I_{Kr}$ , à l'aide de souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp. Les niveaux plus élevés de dompéridone observés dans plusieurs tissus incluant le cœur de souris mutées ont démontré que le transporteur P-gp semble jouer un rôle dans la modulation de la

distribution cardiaque du dompéridone. Plusieurs cas d'interactions médicamenteuses ont été rapportés dans la littérature lors de la co-administration de deux médicaments substrats des transporteurs ABC. De plus, certains médicaments auraient le potentiel de moduler les niveaux d'expression des transporteurs ABC. Pour ces raisons, nous avons déterminé si le vérapamil, un modulateur de la P-gp, pouvait altérer la distribution cardiaque et tissulaire du dompéridone chez des cobayes mâles et femelles suite à deux types de pré-traitement. Les résultats ont démontré une augmentation de la distribution du dompéridone au cœur et une tendance vers un prolongement de l'intervalle QT suite à une inhibition compétitive de la P-gp par le vérapamil administré 2 h avant le dompéridone. Par contre, suite à un pré-traitement de 5 jours au vérapamil destiné à vérifier une possible modulation de l'expression de la P-gp ou de son activité, aucun effet n'a été observé au niveau de la pharmacocinétique ou de la pharmacodynamie. De plus, les mâles ont présenté une distribution cardiaque et tissulaire plus importante que les femelles.

La réalisation de ces travaux de recherche ont permis de conclure que les transporteurs ABC, telle que la P-gp, semblent posséder un rôle dans le contrôle des concentrations cardiaques de médicaments. La déficience de l'activité de ces transporteurs à contrôler les concentrations intracardiaques peut donc représenter un facteur déterminant dans l'incidence de cardiotoxicités pour des médicaments ayant le potentiel de bloquer le canal  $I_{Kr}$ .

**Mots-clés** : dompéridone, P-glycoprotéine, transporteurs ABC, cœur, distribution tissulaire, métabolisme, intervalle QT

## Résumé anglais

It is well established that ABC transporters have a role in the protection of the organism for many tissues including intestines, liver, brain, testes and placenta by their mechanism of extrusion toward the extracellular region. Firstly, a revue of the literature presented in Chapter I suggests the expression of ABC transporters also in the heart. Some drugs are recognized to have the capabilities to prolong the QT interval in the electrocardiogram by blocking the voltage-gated potassium channel  $I_{Kr}$  responsible of cardiac repolarisation. Since the binding site to  $I_{Kr}$  is intracellular, we suggested the hypothesis by which ABC transporters, such as the P-glycoprotein (P-gp), by their regulation of cardiac intracellular concentrations, could potentially control access of  $I_{Kr}$  blockers to their binding site on this channel, thus influencing incidence of QT interval prolongation. In Chapter III, we verified the involvement of P-gp in the cardiac distribution of domperidone, which is both a substrate of P-gp and an  $I_{Kr}$  blocker, using mice deficient in the gene coding for P-gp. Higher levels of domperidone in many tissues including the heart of mutated mice suggested a role of P-gp in the modulation of the cardiac distribution of domperidone. Many cases of drug-drug interactions have been reported in the literature related to a co-administration of ABC transporter substrates. Moreover, some drugs seem to have the potential to modulate the expression of ABC transporters. For these reasons, we investigated whether verapamil, a P-gp modulateur, could alter the cardiac and tissue

distribution of domperidone in male and female guinea pigs following two different pre-treatments. Results showed a more important distribution of domperidone in the heart with a tendency to a prolongation of the QT interval following competitive inhibition of P-gp by verapamil administered 2 h prior domperidone. On the other hand following a pre-treatment of 5 days of verapamil, intended to verify a possible modulation of the P-gp expression or its activity, no pharmacokinetic or pharmacodynamic effects were observed. Moreover, males presented a more important cardiac and tissue distribution compared to females.

The accomplishment of these researches allowed us to conclude that ABC transporters, such as P-gp, have likely a role in the regulation of cardiac intracellular drug distribution. The deficiency in the activity of these transporters to control intracardiac concentrations of drugs can therefore represent a key determinant in the incidence of cardiac toxicities for drugs having the potential to block  $I_{Kr}$  channel.

**Keywords :** domperidone, P-glycoprotein, ABC transporters, heart, tissue distribution, metabolism, QT interval



## Tables des matières

Résumé français .....	iii
Résumé anglais.....	vi
Tables des matières .....	viii
Liste des tableaux .....	xvii
Liste des figures .....	xviii
Liste des abréviations .....	xix
Remerciements .....	xxii
CHAPITRE I .....	1
Introduction .....	1
1.1 Généralités.....	2
1.2 Transporteurs ABC .....	3
1.2.1 Classification.....	3
1.2.2 Structure et mécanisme d'action .....	7
1.3 Évidences de la présence de transporteurs ABC au niveau du cœur .....	12
1.3.1 Utilisation de différentes techniques de biologie moléculaire .....	12
1.3.2 Utilisation de souris mutées .....	24
1.4 Cardiotoxicités et transporteurs ABC .....	29
1.4.1 Évidences de cardiotoxicités et rôles possibles des transporteurs ABC .....	29
1.4.2 Les transporteurs ABC et le prolongement de l'intervalle QT .....	34
1.4.2.1 Le prolongement de l'intervalle QT.....	34
1.4.2.1.1 Signification physiologique de l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme et sa correspondance cellulaire et ionique .....	34
1.4.2.1.1.1 L'électrocardiogramme .....	34
1.4.2.1.1.2 Le potentiel d'action.....	37

1.4.2.1.2	Facteurs ioniques prédisposant à la prolongation de l'intervalle QT.....	42
1.4.2.1.2.1	Diminution des courants sortants potassiques.....	43
1.4.2.1.2.2	Diminution de l'inactivation ou augmentation de l'activation des courants entrants sodiques .....	45
1.4.2.1.2.3	Diminution de l'inactivation ou augmentation de l'activation des courants entrants calciques.....	46
1.4.2.1.3	Autres facteurs prédisposant à une prolongation de l'intervalle QT.....	47
1.4.2.1.3.1	Administration de médicaments.....	47
1.4.2.1.3.2	Facteurs génétiques .....	50
1.4.2.1.3.3	Bradychardie .....	52
1.4.2.1.3.4	Sexe féminin.....	52
1.4.2.2	Implication possible des transporteurs ABC dans le prolongement de l'intervalle QT .....	53
1.5	Expression des transporteurs ABC.....	56
1.5.1	Régulation de l'expression des transporteurs ABC.....	56
1.5.1.1	Régulation par les médicaments.....	56
1.5.1.2	Régulation par les conditions pathologiques.....	58
1.5.2	Polymorphismes .....	59
1.6	Problématique et objectifs de recherche.....	62
1.7	Références .....	67
CHAPITRE II.....		106
Principales méthodes utilisées.....		106
2.2.1	Marquage radioactif du dompéridone .....	108
2.2.2	Comptage par scintillation liquide .....	109
2.2.2.1	Description de la technique de comptage par scintillation liquide....	109

2.2.2.2	Résultats quantitatifs .....	110
2.2.3	Autoradioluminographie sur corps entier.....	111
2.2.3.1	Validation .....	113
2.2.4	Micro-autoradiographie.....	114
2.2.5	Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec détection radiométrique.....	115
2.2.5.1	Principes de base de la technique de HPLC.....	115
2.2.5.2	Détecteur radiométrique.....	116
2.2.5.3	Calibration.....	117
2.3	Conclusion.....	118
CHAPITRE III	.....	120
Étude du rôle de la P-gp sur la distribution du dompéridone au cœur et autres tissus par l'utilisation de souris mutées pour le gène codant pour la P-glycoprotéine.....		120
3.1	Involvement of P-glycoprotein in the distribution of domperidone to the heart and other tissues in mice .....	121
3.1.1	Résumé.....	123
3.1.2	Abstract .....	124
3.1.3	Introduction .....	126
3.1.4	Methods.....	128
3.1.4.1	Chemicals.....	128
3.1.4.2	Animals .....	129
3.1.4.3	Confirmation of genotypes.....	129
3.1.4.4	Dose formulation.....	130
3.1.4.5	Dose administration.....	131
3.1.4.6	Study design .....	131
3.1.4.7	Liquid scintillation spectroscopy .....	132
3.1.4.8	Whole-body autoradioluminography (WBA).....	133

3.1.4.9	HPLC with radiometric detection .....	134
3.1.4.10	Data analysis .....	135
3.1.4.11	Statistical methods.....	135
3.1.5	Results .....	136
3.1.5.1	Confirmation of genotype .....	136
3.1.5.2	General tissue distribution and pharmacokinetics of [ <sup>3</sup> H]domperidone-related radioactivity.....	137
3.1.5.3	Differences between mouse genotypes in tissue distribution and pharmacokinetics of [ <sup>3</sup> H]domperidone-related radioactivity in whole-body tissues.....	141
3.1.5.4	Differences between mouse genotypes in tissue distribution and pharmacokinetics of [ <sup>3</sup> H]domperidone-related radioactivity in the heart.....	145
3.1.5.5	HPLC with radiometric detection .....	146
3.1.6	Discussion .....	149
3.1.7	Acknowledgments.....	154
3.1.8	References .....	155
3.1.9	Figure legends .....	163
3.2	Résultats additionnels de souris double-mutées <i>mdr1a/1b</i> (-/-).....	170
3.2.1	Introduction .....	170
3.2.2	Matériel et méthodes .....	171
3.2.2.1	Substances chimiques.....	171
3.2.2.2	Animaux.....	171
3.2.2.3	Formulation .....	172
3.2.2.4	Administration de la dose.....	172
3.2.2.5	Structure de l'étude .....	173
3.2.2.6	Comptage par scintillation liquide .....	173
3.2.2.7	HPLC avec détection radiométrique .....	174
3.2.2.8	Analyse des données .....	174

3.2.3	Résultats .....	174
3.2.3.1	Différences entre les souris <i>mdr1a/1b</i> (-/-) et les souris normales et <i>mdr1a</i> (-/-) pour la distribution tissulaire et cardiaque de la radioactivité associée au <sup>3</sup> H-dompéridone .....	174
3.2.3.2	HPLC avec détection radiométrique .....	177
3.2.4	Discussion .....	179
3.2.5	Conclusion.....	181
3.2.6	Références .....	182
3.2.7	Légende de figures .....	183
3.3	Résultats additionnels d'identification des métabolites du dompéridone .....	187
3.3.1	Introduction .....	187
3.3.2	Matériel et méthodes .....	188
3.3.2.1	HPLC avec détection radiométrique .....	188
3.3.2.2	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).....	188
3.3.3	Résultats .....	190
3.3.4	Discussion .....	192
3.3.5	Conclusion.....	194
3.3.6	Références .....	195
3.3.7	Légende de figures .....	196
CHAPITRE IV .....		202
Effets de pré-traitements au vérapamil sur la distribution du dompéridone au cœur et autres tissus chez des cobayes mâles et femelles et répercussions pharmacodynamiques sur l'intervalle QT .....		202
4.1	Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone to the heart and other tissues in guinea pigs .....	203
4.1.1	Résumé .....	203

4.1.2	Abstract .....	205
4.1.3	Introduction .....	207
4.1.4	Methods .....	209
4.1.4.1	Chemicals .....	209
4.1.4.2	Animals .....	209
4.1.4.3	Dose formulation .....	210
4.1.4.4	Study design .....	211
4.1.4.5	Liquid scintillation spectroscopy .....	212
4.1.4.6	Whole-body autoradioluminography (WBA) .....	213
4.1.4.7	HPLC with radiometric detection .....	214
4.1.4.8	Data analysis .....	215
4.1.5	Results .....	215
4.1.5.1	Metabolite profiling by HPLC with radiometric detection .....	215
4.1.5.2	General tissue distribution of <sup>3</sup> H-domperidone-related radioactivity in male and female guinea pigs .....	216
4.1.5.3	Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone in whole-body tissues in male and female guinea pigs .....	217
4.1.5.4	Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone in the heart in male and female guinea pigs .....	219
4.1.6	Discussion .....	219
4.1.7	Acknowledgments .....	224
4.1.8	References .....	225
4.1.9	Figure legends .....	231
4.2	Résultats additionnels .....	240
4.2.1	Introduction .....	240
4.2.2	Matériel et méthodes .....	242
4.2.2.1	Enregistrement d'électrocardiogramme .....	242
4.2.3	Résultats .....	243

4.2.4	Discussion .....	243
4.2.5	Conclusion.....	245
4.2.6	Références .....	246
4.2.7	Légende de figures .....	248
CHAPITRE V .....		250
Conclusion générale .....		250
5.1	Conclusion.....	251
5.2	Références .....	260
ANNEXE I.....		265
The ATP-Binding Cassette (ABC) transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart .....		265
1.1	Résumé.....	269
1.2	Abstract .....	270
1.3	Introduction .....	271
1.4	ATP-Binding Cassette Transporters.....	272
1.4.1	Classification.....	273
1.4.2	Structure and Mechanisms of Action .....	277
1.5	ATP-Binding Cassette Transporters and the Disposition of Drugs in Cardiac tissues.....	279
1.5.1	Evidence for the Presence of ATP-Binding Cassette Transporters in the Heart.....	279
1.5.1.1	Use of Different Molecular Biology Techniques.....	279
1.5.1.2	Use of Knockout Mice .....	289
1.5.2	Cardiotoxicity Related to ATP-Binding-Cassette Transporters.....	294
1.5.3	ATP-Binding-Cassette Transporters and Drug-Induced Long QT Syndrome .....	299

1.6	Expression of ATP-Binding Cassette Transporters.....	300
1.6.1	Regulation of Expression of ATP-Binding Cassette Transporters.....	300
1.6.1.1	Regulation by Drugs.....	300
1.6.1.2	Regulation by Pathological Conditions.....	302
1.6.2	Polymorphisms.....	302
1.7	Summary and Future Perspectives .....	304
1.8	Acknowledgments .....	307
1.9	References .....	308
1.10	Figure legends .....	341
	ANNEXE II.....	344
	Role of ATP-Binding Cassette transporters in drug distribution to the heart and protection from toxic compounds.....	344
2.1	Résumé .....	346
2.2	Abstract .....	347
2.3	Introduction .....	348
2.4	Expression of ABC transporters in the heart.....	349
2.5	ABC transporters and evidence of their role in the protection of the heart...351	
2.5.1	ABC transporter drug substrates and cardiotoxicities associated with deficiency in ABC transporter genes.....	351
2.5.2	Cardiotoxicities and interactions of ABC transporter drug substrates..352	
2.6	ABC transporters and cellular mechanisms of cardiotoxicity such as drug-induced Long QT syndrome.....	357
2.7	Conclusion.....	358
2.8	References .....	359
	ANNEXE III.....	368
	Autre contribution .....	368



ANNEXE IV .....	370
Accords des coauteurs et contributions aux travaux .....	370

## Liste des tableaux

### Chapitre I

Tableau 1: Classification des transporteurs ABC chez l'humain.....	5
Tableau 2: Propriétés des transporteurs ABC impliqués dans le transport de médicaments.....	6
Tableau 3: Présence de transporteurs ABC dans le coeur détectée par différentes techniques de biologie moléculaire.....	21
Tableau 4: Classification des isoformes de la P-glycoprotéine.....	24
Tableau 5: Évidences <i>in-vivo</i> de la présence de transporteurs ABC dans le cœur par l'utilisation de souris mutées.....	28
Tableau 6: Interactions médicamenteuses et augmentation de la distribution cardiaque.....	33
Tableau 7: Médicaments bloqueurs de $I_{Kr}$ ayant le potentiel de causer des torsades de pointes.....	49
Tableau 8: Gène associés à l'apparition d'une prolongation de l'intervalle QT si muté.....	51

## Liste des figures

### Chapitre I

Figure 1: Représentation de l'arrangement des transporteurs ABC au niveau de la membrane plasmique.....	11
Figure 2: Représentation de la prolongation de l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme. ....	36
Figure 3: Courants ioniques dépolarisants et repolarisants impliqués dans les potentiels d'action du ventricule et de l'oreillette dans le coeur humain.....	38
Figure 4: Représentation de l'activité électrique de différentes régions du cœur et d'un électrocardiogramme qui est la résultante des ondes de dépolarisation et de repolarisation du cœur. ....	41
Figure 5: Représentation d'une post-dépolarisation précoce. ....	42
Figure 6: Représentation schématique d'une torsade de pointe. ....	43
Figure 7: Représentation schématique de l'hypothèse de la régulation des concentrations intracellulaires de bloqueur d' $I_{Kr}$ par les transporteurs ABC, telle que la P-gp, dans les cardiomyocytes.....	55

## Liste des abréviations

ABC: ATP-binding cassette

ALD: *adrenoleukodystrophy*

ALDR: *adrenoleukodystrophy-related*

ALDP: *adrenoleukodystrophy protein*

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine triphosphate

AUC<sub>0-tlast</sub>: région sous la courbe concentration vs temps, du temps 0 au dernier temps analysé

BCRP: *breast cancer resistance protein*

BSEP: *bile salt export pump*

Ca<sup>2+</sup>: ion calcium

CACNA1C: gène codant pour une protéine responsable de I<sub>Ca,L</sub>

CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

C<sub>max</sub>: concentration maximale

cMOAT, *canalicular multispecific organic anion transporter*

CPM: coups par minute

CYP450: cytochrome P450

CYP3A: cytochrome P450 de la sous-famille 3A

DPM: désintégrations par minute

*hERG*: gène codant pour  $I_{Kr}$  (*human ether-a-go-go-related gene*)

HPLC: chromatographie en phase liquide à haute performance

$IC_{50}$ : concentration à laquelle une inhibition de 50% est observée

$I_{Ca,L}$ : courant calcique lent

$I_K$ : courant potassique rectifiant retardé

$I_{Kr}$ : composante rapide de  $I_K$

$I_{Ks}$ : composante lente de  $I_K$

$I_{Kur}$ : courant potassique ultra-rapide

$I_{Na}$ : courant sodique

$I_{to}$ : courant potassique transitoire

$K^+$ : ion potassium

*KCNE1*: gène codant pour une protéine responsable de  $I_{Ks}$

*KCNE2*: gène codant pour une protéine responsable de  $I_{Kr}$

*KCNJ2*: gène codant pour une protéine responsable de  $I_{K1}$

*KCNQ1 (KvLQT1)*: gène codant pour une protéine responsable de  $I_{Ks}$

LC/MS: chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

MDR: *multidrug resistance*

*MDR1*: gène codant pour la P-glycoprotéine chez l'humain

MRP: *multidrug resistance-associated proteins*

*m/z*: rapport masse/charge

Na<sup>+</sup>: ion sodium

NBD: domaine de liaison aux nucléotides

OABP: *organic anion-binding transporter*

P-gp: P-glycoprotéine

PCR: réaction de polymérisation en chaîne

RT: temps réel

SCN5A: gène codant pour une protéine responsable de I<sub>Na</sub>

SPGP: *sister of P-glycoprotein*

QTc: intervalle QT corrigé pour la fréquence cardiaque

TAP: *transporter associated with antigen processing*

T<sub>max</sub>: temps auquel la concentration maximale est obtenue

TdP: torsade de pointe

TMD: domaine transmembranaire

WBA: *whole-body autoradioluminography*

## Remerciements

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans l'aide précieuse de plusieurs personnes importantes.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Jacques Turgeon. Je le remercie pour sa rigueur scientifique, son dévouement, sa générosité et sa grande passion à partager tes innombrables connaissances, et enfin pour la confiance qu'il m'a témoignée dans la réalisation de ce projet.

J'aimerais également remercier Dr John A. Nash des Laboratoires Charles River Services Précliniques Montréal pour son appui dans ma décision de faire des études doctorales. Merci pour cette collaboration exceptionnelle avec Charles River.

Je suis reconnaissante envers la Fondation pour la recherche en santé de Rx&D pour la bourse Robert-Dugal et la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal pour leur soutien financier. Je remercie également les Laboratoires Charles River Services Précliniques Montréal qui m'ont permis d'utiliser les instruments et laboratoires.

Merci à mes collègues de laboratoire: Véronique Michaud, Raymond Hreiche, Marcin Zakrzewski, Sylvie Poirier Larabie et François Bélanger pour le partage de

leurs connaissances et les bons moments passés. Je remercie Alexandra Furtos du département de chimie de l'Université de Montréal et son équipe pour les analyses LC/MS.

Un merci particulier à mes collègues de Charles River pour leur aide et leur disponibilité, plus particulièrement au Dr Linh Nguyen, Dr Limea Tao et au Dr Eric Jacquinet.

Un merci particulier à mes parents et ma famille qui m'ont continuellement soutenu et encouragé et manifesté un grand intérêt pour mes travaux. Je remercie également mes amis pour leurs encouragements.

Et le dernier et non le moindre, merci à mon conjoint Mario Riendeau pour m'avoir appuyé et encouragé dans ma décision de poursuivre mes études. Merci pour ta compréhension et ta patience dans les moments occupés.



# **CHAPITRE I**

## **Introduction**

## 1.1 Généralités

Au début des années 1970, il a été démontré que l'accumulation tissulaire de xénobiotiques ne dépendait non seulement de leur habileté à pénétrer dans les cellules mais également de leur habileté à en sortir. En effet, les recherches de Dano (1973) ont révélé en utilisant des cellules tumorales d'ascites d'Ehrlich que les concentrations intracellulaires de daunorubicine pouvaient être diminuées par un mécanisme actif d'extrusion. Quelques années plus tard Juliano et Ling (1976) isolaient une large glycoprotéine de la membrane plasmique de cellules d'ovaire de hamsters chinois résistantes à la colchicine: ils ont nommé cette protéine la P-glycoprotéine (P-gp). Le gène codant pour la P-gp (*MDR1*) a par la suite été identifié grâce à sa surexpression dans les cellules tumorales associées à une résistance acquise aux médicaments anticancéreux (Ueda et coll., 1987). Bien que l'on concevait que la P-gp était confinée qu'aux cellules tumorales, elle a été par la suite reconnue pour être exprimée dans des cellules de tissus normaux.

Il y a environ 50 transporteurs ABC découverts jusqu'à présent chez l'humain. Parmi ceux-ci, 14 ont au moins une évidence publiée au niveau du transport de xénobiotiques. Il est maintenant bien établi que ces transporteurs démontrent un rôle de protection de l'organisme au niveau de l'intestin, du foie, du cerveau, des testicules ou du placenta. Par contre, il existe très peu d'information sur le rôle

fonctionnel de la P-gp et des autres ABC transporteurs au niveau de d'autres tissus dont le cœur.

## **1.2 Transporteurs ABC**

Les transporteurs ABC représentent la plus grande famille de transporteurs transmembranaires. Ces protéines sont exprimées dans une grande variété d'organismes et environ 50 transporteurs ABC ont été identifiés jusqu'à présent chez l'humain (Tirona et Kim, 2002). La grande famille de transporteurs ABC est divisée en sept sous-familles (Dean et coll., 2001; voir aussi site web de M. Müller à: <http://www.nutrigene.4t.com/humanabc.htm> (mis à jour en novembre 2006)). Étant donné que ces protéines sont dépendantes de l'ATP, l'hydrolyse de l'ATP est requise pour transporter les substrats contre un gradient de concentration du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Plusieurs substrats endogènes et exogènes sont substrats des transporteurs ABC dont les acides aminés, sucres, ions, peptides, protéines et les phospholipides (Tirona et Kim, 2002).

### **1.2.1 Classification**

Les protéines de la grande famille des transporteurs ABC sont classifiées sur la base de la séquence et organisation de leur(s) domaine(s) de liaison aux nucléotides (NBD) ainsi que sur la base de la similarité de la structure de leur gène. Les membres

des sept sous-familles de transporteurs ABC sont énumérés dans le Tableau 1 dans lequel les protéines possédant une activité connue dans le transport de xénobiotiques sont présentées sous forme de cellules ombragées. Deux sous-familles sont particulièrement impliquées dans le transport de xénobiotiques. Ces deux sous-familles sont les protéines *multidrug resistance* (MDR)/TAP (sous-famille B) et les *multidrug resistance-associated proteins* (MRP)/CFTR (sous-famille C). Le Tableau 2 résume quelques propriétés des transporteurs ABC étant reconnus dans le transport de xénobiotiques. De plus, quelques transporteurs étant exprimés dans le cœur mais n'ayant pas d'activité reconnue dans le transport de xénobiotiques ne seront pas discutés dans cette thèse mais sont discutés dans un article scientifique écrit par Solbach et coll., (2006).

Tableau 1: Classification des transporteurs ABC chez l'humain.<sup>a</sup> (adapté de Couture et coll., 2006)

ABCA1 (Sous-famille A)	MDR/TAP (Sous-famille B)	MRP/CFTR (Sous-famille C)	ALD (Sous-famille D)	OABP (Sous-famille E)	GCN20 (Sous-famille F)	White (Sous-famille G)
ABCA1	ABCB1 (MDR1 ou P-GP)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2	ABCB2 (TAP1)	ABCC2 (MRP2 ou cMOAT)	ABCD2 (ALDR)		ABCF2	ABCG2 (BCRP)
ABCA3	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCD3		ABCF3	ABCG4
ABCA4	ABCB4 (MDR3)	ABCC4 (MRP4)	ABCD4			ABCG5
ABCA5	ABCB5	ABCC5 (MRP5)				ABCG8
ABCA6	ABCB6	ABCC6 (MRP6)				
ABCA7	ABCB7	ABCC7 (CFTR)				
ABCA8	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
ABCA10	ABCB10	ABCC10 (MRP7)				
ABCA12	ABCB11 (BSEP ou SPGP)	ABCC11 (MRP8)				
ABCA13		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				

<sup>a</sup> Les cellules ombragées représentent les transporteurs ABC ayant une activité reconnue dans le transport de médicaments.

Tableau 2: Propriétés des transporteurs ABC impliqués dans le transport de médicaments. (adapté de Couture et coll., 2006)

Transporteur ABC	Nombre de domaines (TMD)	Principale expression tissulaire	Localisation apicale ou basolatérale	Substrats <sup>a</sup>	Références
ABCB1 (MDR1 ou P-gp)	2	foie, rein, intestin, cerveau, testicule, glande surrénale, utérus, ovaire	apicale	quinidine, vérapamil, céliprolol, talinolol, digoxine, daunorubicine, doxorubicine, vinblastine, étoposide, méthotrexate, mitoxanthrone, paclitaxel, topotecan, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir	Ueda et coll., 1987; Pastan et coll., 1988; de Lannoy et Silverman, 1992; Hendricks et coll., 1992; Peters et Roelofs, 1992; Karlsson et coll., 1993; Kartner et coll., 1983; de Graaf et coll., 1996; Sparreboom et coll., 1997; Kim et coll., 1998; Gramatte et Oertel, 1999; Verschraagen et coll., 1999; Jones et coll., 2001
ABCB4 (MDR3)	2	foie	apicale	vinblastine, paclitaxel, digoxine	Smith et coll., 2000
ABCB11 (BSEP ou SPGP)	2	foie, intestin	apicale	vinblastine, cyclosporine, rifampicine	Török et coll., 1999; Lecreur et coll., 2000; Stieger et coll., 2000
ABCC1 (MRP1)	3	intestin, cerveau, rein, poumon, testicule	basolatérale	doxorubicine, daunorubicine, vinblastine, vincristine, étoposide, méthotrexate, paclitaxel, grépaflaxacine	Cole et coll., 1992; Cole et coll., 1994; Flens et coll., 1996; Sharp et coll., 1998; Hooijer et coll., 1999; Evers et coll., 2000; Tamai et coll., 2000; Cherrington et coll., 2002
ABCC2 (MRP2 ou MOAT)	3	foie, intestin, rein	apicale	cisplatine, doxorubicine, étoposide, vincristine, méthotrexate, indinavir, ritonavir, saquinavir, adéfovir, cidofovir	Schaub et coll., 1997; Cui et coll., 1999; Hooijberg et coll., 1999; Kawabe et coll., 1999; Fromm et coll., 2000; Miller 2001; Huisman et coll., 2002
ABCC3 (MRP3)	3	intestin, rein, foie, pancréas, placenta, côlon	basolatérale	daunorubicine, doxorubicine, vincristine, étoposide, teniposide, méthotrexate	Kool et coll., 1997; Belinsky et coll., 1998; Kool et coll., 1999; Zeng et coll., 1999; St-Pierre et coll., 2000; Zelcer et coll., 2001
ABCC4 (MRP4)	2	prostate, poumon, glande surrénale, ovaire, testicule	basolatérale et apicale (dépendant du type cellulaire)	méthotrexate, adéfovir	Lee et coll., 1998; Schuetz et coll., 1999; Lee et coll., 2000; Chen et coll., 2002
ABCC5 (MRP5)	2	muscle squelettique, coeur, cerveau	basolatérale	Adéfovir	Kool et coll., 1997; Belinsky et coll., 1998; Wijnholds et coll., 2000; Haimour et coll., 2004
ABCC6 (MRP6)	3	rein, foie	basolatérale	cisplatine, doxorubicine, étoposide, daunorubicine,	Belinsky et Kruh, 1999; Bergen et coll., 2000; Belinsky et coll., 2002
ABCC10 (MRP7)	3	coeur, muscle squelettique, rate, foie	non déterminé	doxorubicine, vinblastine, vincristine, paclitaxel, docétaxel	Kao et coll., 2002; Orr et coll., 2003; Hopper-Borge et coll., 2004
ABCC11 (MRP8)	2	sein, testicule	non déterminé	analogues des nucléotides purine et pyrimidine	Bera et coll., 2001
ABCC12 (MRP9)	2	sein, testicule, cerveau, ovaire, muscle squelettique	non déterminé	non déterminé	Bera et coll., 2002
ABCG2 (BCRP)	1	placenta, cerveau	apicale	daunorubicine, doxorubicine, étoposide, teniposide, méthotrexate, mitoxanthrone, topotecan	Doyle et coll., 1998; Maliapaard et coll., 1999; Maliapaard et coll., 2001; Volk et coll., 2002; Allen et coll., 2003; Volk et Schneider, 2003; Wang et coll., 2003; Aronica et coll., 2005
ABCA8	not déterminé	coeur, muscle squelettique, foie	non déterminé	doxorubicine, digoxine	Tsuruoka et coll., 2002

<sup>a</sup> Liste non exhaustive.

## 1.2.2 Structure et mécanisme d'action

Les transporteurs ABC contiennent typiquement 12 régions transmembranaires hydrophobes dans la membrane cellulaire. Ces régions sont divisées en deux parties formant deux domaines transmembranaires (TMD) distincts, chacun constitué d'un domaine de liaison aux nucléotides (NBD) (Figure 1A). La P-gp, BSEP, MRP4, MRP5, MRP8 et MRP9 sont des transporteurs caractérisés par cette structure. D'autres transporteurs (MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 et MRP7) possèdent un domaine transmembranaire supplémentaire à l'extrémité N-terminale comprenant cinq régions transmembranaires (Figure 1B). Finalement, d'autres transporteurs ABC tel que BCRP possèdent que six régions transmembranaires et un domaine de liaison aux nucléotides et sont donc considérés comme des demi-transporteurs (Hyde et coll., 1990) (Figure 1C). Les transporteurs ABC partagent 30 à 50% (200-250 acides aminés) d'homologie dans leur séquence. Les régions d'homologie importantes incluent les deux domaines de liaison aux nucléotides qui sont situés du côté cytoplasmique de la membrane (Higgins et coll., 1986; Hyde et coll., 1990). Il est suggéré que les domaines transmembranaires renferment les sites de liaison aux substrats et que la différence de spécificité de liaison aux substrats est une conséquence des structures divergentes des domaines transmembranaires (Locher et coll., 2002; Chang 2003). Les domaines de liaison aux nucléotides sont les sites de liaison et d'hydrolyse de l'ATP cytoplasmique. L'hydrolyse de l'ATP assure la disponibilité de l'énergie nécessaire pour le transport des substrats (Schneider et Hunke, 1998). Chaque transporteur ABC renferme dans chacun de ses domaines de

liaison aux nucléotides au moins trois séquences conservées: la séquence signature, le Walker A et le Walker B (Figure 1). Il a été suggéré que la séquence signature soit impliquée dans la transduction de l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP aux changements de conformation dans les domaines transmembranaires responsable pour le transport des substrats (Hyde et coll., 1990). Des acides aminés spécifiques sont importants pour les motifs Walker A et Walker B. En effet, un changement d'acide aminé pour la lysine et aspartate dans les motifs Walker A et Walker B, respectivement, dans l'un ou l'autre des domaines de liaison aux nucléotides a résulté en une perte de l'hydrolyse de l'ATP pour le transporteur P-gp (Takada et coll., 1998; Urbatsch et coll., 1998; Hrycyna et coll., 1999).

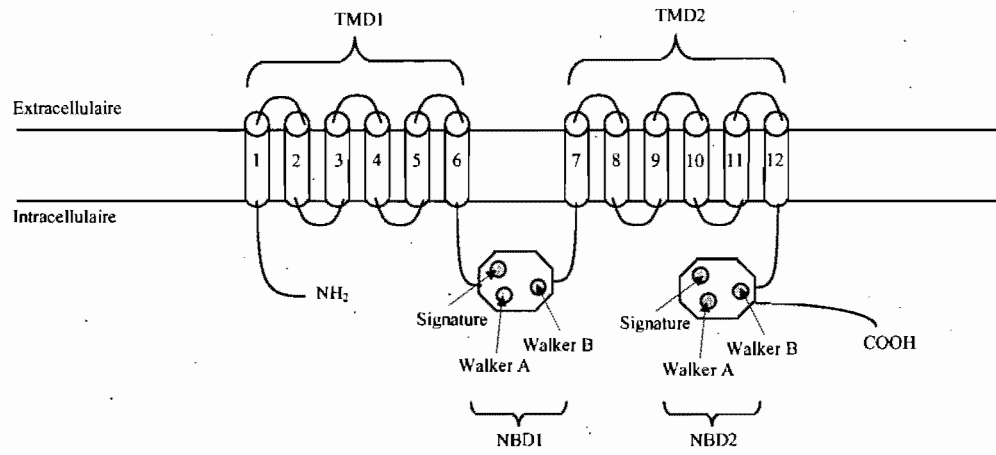
La visualisation de la structure est nécessaire pour comprendre comment les transporteurs ABC transportent leurs substrats au travers la membrane plasmique. La structure du transporteur de la vitamine B<sub>12</sub> BtuCD d'*Escherichia coli* et la structure aux rayons X de MsbA, deux transporteurs ABC provenant de bactéries, ont contribué à obtenir des informations importantes additionnelles (Locher et coll., 2002; Reyes et Chang, 2005). Par exemple, il est maintenant suggéré que la liaison aux nucléotides et l'hydrolyse de l'ATP soient des propriétés à la fois des deux domaines de liaison aux nucléotides plutôt qu'à un seul domaine. De plus, l'étude de la structure de BtuCD a démontré l'absence d'un canal continu à travers la membrane



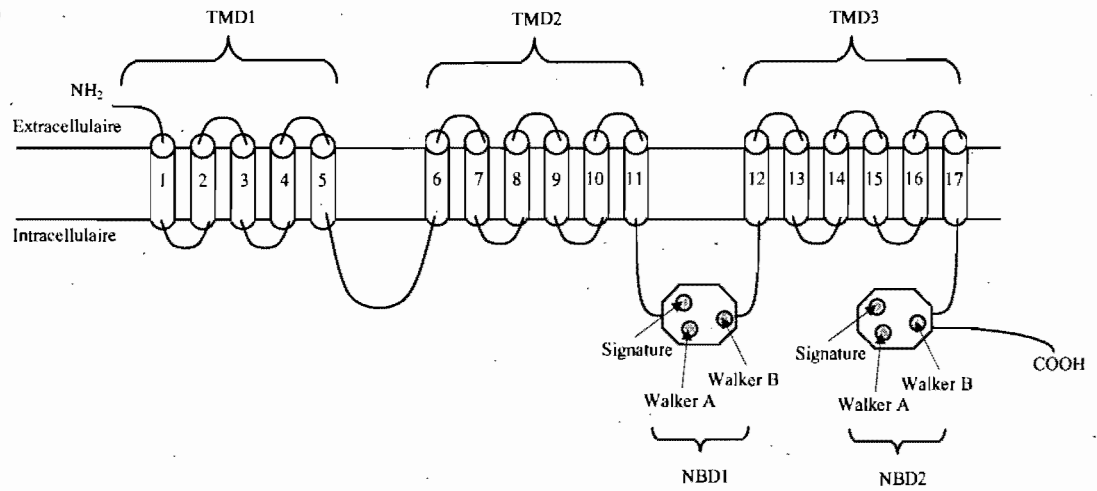
plasmique. Il a été suggéré également qu'au moins deux barrières étaient requises pour les transporteurs ABC pour bloquer alternativement l'accès à l'un ou l'autre côté de la membrane (Locher et Borths, 2004).

L'étude des structures à de plus hautes résolutions sont requises pour élucider des questions fondamentales additionnelles telle que la cascade signalétique par laquelle les domaines transmembranaires contrôlent l'activité ATPase dans le domaine de liaison aux nucléotides en réponse à la liaison d'un substrat. De plus, des informations additionnelles sont nécessaires pour comprendre comment les domaines de liaison aux nucléotides utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour mener à des changements conformationnels dans les domaines transmembranaires responsables du transport des substrats.

A)



B)



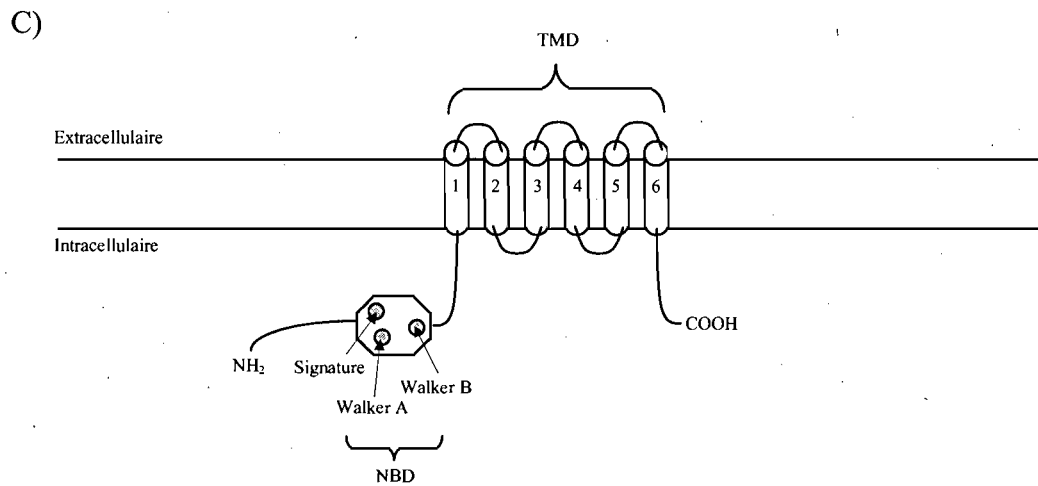


Figure 1: Représentation de l'arrangement des transporteurs ABC au niveau de la membrane plasmique. A) Les transporteurs P-gp, BSEP, MRP4, MRP5, MRP8 et MRP9 contiennent 12 régions transmembranaires divisées en deux parties formant deux domaines transmembranaires (TMD), chacun comprenant un domaine de liaison aux nucléotides (NBD). B) Les transporteurs MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 et MRP7 possèdent 5 régions transmembranaires supplémentaires à l'extrémité N-terminale. C) Le transporteur BCRP est un demi-transporteur et contient seulement 6 régions transmembranaires et un domaine de liaison aux nucléotides. (adapté de Couture et coll., 2006)

## **1.3 Évidences de la présence de transporteurs ABC au niveau du cœur**

### **1.3.1 Utilisation de différentes techniques de biologie moléculaire**

Tel que décrit dans les sections précédentes, le transporteur P-gp qui a été identifié dans un premier temps dans les cellules tumorales, a été subséquemment reconnu exprimé dans les tissus normaux incluant le cœur. Le Tableau 3 résume les évidences de l'expression de la P-gp et de d'autres transporteurs ABC dans le cœur par l'utilisation de techniques de biologie moléculaire.

Il a été démontré que la P-gp est codée chez l'homme par le gène *ABCB1* (aussi appelé *MDR1*) et par les gènes *mdr1a* (aussi appelé *mdr3*) et *mdr1b* (aussi appelé *mdr1*) chez les rongeurs (Schinkel, 1997) (Tableau 4). Les deux isoformes de la P-gp chez la souris semblent remplir la même fonction que MDR1 chez l'humain (Schinkel et coll., 1997). À la fin des années 1980 et au début des années 1990, l'expression de la P-gp dans les tissus a été étudiée de façon intensive. Des études utilisant des tissus de cœurs humains ont révélé que la P-gp était exprimée dans le

cœur, bien qu'à des niveaux pas nécessairement très élevés. La première étude avec une telle évidence a été effectuée par hybridation *slot blot* par Fojo et collègues (1987). Par la suite, au début des années 1990 la technique d'immunohistochimie fut utilisée pour mesurer l'expression de la P-gp dans des tissus humains tel que le cœur. Une étude effectuée en 1990 a démontré une coloration importante avec l'anticorps C-219 (qui peut également reconnaître MDR3 et P-gp), une faible coloration avec l'anticorps JSB-1 (reconnait P-gp) et une absence de coloration avec un troisième anticorps MRK-16 (reconnait P-gp) pour le myocarde (van der Valk et coll., 1990). Deux années plus tard, l'anticorps C-219 révélait une coloration importante pour des échantillons de cœur foetaux mais une absence de coloration pour les anticorps spécifiques à MDR1 MRK-16 et JSB-1. Par conséquent, van Kalken et collègues (1992) concluaient que l'expression de *MDR1* dans le cœur foetal était peu probable étant donné l'absence de coloration avec les anticorps spécifiques à MDR1 et l'absence d'expression d'ARNm par la technique de protection à la RNase. Une étude similaire utilisant quatre anticorps dirigés contre MDR1 dans l'endocarde, le myocarde et l'épicarde a révélé une faible coloration pour seul le myocarde pour trois des anticorps utilisés, suggérant néanmoins la présence de P-gp dans le muscle cardiaque (Pavelic et coll., 1993). Quelques années plus tard, une étude démontra une coloration positive avec l'anticorps JSB-1 dans des tissus de cœur humain, indiquant une fois de plus la présence de P-gp dans le myocarde (Sugawara et coll., 1997). Plus récemment, la P-gp fut détectée par immunohistochimie en utilisant

l'anticorps JSB-1 pour des échantillons de cœurs humains, soit 15 ventricules gauches et 51 oreillettes. L'expression d'ARNm spécifiques à MDR1 dans les tissus étudiés a été confirmée par RT-PCR. Les techniques d'immunohistochimie et hybridation *in situ* ont permis de localiser la P-gp de façon prédominante dans les cellules endothéliales des capillaires et des artérioles. Étant donné cette similarité de l'expression de la P-gp au niveau du cœur et du cerveau, il a été proposé que la P-gp pouvait représenter une barrière fonctionnelle entre le sang et les cardiomyocytes tout comme la P-gp représente une barrière fonctionnelle entre le sang et le cerveau (Meissner et al., 2002, 2004). Une autre étude récente a révélé la présence d'ARNm relié à la P-gp, bien qu'à des niveaux relativement faibles, dans le cœur d'un homme asiatique par RT-PCR (Nishimura et coll., 2004).

Les études utilisant la technique de protection à la RNase chez les rongeurs ont fourni des évidences de l'expression de la P-gp au niveau cardiaque. En effet, de l'ARNm relié à la P-gp fut détecté, bien qu'à des niveaux très faibles dans le cœur de hamsters chinois (Baas et Borst, 1988). Des niveaux significatifs d'ARNm de *mdr1a* et *mdr1b* ont également été retrouvés dans le cœur de souris BALB/c et C57BL/6J en utilisant deux différentes techniques (Croop et coll., 1989; Teeter et coll., 1990). Chez les rats Wistar, l'expression du gène *mdr1a* a été démontrée en utilisant la technique de RT-PCR; le signal est apparu plus important dans les myocytes en

culture que dans les tissus cardiaques de rats adultes et de nouveaux-nés suggérant ainsi une expression cardiaque de *mdr1a* davantage localisée au niveau des cardiomyocytes (Cayre et coll., 1996). Ceci fut confirmé quelques années plus tard par l'étude de Estevez et collègues (2000) qui a démontré par immunohistochimie (anticorps JSB-1) pour la première fois l'expression de la P-gp dans les cardiomyocytes. Le transporteur P-gp a également été retrouvé dans les membranes de cellules endothéliales pour des échantillons de cœur de rats bien que non limité à ce site (Beaulieu et coll., 1997). Ces résultats sont en accord avec les résultats de Meissner et collègues (2002) qui ont décelé la présence de la P-gp dans les cellules endothéliales de petits vaisseaux pour des échantillons de cœurs humains.

La présence d'un second isoforme de la P-gp, MDR3 chez l'humain et *mdr2* chez le rongeur fut également étudiée. Chez l'humain, les résultats de la technique de protection à la RNase ont démontré de faibles niveaux d'ARNm de MDR3 dans plusieurs tissus incluant le cœur (Smit et al., 1994). Chez la souris et le rat, des niveaux faibles à élevés d'ARNm de *mdr2* ont été obtenus par différentes techniques de biologie moléculaire (Croop et coll., 1989; Teeter et coll., 1990; Brown et coll., 1993; Furuya et coll., 1994).

L'expression des transporteurs MRP fut étudiée de façon intensive depuis le milieu des années 1990. Des niveaux élevés de MRP1 ont été détectés dans le cœur de plusieurs espèces incluant l'humain (Flens et coll., 1996; Wijnholds et coll., 1997). Une seule recherche n'a pas décelé la présence de transporteurs MRP dans le cœur humain (Sugawara et coll., 1997). De l'ARNm de MRP1 a été retrouvé de façon abondante dans le cœur de souris CD1 et de poulets par la technique de *Northern blot*, et chez les rats par la technique de RT-PCR (Stride et coll., 1996; Hagen et coll., 2000; Rosati et coll., 2003). De plus, Ghosh et collègues (2004) ont observé l'expression du gène *mrp1* dans des échantillons de cœurs de rats Wistar par PCR. Récemment, la présence d'ARNm de MRP1, MRP2 et MRP3 à des niveaux intermédiaires, très faibles et faibles, respectivement, a été démontrée dans le cœur humain (Nishimura et coll., 2004).

La présence d'un autre transporteur ABC, MRP5, a été démontrée dans le cœur humain par immunohistochimie. L'ARNm de MRP5 a été détecté par RT-PCR dans 21 échantillons d'oreillettes et 15 échantillons de ventricules gauches humains, avec des niveaux moins élevés d'ARNm pour les oreillettes comparativement aux ventricules (Dazert et coll., 2003). MRP5 s'est révélé être présent dans trois différents types cellulaires cardiaques: dans les cellules musculaires lisses vasculaires, dans les myocytes et dans les cellules endothéliales vasculaires (Dazert et



coll., 2003). Kao et collègues (2002) ont rapporté qu'un autre membre de la sous-famille MRP, soit *mrp7*, était présent dans le cœur de souris.

Muramatsu et collègues (2004) ont étudié par RT-PCR, l'expression de ARNm de *mdr1a* et *mrp1* à *mrp7* dans plusieurs tissus de souris normales et mutées *mdr1a/1b* (-/-) et *mrp* (-/-) adultes et en sevrage. Une expression élevée de *mdr1a* et *mrp1* a été observée pour le cœur et les poumons des souris normales adultes et en sevrage. De plus, *mrp3*, *mrp4* et *mrp5* ont montré des niveaux relativement élevés d'expression dans le cœur des souris normales et mutées. Pour la majorité des transporteurs, les niveaux d'expression se sont révélés être plus importants pour les souris adultes que pour les souris en sevrage.

Il est bien établi que le transporteur ABCG2 (aussi appelé BCRP) joue également un rôle important dans le transport de xénobiotiques. Une recherche récente a décelé l'expression de ABCG2 dans le cœur en développement et le cœur adulte de souris (Martin et coll., 2004). De plus, la présence du transporteur ABCG2 dans les cellules endothéliales de cœurs humains a également été démontrée récemment (Meissner et coll., 2006).

Une expression importante d'un transporteur de la sous-famille ABCD, ABCD2, et de quelques transporteurs de la sous-famille ABCA ont été retrouvés dans le cœur humain. Les gènes codant pour ABCA1, ABCA6, ABCA9 et ABCA10 se sont révélés être exprimés de façon omniprésente avec les niveaux d'ARNm les plus élevés dans quelques tissus incluant le cœur (Kaminski et coll., 2001; Piehler et coll., 2002; Wenzel et coll., 2003; Nishimura et coll., 2004). L'expression du transporteur ABCA5 a également été démontrée dans les cardiomyocytes (Kubo et coll., 2005) et l'utilisation de souris mutées *abca5* (-/-) a révélé un rôle physiologique important pour ce transporteur au niveau cardiaque. Bien que l'ARNm pour ABCA8 s'est révélée être distribué dans plusieurs organes, c'est dans quelques organes incluant le cœur que les niveaux les plus élevés étaient observés (Tsuruoka et coll., 2002). La protéine ABCA8 est la seule jusqu'à maintenant provenant de la sous-famille ABCA qui a montré une activité dans le transport de xénobiotiques. De plus, la présence d'ARNm de ABCD2 (ALDR) dans une variété de tissus humains s'est révélée être prédominante dans le cœur et le cerveau (Holzinger et coll., 1997). Des recherches additionnelles sont requises pour élucider le rôle de ABCD2 et des transporteurs de la sous-famille ABCA.

Rosati et collègues (2003) ont étudié la modulation physiologique de *mdr1a*, *mdr1b*, *mrp1* et *mrp2* dans quelques tissus incluant le cœur chez le rat au cours de

l'ontogenèse. Dans cette recherche, pour laquelle les cœurs ont été collectés à différents stades de développement, des niveaux de transcrits correspondant à *mdr1a* et *mdr1b* ont été détectés par RT-PCR. Ceux-ci ont augmenté au cours de l'ontogenèse pour obtenir les plus hauts niveaux à 30 et/ou 60 jours d'âge. Ces résultats suggèrent que les transporteurs ABC jouent un rôle physiologique important dans la protection du cœur contre les xénobiotiques et toxines lorsque par exemple le rat devient indépendant de l'allaitement (Rosati et coll., 2003). Par ailleurs, aucune variation avec l'âge n'a été observée pour *mrp1*, et la présence de *mrp2* n'a pas été décelée dans ces cœurs (Rosati et coll., 2003).

Des résultats contradictoires ont été obtenus et décrits ci-dessus relativement à la présence de transporteurs ABC dans le cœur (Table 3). Cela peut être attribué en partie à l'utilisation de différentes techniques. Par exemple, pour la technique d'immunohistochimie, il est recommandé pour l'identification de la P-gp que l'anticorps C-219 soit utilisé avec précaution dû à sa réactivité croisée avec d'autres protéines. Pour cette raison, plus d'un anticorps doit être utilisé pour estimer l'expression tissulaire de la P-gp et de d'autres transporteurs (Pavelic et coll., 1993; Jetté et coll., 1995). Les résultats contradictoires sur les niveaux d'expression peuvent être reliés à un manque de corrélation entre l'expression protéique et

d'ARNm mais également à l'expression protéique dans des cellules cardiaques spécifiques (i.e. myocytes, cellules endothéliales ou cellules musculaires lisses).

Tableau 3: Présence de transporteurs ABC dans le coeur détectée par différentes techniques de biologie moléculaire. (adapté de Couture et coll., 2006)

Transporteur ABC	Espèce	Technique	Niveau d'expression <sup>a</sup>	Référence
ABCB1 (MDR1 ou P-gp)	Humain	hybridation <i>slot blot</i>	faible	Fojo et coll., 1987
	Humain	immunohistochimie	très faible	van der Valk et coll., 1990
	foetus humain	immunohistochimie et protection à la RNase	peu probable ou très faible	van Kalken et coll., 1992
	Humain	immunohistochimie	faible	Pavelic et coll., 1993
	Humain	immunohistochimie	intermédiaire	Sugawara et coll., 1997
	Humain	RT-PCR et immunohistochimie	présent <sup>b</sup>	Meissner et coll., 2002
	Humain	RT-PCR et immunohistochimie	présent <sup>b</sup>	Meissner et coll., 2004
ABCB1 (MDR1 ou P-gp)	hamster chinois	protection à la RNase	très faible	Baas et Borst, 1988
	souris C57Bl/6J	hybridation/ Northern blot	intermédiaire	Croop et coll., 1989
	souris BALB/c	protection à la RNase	faible	Teeter et coll., 1990
	rat Wistar nouveau-né et adulte	RT-PCR	faible/intermédiaire	Cayre et coll., 1996
	myocyte ventriculaire en culture de rat nouveau-né	RT-PCR	élevé	Cayre et coll., 1996
	rat Sprague-Dawley	Western blot et immunodétection	intermédiaire	Beaulieu et coll., 1997
	rat Wistar	immunohistochimie	présent <sup>b</sup>	Estevez et coll., 2000
	rat Wistar souris FVB	RT-PCR	présent <sup>b</sup> élevé <sup>e</sup>	Rosati et coll., 2003 Muramatsu et coll., 2004
ABCB4 (MDR3)	Humain	protection à la RNase	faible	Smit et coll., 1994
	Humain	immunohistochimie	non détecté probablement due au trop faible niveau	Smit et coll., 1994
ABCB4 (MDR2)	souris C57Bl/6J	hybridation/ Northern blot	intermédiaire	Croop et coll., 1989
	souris BALB/c	protection à la RNase	intermédiaire	Teeter et coll., 1990
	rat Fisher	protection à la RNase	élevé	Brown et coll., 1993
	rat Sprague-Dawley	Northern blot et PCR	faible	Furuya et coll., 1994

(Tableau 3 suite)

ABCC1 (MRP1)	Humain	immunohistochimie	élevée	<sup>c</sup> Flens et coll., 1996
	souris CD1	Northern blot	élevée	<sup>c</sup> Stride et coll., 1996
	Humain	immunohistochimie	non détecté	<sup>c</sup> Sugawara et coll., 1997
	souris FVB	Western blot	présent <sup>b</sup>	Wijnholds et coll., 1997
	Poulet	Northern blot	élevé	Hagen et coll., 2000
	rat Wistar	RT-PCR	présent <sup>b</sup>	Rosati et coll., 2003
	rat Wistar	PCR	présent <sup>b</sup>	Ghosh et coll., 2004
	souris FVB	RT-PCR	élevé <sup>e</sup>	Muramatsu et coll., 2004
	humain	RT-PCR	intermédiaire <sup>e</sup>	Nishimura et coll., 2004
ABCC2 (MRP2 cMOAT)	ou			
	rat Wistar	RT-PCR	non détecté	Rosati et coll., 2003
	souris FVB	RT-PCR	faible <sup>e</sup>	Muramatsu et coll., 2004
	humain	RT-PCR	très faible <sup>e</sup>	Nishimura et coll., 2004
ABCC3 (MRP3)	souris FVB	RT-PCR	intermédiaire <sup>e</sup>	Muramatsu et coll., 2004
	humain	RT-PCR	faible <sup>e</sup>	Nishimura et coll., 2004
ABCC4 (MRP4)	souris FVB	RT-PCR	intermédiaire <sup>e</sup>	Muramatsu et coll., 2004
ABCC5 (MRP5)	humain	RT-PCR et immunohistochimie	présent <sup>b</sup>	Dazert et coll., 2003
	souris FVB	RT-PCR	intermédiaire <sup>e</sup>	Muramatsu et coll., 2004
ABCC6 (MRP6)	souris FVB	RT-PCR	très faible <sup>e</sup>	Muramatsu et coll., 2004
ABCC10 (MRP7)	Souris	RT-PCR et Northern blot	présent <sup>b</sup>	Kao et coll., 2002
	souris FVB	RT-PCR	intermédiaire <sup>e</sup>	Muramatsu et coll., 2004
ABCG2 (BCRP)	souris C57Bl/6	RT-PCR et immunohistochimie	présent <sup>b</sup>	Martin et coll., 2004
	humain	RT-PCR et immunohistochimie	présent <sup>b</sup>	Meissner et coll., 2006

(Tableau 3 suite)

ABCA1 <sup>d</sup>	humain	RT-PCR	élevée <sup>e</sup>	Nishimura et coll., 2004
ABCA5 <sup>d</sup>	Souris	immunohistochimie	présent <sup>b</sup>	Kubo et coll., 2005
ABCA6 <sup>d</sup>	humain	RT-PCR et analyse <i>dot blot</i>	élevée	Kaminski et coll., 2001
ABCA9 <sup>d</sup>	humain	RT-PCR et analyse <i>dot blot</i>	élevée	Piehler et coll., 2002
ABCA8	humain	Northern blot	élevée	Tsuruoka et coll., 2002
ABCA10 <sup>d</sup>	humain	RT-PCR et analyse <i>dot blot</i>	élevée	Wenzel et coll., 2003
ABCD2 (ALDR) <sup>d</sup>	humain	Northern blot	élevée	Holzinger et coll., 1997

<sup>a</sup> Relatif étant donné qu'évalué par différents auteurs.

<sup>b</sup> Présent signifie que le niveau ne peut être comparé avec d'autres tissus puisque seul le coeur a été étudié ou très peu de tissus.

<sup>c</sup> Non spécifié dans l'article de référence mais correspond probablement à MRP1.

<sup>d</sup> Aucune évidence dans la littérature du rôle de ce transporteur ABC dans la disposition de médicaments.

<sup>e</sup> Évalué (par l'auteur de cette thèse) basé sur la comparaison avec d'autres tissus analysés.

Tableau 4: Classification des isoformes de la P-glycoprotéine. (adapté de Couture et coll., 2006)

Espèce	I	II	III <sup>a</sup>
Humain	MDR1 <sup>b</sup>		MDR3 <sup>c</sup> (MDR2) <sup>h</sup>
Souris	<i>mdr3<sup>d</sup></i> ( <i>mdr1a</i> ) <sup>i</sup>	<i>mdr1<sup>e</sup></i> ( <i>mdr1b</i> ) <sup>i</sup>	<i>mdr2<sup>f</sup></i>
Hamster	P-gp1 <sup>g</sup>	P-gp2 <sup>g</sup>	P-gp3 <sup>g</sup> <sup>''</sup>

<sup>a</sup> Plutôt impliqué dans le transport de phospholipides (Smit et coll., 1993).

La nomenclature des gènes chez l'humain, la souris et le hamster sont selon <sup>b</sup> Chen et coll., 1986; <sup>c</sup> Van der Blik et coll., 1987; <sup>d</sup> Devault et Gros, 1990; <sup>e</sup> Gros et coll., 1986; <sup>f</sup> Gros et coll., 1988; et <sup>g</sup> Ng et coll., 1989. Des désignations alternatives sont données entre parenthèses; <sup>h</sup> Roninson et coll., 1986 et <sup>i</sup> Hsu et coll., 1989. Tableau adapté de Smit et coll., 1994.

### 1.3.2 Utilisation de souris mutées

La production de souris génétiquement déficientes pour des gènes codant pour les transporteurs ABC est un outil très utile dans l'investigation du rôle des transporteurs ABC dans le métabolisme de plusieurs médicaments. L'utilisation de ces souris mutées est particulièrement importante pour évaluer l'innocuité de médicaments anticancéreux lorsque ceux-ci devront être co-administrés avec des agents renversant la résistance aux médicaments par l'inhibition de la P-gp ou pour prédire les interactions médicamenteuses. Par exemple, la comparaison des toxicités observées suite à l'administration d'un médicament à des souris normales et des souris simple-mutées *mdr1a* (-/-) ou double-mutées *mdr1a/1b* (-/-) pourrait prédire les toxicités qui seraient observées suite à la co-administration de ce médicament avec un



substrat de la P-gp. Le Tableau 5 présente des évidences provenant de la littérature décrivant des concentrations cardiaques de médicaments plus élevées pour des souris déficientes pour un gène codant pour un transporteur ABC comparativement à des souris normales. Ces résultats suggèrent indirectement la présence et un certain rôle des transporteurs ABC, telle que la P-gp, au niveau du cœur.

Schinkel et collègues (1994) ont démontré l'importance de la P-gp dans le métabolisme de la vinblastine pour plusieurs tissus incluant le cœur en utilisant des souris *mdr1a* (-/-). L'absence du gène *mdr1a* a engendré un effet évident sur les concentrations de vinblastine. L'effet le plus évident fut observé pour le cœur pour lequel les concentrations de vinblastine se sont révélées de 7 à 14 fois plus élevées pour les souris *mdr1a* (-/-) entre 8 et 24 h après l'injection de 6 mg/kg. Ce résultat indiquait que l'absence de l'isoforme *mdr1a* de la P-gp avait un effet important sur la pharmacocinétique et distribution tissulaire de la vinblastine (Schinkel et coll., 1994; van Asperen et coll., 1996). Une autre étude a démontré que suite à une infusion de 96 h, les niveaux de vinblastine dans le cœur des souris *mdr1a* (-/-) étaient de 1.7 fois plus élevés comparativement aux souris normales, suggérant encore une fois un rôle probable de la P-gp dans la protection du cœur (van Asperen et coll., 1999).

D'autres études ont été effectuées pour évaluer l'affinité pour les transporteurs ABC de médicaments autres que pour le traitement du cancer. Des niveaux environ 2 fois plus élevés de  $^3\text{H}$ -lopéramide (Schinkel et coll., 1996) et d'anticonvulsants énaminones (Cox et coll., 2002) ont été observés dans quelques tissus dont le cœur suite à leur administration à des souris *mdr1a* (-/-) ou *mdr1a/1b* (-/-).

Le rôle du transporteur ABC *mrp1* sur la pharmacocinétique de l'étoposide, un médicament anticancéreux, a été étudié en utilisant des souris double-mutées *mdr1a/1b* (-/-) et des souris triple-mutées *mdr1a/1b* (-/-)/*mrp1* (-/-). Pour les souris triple-mutées déficientes pour *mrp1*, une augmentation de l'accumulation d'étoposide a été observée dans quelques tissus incluant le cœur comparativement aux souris double-mutées. Ce résultat suggérait que le transporteur *mrp1* contribue à la protection des tissus cardiaques contre des médicaments tel que l'étoposide (Wijnholds et coll., 2000). Le transporteur *mrp1* a également été étudié en utilisant le grépafloracin, un antibiotique fluoroquinolone. Ce médicament a été administré de façon intraveineuse à des souris *mrp1* (-/-), *mdr1a* (-/-), *mdr1a/1b* (-/-) et à des souris normales. Les ratios tissu/plasma pour les concentrations se sont révélés significativement plus élevés pour plusieurs tissus incluant le cœur pour les souris *mrp1* (-/-) comparativement aux souris normales, *mdr1a* (-/-) et *mdr1a/1b* (-/-). Cette observation fut surprenante considérant que le grépafloracin est reconnu comme un

substrat de la P-gp (Tamai et coll., 2000; Naruhashi et coll., 2001; Lowes et Simmons, 2002). Ainsi, ces résultats suggèrent que *mrp1* ait un rôle considérable dans la distribution tissulaire et cardiaque de ses substrats (Sasabe et coll., 2004).

Une autre étude confirmait l'importance de la P-gp et/ou *mrp1* dans la distribution tissulaire de vincristine en utilisant des souris triple-mutées *mdr1a/1b* (-/-)/*mrp1* (-/-) et normales. En effet, les souris mutées ont révélé des ratios tissu/plasma pour les concentrations, plus élevés comparativement aux souris normales pour plusieurs tissus mais particulièrement pour les structures cardio-pulmonaires (Muramatsu et coll., 2004).

Tableau 5: Évidences *in-vivo* de la présence de transporteurs ABC dans le cœur par l'utilisation de souris mutées. (adapté de Couture et coll., 2006)

Transporteurs ABC étudiés	Type de souris	Référence
<b>mdr1a/1b (P-gp ou ABCB1)</b>		
Niveaux de vinblastine ont été 3 fois plus élevés dans le cœur des souris <i>mdr1a</i> (-/-) qui ont présenté une plus grande élimination vs souris normales.	<i>mdr1a</i> (-/-) et normale	Schinkel et coll., 1994
Chez les souris <i>mdr1a</i> (-/-), le cœur a présenté des niveaux de vinblastine plus élevés vs souris normales.	<i>mdr1a</i> (-/-) et normale	van Asperen et coll., 1996
Niveaux tissulaires de radioactivité incluant le cœur de souris <i>mdr1a</i> (-/-) ont été 2 fois plus élevés suite à l'administration de <sup>3</sup> H-lopéramide vs souris normales.	<i>mdr1a</i> (-/-) et normale	Schinkel et coll., 1996
Une augmentation de 1.7 fois dans l'accumulation de vinblastine a été observée dans le cœur de souris <i>mdr1a</i> (-/-) vs souris normales.	<i>mdr1a</i> (-/-) et normale	van Asperen et coll., 1999
Le cœur a présenté des niveaux au moins 2 fois plus élevés d'anticonvulsants énaminones pour les souris <i>mdr1a/1b</i> (-/-) vs souris normales.	<i>mdr1a/1b</i> (-/-) et normale	Cox et coll., 2002
<b>mrp1 (ABCC1)</b>		
Une augmentation de toxicité pour les souris TKO <sup>b</sup> qui ont présenté des niveaux plus élevés d'étoposide dans des tissus dont le cœur vs souris DKO <sup>a</sup> .	DKO <sup>a</sup> , TKO <sup>b</sup> et normale	Wijnholds et coll., 2000
Des ratios tissu/plasma plus élevés ont été observés dans le cœur de souris <i>mrp1</i> (-/-) suite à l'administration of grépaflouxacine vs souris normales.	<i>mdr1a/1b</i> (-/-), <i>mdr1a</i> (-/-), <i>mrp1</i> (-/-) et normale	Sasabe et coll., 2004
<b>mdr1a/1b (P-gp or ABCB1) et mrp1 (ABCC1)</b>		
Les ratios tissu/plasma de vincristine ont démontré des valeurs plus élevées dans le cœur des souris en sevrage et adultes TKO <sup>b</sup> vs souris normale.	TKO <sup>b</sup> et normale	Muramatsu et coll., 2004

<sup>a</sup>DKO signifie souris double-mutées; pour les gènes *mdr1a* et *mdr1b* (ou *mdr1a/1b* (-/-))

<sup>b</sup>TKO signifie souris triple-mutées; pour les gènes *mrp1*, *mdr1a* et *mdr1b* (ou *mrp1* (-/-)/*mdr1a/1b* (-/-))

## 1.4 Cardiotoxicités et transporteurs ABC

### 1.4.1 Évidences de cardiotoxicités et rôles possibles des transporteurs ABC

Un grand nombre de médicaments ont été identifiés comme des substrats importants de la P-gp et capables de rétablir la sensibilité des cellules tumorales résistantes. Ceux-ci sont nommés agents renversant la résistance multidrogue (*multidrug resistance-reversing agents*). L'inhibition des transporteurs ABC *in vivo* par ces agents change inévitablement la distribution et la pharmacocinétique des médicaments anticancéreux dû à l'inhibition de la fonction de protection normale que procure la P-gp dans les tissus normaux. Comme résultats, les concentrations tissulaires et plasmatiques de médicaments augmentent et peuvent résulter en toxicités.

Plusieurs cas de cardiotoxicités reliées à l'augmentation des concentrations cardiaques de médicaments suite à la co-administration de médicaments anticancéreux et d'agents renversant la résistance multidrogue ont été rapportés. Le Tableau 6 résume ces évidences. Par exemple, il a été démontré que des médicaments bloqueurs des canaux calciques tels que la nifédipine, la flunarizine, le vérapamil ainsi que d'autres agents renversant la résistance multidrogue augmentaient

les concentrations intracellulaires d'anthracyclines telles que la doxorubicine, la daunorubicine et l'idarubicine dans les cardiomyocytes (Santostasi et coll., 1991; Cayre et coll., 1996; Kang et Weiss, 2001) engendrant ainsi des cardiotoxicités. Une autre étude a démontré que la co-administration de vérapamil et doxorubicine chez les souris augmentait la concentration maximale de doxorubicine dans le cœur de 40%, augmentait l'incidence et la sévérité de changements dégénératifs dans les tissus cardiaques et diminuait le taux de survie comparativement à l'administration de doxorubicine seule (Sridhar et coll., 1992). D'autres études chez les rongeurs ont démontré que la cyclosporine A ou son analogue PSC 833 pouvait augmenter les concentrations de doxorubicine (Colombo et coll., 1994; Bellamy et coll., 1995; Gonzalez et coll., 1995; Colombo et coll., 1996a) et d'étoposide (Cárcel-Trullols et coll., 2004) dans plusieurs tissus incluant le cœur. Cette augmentation pouvait être corrélée avec une plus grande incidence et une plus grande sévérité des dommages au myocarde lorsque la cyclosporine A et doxorubicine étaient co-administrés (Bellamy et coll., 1995). Le mécanisme responsable de cette augmentation de cardiotoxicités est probablement relié à une accumulation de médicaments au niveau du cœur causé par l'inhibition de la P-gp ou autres transporteurs ABC par des médicaments tels que le vérapamil, cyclosporine A ou PSC 833. Ces résultats suggèrent que la prudence est recommandée lorsqu'une combinaison de ces médicaments doit être prescrite au niveau clinique.

Il a été démontré que la distribution cardiaque d'épidoxorubicine, un médicament de la famille des anthracyclines, était significativement plus élevée suite à un pré-traitement de 30 min de paclitaxel ou crémosolone chez des souris CDF1. En effet, les niveaux d'épidoxorubicine au cœur se sont révélés beaucoup plus élevés chez les souris pré-traitées avec du paclitaxel ou crémosolone comparativement aux souris ayant reçu un traitement d'épidoxorubicine seule. Ces résultats suggèrent que les cardiotoxicités induites par les médicaments de la famille des anthracyclines puissent être accrues lorsque ceux-ci sont co-administrés avec du paclitaxel (Colombo et coll., 1996b). En accord avec ces derniers résultats, une réduction de la contractilité cardiaque a été obtenue lors de la co-administration de doxorubicine et paclitaxel chez l'humain (Gianni et coll., 1995). Les transporteurs ABC semblent par conséquent influencer la distribution cardiaque d'épidoxorubicine et certaines cardiotoxicités.

De plus, une équipe de chercheurs a généré des souris transgéniques qui surexprimaient l'ADNc de MDR1 spécifiquement au niveau du myocarde. L'administration de doxorubicine, qui produit une toxicité cardiaque irréversible, a causé des changements dégénératifs au niveau du cœur des souris normales qui se sont révélés absents chez les souris transgéniques (Dell'Acqua et coll., 1999). Ces

résultats intéressants ont fourni une autre forte évidence du rôle important de la P-gp dans le processus de détoxication du cœur.



Tableau 6: Interactions médicamenteuses et augmentation de la distribution cardiaque. (adapté de Couture et coll., 2006)

Médicament et effet	Type d'analyse	Espèce	Référence
Une augmentation des niveaux d'anthracyclines dans les cardiomyocytes et de cardiotoxicités suite à une co-administration avec des bloqueurs des canaux calciques renversant la résistance multidrogue.	<i>In-Vitro</i>	rat Sprague-Dawley	Santostasi et coll., 1991
Un taux de survie à la baisse, une plus grande incidence et sévérité de changements dégénératifs dans les tissus cardiaques et une plus grande concentration maximale de doxorubicine dans le cœur des souris traitées au vérapamil et doxorubicine vs les souris traitées au doxorubicine seul.	<i>In-Vivo</i>	souris (BALB/c x DBA/2)F1	Sridhar et coll., 1992
La cyclosporine A a augmenté les concentrations cardiaques de doxorubicine.	<i>In-Vivo</i>	rat CrI/CD BR et souris CD <sub>2</sub> F <sub>1</sub> /CrI BR	Colombo et coll., 1994
Une augmentation des niveaux cardiaques de doxorubicine et une plus grande incidence et sévérité des dommages au myocarde ont été observées suite à la co-administration de cyclosporine A.	<i>In-Vivo</i>	souris SCID	Bellamy et coll., 1995
Des valeurs d'AUC pour doxorubicine plus élevées dans le cœur lorsque co-administré à PSC 833 (cyclosporine A analogue).	<i>In-Vivo</i>	souris CDF1	Gonzalez et coll., 1995
Une augmentation intracellulaire significative de <sup>3</sup> H-daunorubicin lorsque cellules du myocarde incubées avec daunorubicine et agents renversant la résistance multidrogue (vérapamil, PSC 833 ou S9788).	<i>In-Vitro</i>	myocyte de ventricule de rat Wistar nouveau-né	Cayre et coll., 1996
Des concentrations de doxorubicine augmentées dans le cœur de souris pré-traitées au PSC 833.	<i>In-Vivo</i>	souris BDF1	Colombo et coll., 1996a
Une augmentation de la cardiotoxicité du doxorubicine en présence d'amiodarone.	<i>In-Vitro</i>	rat Wistar néonatal	Estevez et coll., 2000
Une distribution d'idarubicine (anticancéreux) au myocarde augmentée par vérapamil.	<i>Ex-Vivo</i>	rat Sprague-Dawley	Kang et Weiss, 2001
Des concentrations d'étoposide dans le cœur augmentées suite à la co-administration de cyclosporine A.	<i>In-Vivo</i>	rat Wistar	Cárcel-Trullols et coll., 2004
Un pré-traitement au paclitaxel a induit une augmentation significative des niveaux d'épidoxorubicine dans le cœur.	<i>In-Vivo</i>	souris CDF1	Colombo et coll., 1996b
Une réduction de la contractilité du cœur obtenue lors de la co-administration de doxorubicine et paclitaxel.	<i>In-Vivo</i>	humain	Gianni et coll., 1995

## **1.4.2 Les transporteurs ABC et le prolongement de l'intervalle QT**

### **1.4.2.1 Le prolongement de l'intervalle QT**

#### **1.4.2.1.1 Signification physiologique de l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme et sa correspondance cellulaire et ionique**

##### **1.4.2.1.1.1 L'électrocardiogramme**

Dans un cœur normal, un électrocardiogramme typique comporte 5 ondes (Figure 2). L'onde P qui est de faible amplitude représente la dépolarisation des oreillettes engendrée par le nœud sinusal. Le complexe QRS, formé des ondes Q, R et S, représente la dépolarisation des ventricules. Finalement, l'onde T représente la repolarisation ventriculaire. Étant donné que la repolarisation des oreillettes survient en même temps que la dépolarisation des ventricules, son onde est masquée par le complexe QRS.

L'intervalle PR (PQ) représente le temps entre le début de la dépolarisation des oreillettes et le début de la dépolarisation ventriculaire. Elle correspond à une mesure du temps de conduction des oreillettes aux ventricules. L'intervalle QT correspond à la période entre le début de la dépolarisation des ventricules et leur

repolarisation donc reflète la durée du potentiel d'action ventriculaire. Cet intervalle correspond donc au temps de systole ventriculaire, qui va du début de l'excitation des ventricules jusqu'à la fin de leur relaxation. On mesure l'intervalle QT (QT) du début du complexe QRS à la fin de l'onde T. Étant donné que l'intervalle QT est fonction de la fréquence cardiaque, il est préférable d'utiliser le QT corrigé (QTc) et se calcule entre autres par la formule de Bazett ou Fridericia.

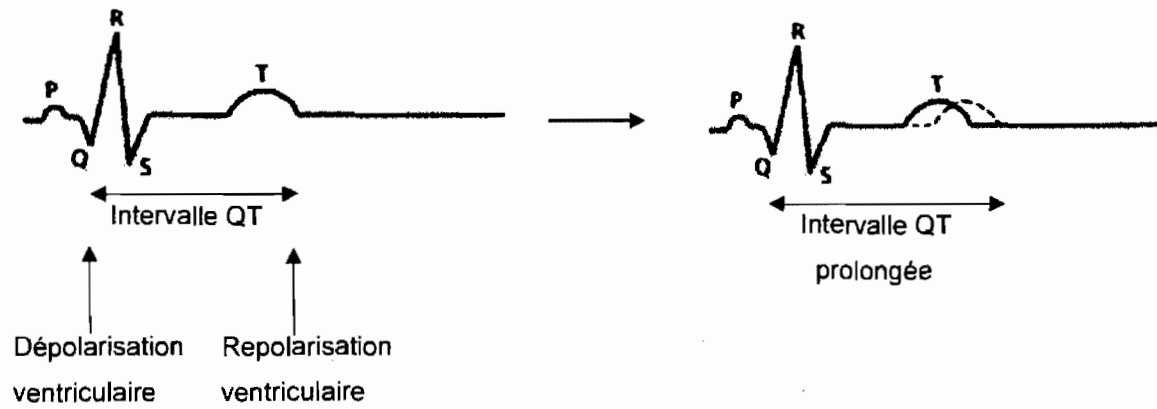


Figure 2: Représentation de la prolongation de l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme.

#### 1.4.2.1.1.2 Le potentiel d'action

Le potentiel d'action d'un ventricule humain consiste en 5 phases (Figure 3 partie de gauche, Figure 4):

- La phase 0 : l'ascension du potentiel d'action est une entrée rapide et importante de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) par les canaux sodiques.
- La phase 1 : la terminaison de l'ascension du potentiel d'action et la phase de repolarisation initiale résultent de l'inactivation du courant entrant sodique et de l'activation du courant sortant transitoire de  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{to}}$ ) par les canaux potassiques.
- La phase 2 : le plateau du potentiel d'action reflète un équilibre entre le courant entrant de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) par les canaux calciques de type L et les courants sortant de  $\text{K}^+$  repolarisants.
- La phase 3 : la pente descendante du potentiel d'action est la phase de repolarisation qui résulte de courants sortants de  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{K}}$ :  $I_{\text{Kr}}$  et  $I_{\text{Ks}}$ ) par les canaux potassiques rectifiant retardés.
- La phase 4 : le potentiel de repos est maintenu par le courant entrant potassique rectifiant ( $I_{\text{K1}}$ ).

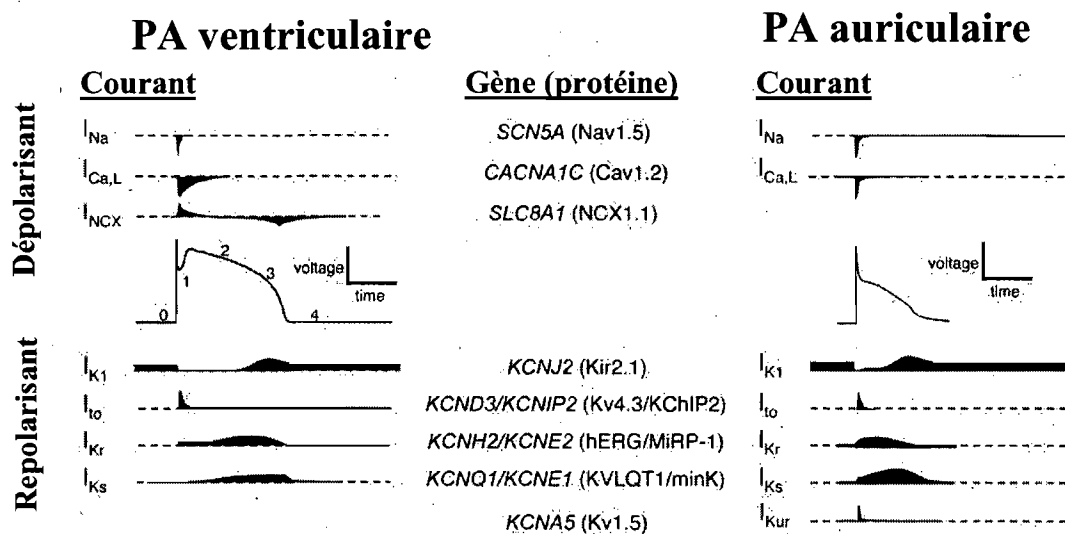


Figure 3: Courants ioniques dépolarisants et repolarisants impliqués dans les potentiels d'action du ventricule et de l'oreillette dans le coeur humain. Les gènes codant pour les protéines responsables de ces courants sont indiqués. (adapté de Shah et coll., 2005)

Plusieurs courants ioniques dépolarisants ou repolarisants contribuent à la forme du potentiel d'action. Voici les principaux courants responsables de la repolarisation et par conséquent influents sur la durée de l'intervalle QT (la Figure 3 schématise la contribution de chaque courant pour chacune des phases du potentiel d'action) :

Courant sortant transitoire potassique ( $I_{to}$ ) :

$I_{to}$  s'active et se désactive rapidement. De concert avec l'inactivation du courant sodique entrant,  $I_{to}$  contribue à la phase de repolarisation initiale (phase 1). Il y a deux types de courants  $I_{to}$ ,  $I_{to1}$  qui s'active et s'inactive rapidement et qui est sélectif pour le  $K^+$  et  $I_{to2}$  qui est moins bien caractérisé mais dépend des concentrations intracellulaires de calcium (Marban 2002).

Courant entrant calcique par les canaux calciques de type L ( $I_{Ca,L}$ ) :

Le  $I_{Ca,L}$  est activé initialement durant l'ascension du potentiel d'action contribuant au couplage excitation-contraction. Ce courant calcique est maintenu contribuant au plateau de la phase 2 du potentiel d'action.

Courant sortant potassique rectifiant retardé ( $I_K$ ) :

$I_K$  est composé de deux courants:  $I_{Kr}$  qui est la composante rapide et  $I_{Ks}$  qui est la composante lente.  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$  qui présentent un profil pharmacologique et une cinétique différents, sont encodés par deux gènes distincts.  $I_K$ , particulièrement  $I_{Kr}$ , contribue à la repolarisation de la phase 2 et la phase 3 du potentiel d'action. Ce courant repolarisant  $I_K$  est le plus important dans la détermination de la durée de l'intervalle QT.

Courant entrant potassique rectifiant ( $I_{K1}$ ) :

$I_{K1}$  est impliqué dans la phase rapide de repolarisation (phase 3) et de plus est important au maintien de la stabilité du potentiel de repos.

Courant rectifiant retardé ultra-rapide ( $I_{Kur}$ ) :

$I_{Kur}$  n'a pas d'influence sur la prolongation du potentiel d'action du ventricule car il est présent dans les myocytes des oreillettes et absent chez les cellules des ventricules (Dobrev et Ravens, 2003). L'existence de  $I_{Kur}$  et  $I_{to1}$  dans les myocytes humains des oreillettes contribue à la morphologie différente du potentiel d'action auriculaire vs ventriculaire. En effet, le potentiel d'action auriculaire présente une repolarisation rapide à la phase 1 plus prononcée et un plateau moins important comparativement au potentiel d'action du ventricule (Figure 3, partie de droite).

L'électrocardiogramme est l'intégration des potentiels d'action de différentes régions du cœur et est illustré à la Figure 4.



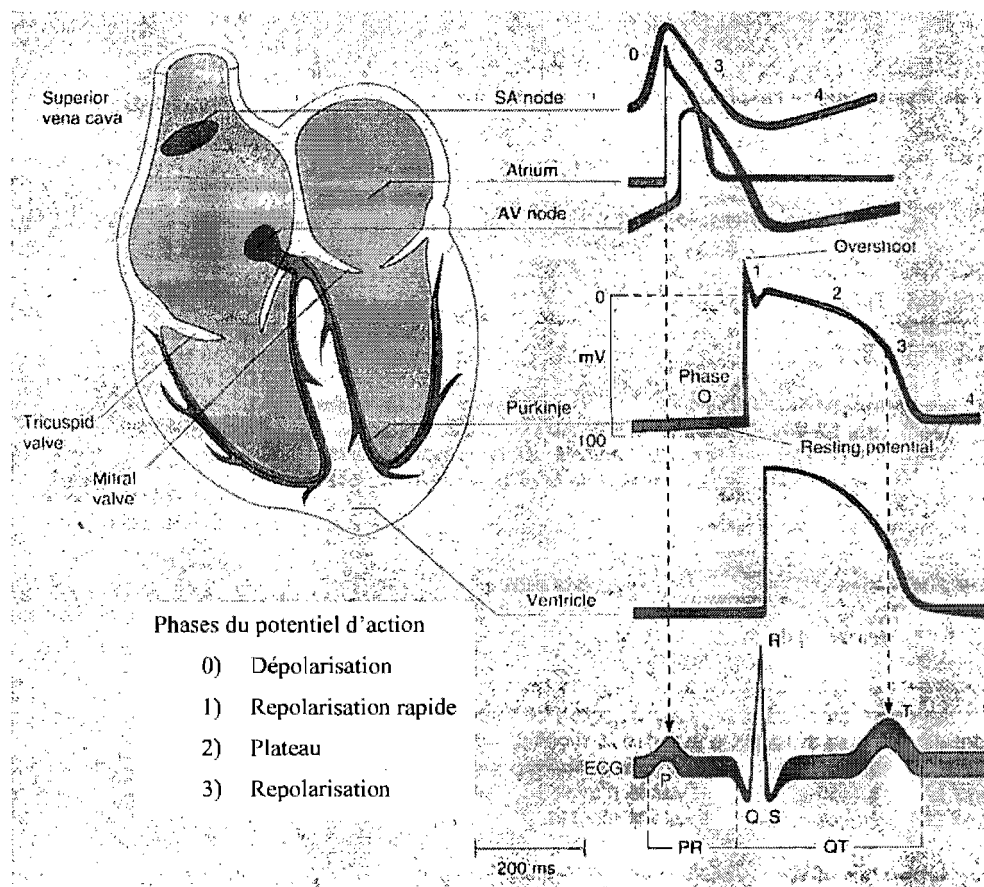


Figure 4: Représentation de l'activité électrique de différentes régions du cœur et d'un électrocardiogramme qui est la résultante des ondes de dépolarisation et de repolarisation du cœur. (adapté de Katzung, 1995)

### 1.4.2.1.2 Facteurs ioniques prédisposant à la prolongation de l'intervalle QT

Le prolongement de l'intervalle QT est schématisé à la Figure 2. Une prolongation excessive de la repolarisation cardiaque (intervalle QT) augmente les risques de post-dépolarisations précoces (*early afterdepolarization*) (Figure 5) qui peuvent déclencher un épisode de torsades de pointes, une tachycardie ventriculaire polymorphe. La torsade de pointe est caractérisée par la succession de complexe QRS larges dont l'amplitude varie progressivement dans le temps, paraissant ainsi s'enrouler autour de la ligne isoélectrique (Figure 6). Dépendamment de facteurs de sensibilité propres au patient, les torsades de pointes peuvent être asymptomatiques ou à l'autre extrême provoquer une fibrillation ventriculaire et mener à la mort subite.

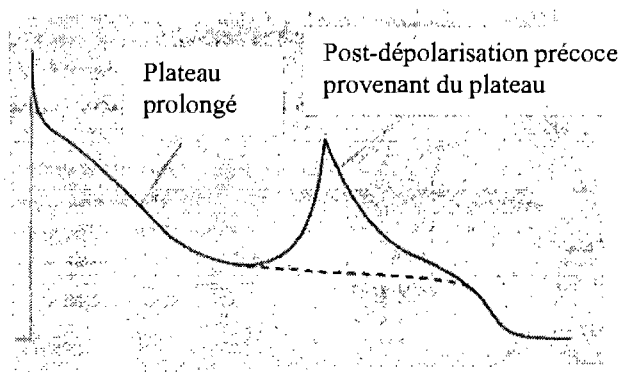


Figure 5: Représentation d'une post-dépolarisation précoce.

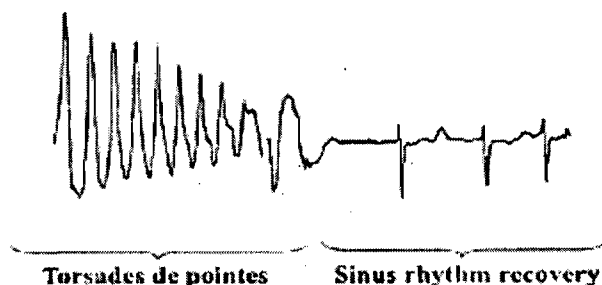


Figure 6: Représentation schématique d'une torsade de pointe.

La repolarisation cardiaque représente un équilibre fragile entre les courants ioniques entrants et sortants. Une faible altération d'un seul courant, et ce particulièrement durant la phase de plateau (phase 2) ou la phase de repolarisation (phase 3), peut amener un déséquilibre ionique pouvant engendrer une modification du potentiel d'action et un prolongement de l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme. Sommairement, des courants entrants persistants ou des courants sortants réduits peuvent causer le phénotype du Long QT. Voici plus en détails différents mécanismes ioniques connus pouvant contribuer à un prolongement de l'intervalle QT.

#### 1.4.2.1.2.1 Diminution des courants sortants potassiques

Le courant potassique rectifiant retardé ( $I_K$ ) et ses composantes rapide et lente ( $I_{Ks}$  et  $I_{Kr}$ ) est le courant ayant le plus d'influence dans la détermination de la durée du potentiel d'action et par conséquent de l'intervalle QT. Par conséquent, la diminution de ces courants potassiques est impliquée dans l'allongement de l'intervalle QT. En fait, la plupart des cas de prolongement de l'intervalle QT de causes congénitales ou induit par les médicaments sont provoqués par une diminution de ce courant potassique ( $I_K$ ) et de ses deux composantes  $I_{Kr}$  et  $I_{Ks}$ .

On sait que des concentrations potassiques extracellulaires basses engendrent une prolongation de l'intervalle QT. Les mécanismes responsables dans cette situation seraient reliés au fait qu'une basse concentration potassique mènerait à une augmentation de l'inactivation de  $I_{Kr}$  (Yang et coll., 1997). Des recherches ont montré que  $I_{Kr}$ , contrairement à la plupart des autres courants potassiques, augmente lorsque la concentration extracellulaire de potassium augmente (ce qui devrait être l'inverse étant donné la baisse du gradient électrochimique). De plus, une diminution de la concentration extracellulaire de potassium a potentialisé le blocage de  $I_K$  par un médicament (Sanguinetti et coll., 1992), ce qui est en corrélation avec le fait que l'hypokaliémie peut provoquer des torsades de pointes.

De plus, des recherches sur des myocytes ont démontré qu'une diminution de la durée du potentiel d'action pouvait être reliée à une plus grande densité de courants

potassiques sortants et à une plus grande expression des canaux protéiques associés (Wickenden et coll., 1999; Trépanier-Boulay et coll., 2001).

Nous savons que l'apparition d'un Long QT est une résultante de l'interaction des différents courants ioniques. Un fait intéressant est que le vérapamil, un bloqueur calcique, qui est un puissant bloqueur de  $I_{Kr}$  n'est pas associé à un allongement de l'intervalle QT, ce qui serait attribuable à un blocage simultané de courants ioniques entrants (Chouabe et coll., 1998).

#### 1.4.2.1.2.2 Diminution de l'inactivation ou augmentation de l'activation des courants entrants sodiques

Des évidences ont démontré que l'inhibition de l'inactivation des canaux sodiques, causée par des toxines, pouvait causer des post-dépolarisations précoces et conséquemment un prolongement de l'intervalle QT (el-Sherif et coll, 1988). Une mutation dans le gène SCN5 codant pour la protéine du canal sodique résulterait en une déficience dans l'inactivation des canaux sodiques. Étant donné l'importance du courant sodique dans le potentiel d'action, il est clair qu'une diminution de son inactivation peut prolonger l'intervalle QT. L'augmentation des courants sodiques entrants est impliquée dans des cas de prolongement de l'intervalle QT de causes congénitales ( $I_{Na}$  pour LQT3 ; Table 7). Bien que les mécanismes de prolongation de l'intervalle QT pour la majorité des médicaments sont médiés par l'inhibition des

courants potassiques sortants, quelques substances telles l'ibutilide et DPI-201 ont allongé le QT par l'augmentation des courants entrants sodiques (Lee et coll., 1998; Buggisch et coll., 1985).

#### 1.4.2.1.2.3 Diminution de l'inactivation ou augmentation de l'activation des courants entrants calciques

Le déficit d'inactivation des canaux responsables des courants entrants sodiques, comme il vient d'être discuté, ou un déficit des canaux potassiques responsables des courants sortants peuvent prolonger la phase 2 (le plateau du potentiel d'action) suffisamment pour permettre à des courants calciques médiés par les canaux de type L à se réactiver et produire des post-dépolarisations précoces et torsades de pointe (Zeng et Rudy, 1995). Il est également possible qu'un courant entrant sodique généré par l'échangeur  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  ou par les canaux sodiques contribue à l'apparition des post-dépolarisations précoces" qui mèneront à des torsades de pointe. L'augmentation des courants calciques entrants serait impliquée dans des cas de prolongement de l'intervalle QT relié à une maladie neurologique rare.

### 1.4.2.1.3 Autres facteurs prédisposant à une prolongation de l'intervalle QT

La prolongation de l'intervalle QT et la venue d'un épisode de torsades de pointe peut être une conséquence d'un ou de l'interaction de plusieurs facteurs tels que l'administration de médicaments, des mutations génétiques, la bradycardie et le genre.

#### 1.4.2.1.3.1 Administration de médicaments

La prolongation de l'intervalle QT ou de la repolarisation cardiaque induite par les médicaments est présentement un problème majeur pour l'industrie pharmaceutique et les agences de régulation, et d'autant plus important pour la sécurité des patients. Le mécanisme le plus commun d'une prolongation de l'intervalle QT induit par les médicaments est l'inhibition du canal potassique rectifiant retardé responsable du courant  $I_{Kr}$  codée par le gène *human ether-a-go-go-related (hERG)*. Le site de liaison au canal  $I_{Kr}$  situé dans la membrane plasmique semble être localisé au niveau intracellulaire (Zou et coll., 1997; Zhang et coll., 1999). Le cisapride, un agent modulateur de la motilité intestinale, est un exemple d'un médicament ayant la capacité d'induire un prolongement de l'intervalle QT. Une inhibition du courant  $I_{Kr}$  chez des cœurs isolés de cobayes a été démontré avec le cisapride ce qui s'est révélé être en accord avec des cas rapportés chez des patients de

prolongation de la durée de repolarisation cardiaque (Drolet et coll., 1998). Des cas de mort subite relié à la prise de cisapride furent subséquemment rapportés et ce médicament fut retiré du marché.

La Table 7 liste les médicaments qui ont le potentiel de prolonger l'intervalle QT par un blocage de  $I_{Kr}$  et de causer des torsades de pointe. Parmi ceux-ci on note des anti-arythmiques, des antidépresseurs, des anti-émétiques.



Tableau 7: Médicaments bloqueurs de  $I_{Kr}$  ayant le potentiel de causer des torsades de pointes. (adapté de James et coll., 2005)

Médicaments	Classe	Incidence de TdP selon le genre
Amiodarone	Anti-arythmique	Femme > Homme
Bepriidil	Anti-angineux	Femme > Homme
Chloroquine	Anti-malarien	
Chlorpromazine	Anti-psychotique/anti-émétique	Femme > Homme
Cisapride	Stimulant gastrointestinal	Femme > Homme
Clarithromycine	Antibiotique	Femme > Homme
Disopyramide	Anti-arythmique	Femme > Homme
Dofétilide	Anti-arythmique	Femme > Homme
Dompéridone	Anti-nauséeux	
Dropéridol	Anti-nauséeux/sédatif	
Érythromycine	Antibiotique	Femme > Homme
Halopéridol	Anti-psychotique	Femme > Homme
Ibutilide	Anti-arythmique	Femme > Homme
Mésoridazine	Anti-psychotique	
Méthadone	Agoniste opiacé	Femme > Homme
Pimozide	Anti-psychotique	Femme > Homme
Procainamide	Anti-arythmique	
Quinidine	Anti-arythmique	Femme > Homme
Sotalol	Anti-arythmique	Femme > Homme
Sparfloxaciné	Antibiotique	
Thioridazine	Anti-psychotique	

TdP: Torsades de pointe

#### 1.4.2.1.3.2 Facteurs génétiques

Différentes causes congénitales (syndrome de Jervell-Lange-Nielsen, syndrome de Romano Ward) peuvent être impliquées dans le prolongement de l'intervalle QT. Le gène "*human ether-a-go-go-related*" ou *hERG* code pour la protéine qui représente la sous-unité  $\alpha$  des canaux potassiques responsables de  $I_{Kr}$ . Des mutations dans le gène codant pour  $I_{Kr}$  est une cause bien connue d'un Long QT congénital par la diminution des courants potassiques sortants ou de l'incidence d'une prolongation de l'intervalle QT suite à la prise de médicaments. Des mutations dans les gènes responsables des courants  $I_{Ks}$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$  et  $I_{K1}$  sont également impliqués dans le syndrome du Long QT (Table 8). Les évidences actuelles suggèrent qu'une mutation reliée au Long QT congénital a été retrouvée pour 5 à 10% des personnes développant une prolongation de l'intervalle QT et des torsades de pointes suite à la prise de médicaments (Roden et coll., 2004). Ainsi, les mutations ou polymorphismes dans les gènes codant pour les protéines des canaux ioniques seraient un autre facteur influençant l'incidence d'un prolongement de l'intervalle QT.

Tableau 8: Gène associés à l'apparition d'une prolongation de l'intervalle QT si muté.

Syndrome	Gène mutée	Courant déficient	Phénotype
LQT1	KCNQ1 ou KvLQT1	↓ I <sub>Ks</sub>	TdP à l'effort
LQT2	<i>hERG</i>	↓ I <sub>Kr</sub>	TdP dû au stress
LQT3	<i>SCN5A</i>	↑ I <sub>Na</sub>	TdP au repos
LQT4	<i>Ankyrine B</i>	défaut d'ancrage	TdP-dysfonction sinusale
LQT5	<i>KCNE1</i>	↓ I <sub>Ks</sub>	TdP
LQT6	<i>KCNE2</i>	↓ I <sub>Kr</sub>	TdP
LQT7	<i>KCNJ2</i>	↓ I <sub>K1</sub>	syndrome de Andersen
LQT8	<i>CACNA1C</i>	↑ I <sub>Ca,L</sub>	syndrome de Timothy

#### 1.4.2.1.3.3 Bradychardie

La bradychardie, caractérisée par une fréquence cardiaque lente, serait un des facteurs prédisposant à un prolongement de l'intervalle QT. En effet, une fréquence cardiaque lente est caractérisée par une longue durée de repolarisation. Il a été observé pour des médicaments bloqueurs de  $I_{Kr}$  que la prolongation de la durée de repolarisation s'est avérée plus importante en présence de fréquences cardiaques lentes (Roden et coll., 1986).

#### 1.4.2.1.3.4 Sexe féminin

Plusieurs études cliniques ont démontré que les médicaments ayant la capacité de prolonger l'intervalle QT induisent des torsades de pointes plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes (Makkar et coll., 1993; Lehman et coll., 1996; Drici et coll., 1998). Cette tendance peut être associée en partie à un intervalle QTc (intervalle QT corrigé pour la fréquence cardiaque) naturellement plus long chez la femme que chez l'homme après la puberté (Hulot et coll., 2003). En fait, la durée de l'intervalle QT diminue à partir de la puberté chez l'homme pour revenir à sa durée de base vers 50 ou 60 ans (Kleinman et coll., 1966), tandis que pour les femmes l'intervalle QT demeure stable. Des études suggèrent que les hormones androgènes, spécifiquement la testostérone, chez l'homme pourraient expliquer en partie un intervalle QT plus court (Bidoggia et coll., 2000; Brouillette et coll., 2003).

### **1.4.2.2 Implication possible des transporteurs ABC dans le prolongement de l'intervalle QT**

Le blocage du canal potassique rectifiant retardé  $I_{Kr}$  apparaît être le mécanisme sous-jacent du prolongement de la repolarisation observé chez les patients traités avec des médicaments ayant la capacité de prolonger l'intervalle QT. Le site de liaison au canal  $I_{Kr}$  semble être localisé au niveau intracellulaire (Zou et coll., 1997; Zhang et coll., 1999). En contrôlant l'accès des xénobiotiques au milieu intracellulaire et au site de liaison de  $I_{Kr}$ , les transporteurs ABC pourraient moduler l'efficacité ou la toxicité des médicaments. Par conséquent, la régulation des concentrations intracellulaires de médicaments bloqueurs de  $I_{Kr}$  par les transporteurs ABC peut donc présenter un facteur de modulation important des risques de toxicités cardiaques, tel que le syndrome du Long QT médicamenteux. La Figure 7 schématise cette hypothèse; une mutation ou l'inhibition d'un transporteur ABC, telle que la P-gp, pourrait mener à une accumulation intracellulaire d'un médicament bloqueur d' $I_{Kr}$ , tel le dompéridone, qui inhiberait le canal  $I_{Kr}$  en se liant à son site de liaison situé du côté intracellulaire engendrant une déficience de la repolarisation.

Récemment, le risque de prolongation de l'intervalle QT suite à l'administration concomitante de deux substrats de la P-gp, le dompéridone et le kétoconazole, a été reconnu. Il est connu que ces deux composés ont la capacité de prolonger l'intervalle QT (Osborne et coll., 1985; Bruera et coll., 1986; Gras et coll., 1996). Une prolongation de la repolarisation cardiaque a été observée lors de la co-administration du dompéridone et du kétoconazole, ce qui n'a pas été observé pour l'administration du dompéridone seul (Medecines Control Council, 2006).

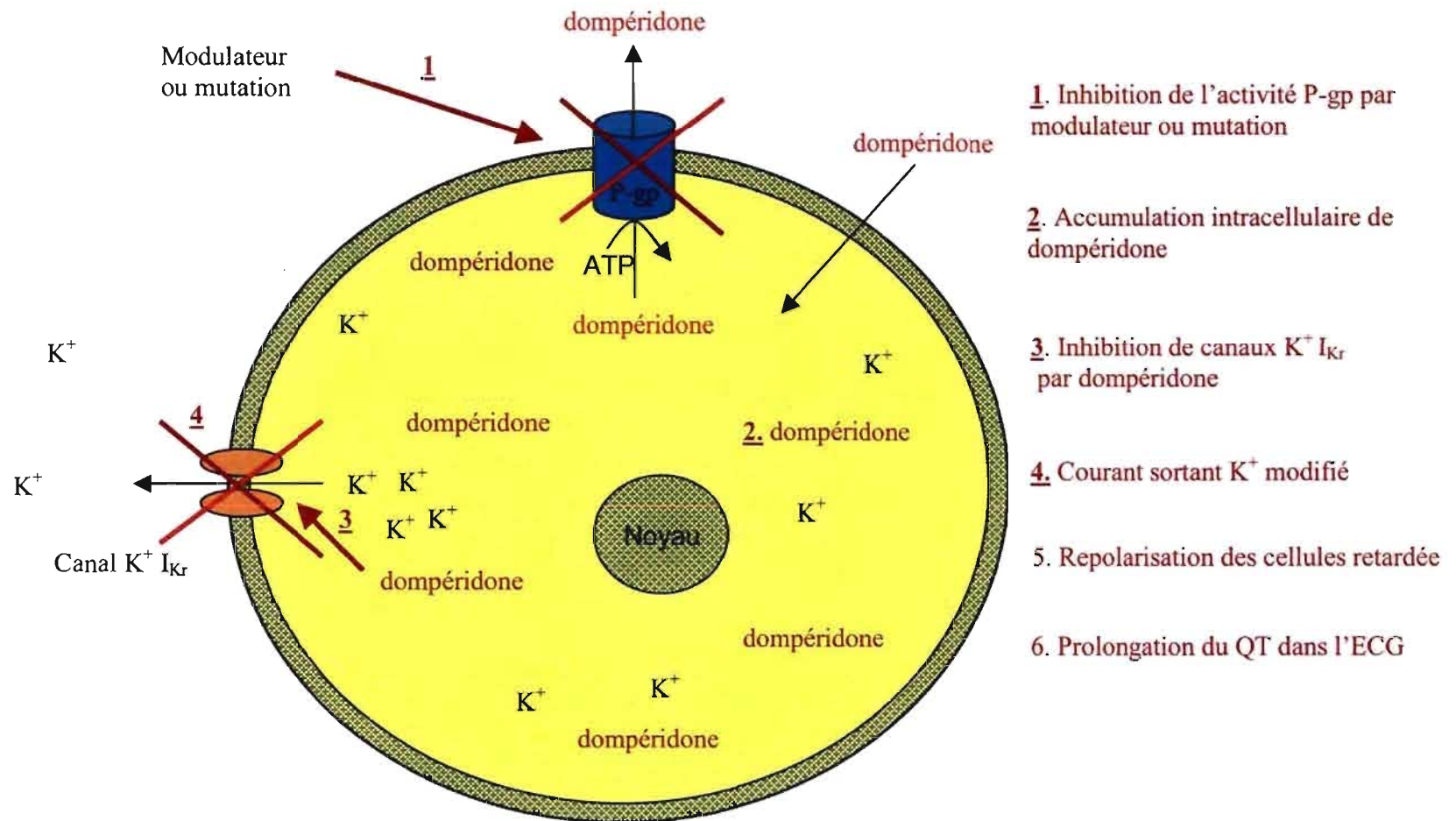


Figure 7: Représentation schématique de l'hypothèse de la régulation des concentrations intracellulaires de bloqueur d'I<sub>Kr</sub> par les transporteurs ABC, telle que la P-gp, dans les cardiomyocytes.

## **1.5 Expression des transporteurs ABC**

### **1.5.1 Régulation de l'expression des transporteurs ABC**

#### **1.5.1.1 Régulation par les médicaments**

Des recherches ont démontré que les médicaments pouvaient contribuer à augmenter l'expression tissulaire des transporteurs ABC. Jetté et collègues (1996) ont observé qu'une administration de 5 jours de cyclosporine A (10 mg/kg) à des rats, augmentait de 82% l'expression de la P-gp comparativement au groupe contrôle. Suite à l'interruption de l'administration de la cyclosporine A, les valeurs redevaient aux valeurs contrôles après 9 jours. Par conséquent, la cyclosporine A semblait moduler de façon réversible l'expression de la P-gp dans les tissus normaux. Ces résultats doivent par contre tenir compte que seul l'anticorps C-219 fut utilisé (Thiebaut et coll., 1989; Liu et coll., 1997).

Plus récemment, une étude a démontré qu'un traitement de 10 jours de rifampicine ou de vérapamil chez des souris inoculées avec des cellules tumorales d'ascites d'Ehrlich augmentait les niveaux de la protéine P-gp, bien qu'aucune augmentation des niveaux de transcrits de *mdr1a* n'ait été détectée (Granzotto et coll., 2004). L'augmentation de l'expression protéique en l'absence d'une augmentation



des niveaux d'ARNm a également été démontrée par d'autres chercheurs qui ont attribué cette observation à une augmentation de la demi-vie des transporteurs ABC ou à un effet post-traductionnel des médicaments (Hill et coll., 1990; Westphal et coll., 2000). De plus, une autre étude récente a révélé qu'un traitement de 15 jours à la rifampicine augmentait significativement les niveaux d'ARNm de la P-gp, MRP1, MRP2, et CYP3A4 chez une lignée cellulaire du tubule rénal, alors que l'augmentation protéique fut observée que pour les transporteurs P-gp et MRP2 (Magnarin et coll., 2004).

Peu d'attention est accordée à la possibilité que l'expression des transporteurs ABC pourrait être affectée par l'administration de médicaments destinés à des patients cancéreux mais pour des pathologies autres. Par exemple, il n'est pas rare que des patients atteints d'un cancer souffrent de maladies cardiovasculaires. Plusieurs médicaments communément administrés à des patients atteints d'insuffisance cardiaque sont des substrats de la P-gp, tels que l'amiodarone, losartan et digoxin (Schinkel et coll., 1995; Soldner et coll., 2000). Un traitement chronique avec des substrats des transporteurs ABC peut par conséquent augmenter le niveau d'expression des ces protéines et ainsi conférer une résistance des cellules cancéreuses à leur traitement et promouvoir un échec thérapeutique.

### 1.5.1.2 Régulation par les conditions pathologiques

Une équipe de chercheurs a démontré une augmentation de l'expression de la P-gp dans les cardiomyocytes en conditions d'ischémie cardiaque comparativement à des conditions de perfusion normale chez le porc et le mouton (Lazarowski et coll., 2005; Laguens et coll., 2007). Des analyses quantitatives pour le transporteur MRP5 pour des échantillons de ventricules provenant de sujets sains ou de patients souffrant de cardiomyopathie ischémique ou dilatée, suggèrent également une régulation à la hausse dans des conditions ischémiques (Dazert et coll., 2003). De plus, récemment des chercheurs ont démontré que l'expression cardiaque du transporteur BCRP était régulée à la hausse chez les patients souffrant de cardiomyopathie dilatée ou ischémique (Meissner et coll., 2006). Selon les auteurs de ces dernières publications, les facteurs de transcription des transporteurs ABC seraient activés en condition d'ischémie cardiaque menant ainsi à l'extrusion du milieu intracellulaire des produits cytotoxiques dérivés de l'ischémie. Les transporteurs ABC assureraient ainsi un rôle de protection cellulaire essentiel à la survie de la cellule.

Par contre, Sims et collègues (2004) n'ont pu observé un changement au niveau de l'expression cardiaque de la P-gp dans des cas d'insuffisance cardiaque. De plus, une autre recherche a démontré une diminution de l'expression de la P-gp chez des patients souffrant d'une cardiomyopathie dilatée comparativement aux

patients souffrant d'une cardiomyopathie ischémique ou sujets en santé. Ces résultats se sont avérés consistants à la fois pour les niveaux de protéines que pour les niveaux d'ARNm (Meissner et coll., 2002). Des recherches supplémentaires sont requises pour évaluer l'effet des conditions pathologiques sur l'expression des transporteurs ABC.

### **1.5.2 Polymorphismes**

L'administration d'un médicament peut conduire une grande variabilité inter-individuelle de l'effet thérapeutique qui peut potentiellement être expliquée en partie par l'expression tissulaire des transporteurs ABC. Cette variabilité peut être expliquée par des polymorphismes pour les gènes codant pour les transporteurs ABC.

La mutation silencieuse à la position 3435 de l'exon 26 (C3435T) est le seul polymorphisme identifié jusqu'à maintenant qui affecte l'expression de la P-gp dans les tissus humains (Hoffmeyer et coll., 2000). Par exemple pour le rein humain, les individus possédant le génotype TT ont révélé une expression de la P-gp inférieure de 1.5 fois comparativement aux individus caractérisés par le génotype CC (Siegsmund et coll., 2002). De façon similaire, dans le petit intestin les niveaux de la P-gp observés se sont révélés être 2 fois moins élevés pour les individus homozygotes pour

l'allèle T comparativement au génotype CC (Hoffmeyer et coll., 2000; Schwab et coll., 2003). En accord avec cette dernière observation, des concentrations plasmatiques plus élevées de digoxine ont été retrouvées chez des patients porteurs du génotype TT comparativement au génotype CC (Hoffmeyer et coll., 2000). Cette relation entre les polymorphismes de MDR1/expression de la P-gp et la disposition des médicaments n'a par contre pas été observée pour d'autres médicaments tels que la cyclosporine, talinolol et loperamide (von Ashen et coll., 2001; Siegmund et coll., 2002; Pauli-Magnus et coll., 2003). De plus, une tendance opposée a été observée par d'autres chercheurs. Par exemple, Fellay et collègues (2002) ont obtenu des concentrations plasmatiques plus élevées de nelfinavir pour le génotype CC comparativement au génotype TT ou CT. Plusieurs études ont été effectuées dans le but d'obtenir une corrélation entre les polymorphismes de *MDR1*, particulièrement C3435T, aux changements de l'expression ou du fonctionnement de la P-gp, ce qui a mené à plusieurs contradictions. Une hypothèse possible pour expliquer ces contradictions est que la plupart des études ont focalisé sur un polymorphisme individuel, tel que C3435T, plutôt que de s'intéresser à une combinaison de polymorphismes potentiellement liés appelé haplotype (Woodahl et Ho, 2004). Des facteurs environnementaux et des différences inter-ethnies peuvent également avoir été des facteurs d'influence. De plus, des mesures de concentrations tissulaires plutôt que des mesures de concentrations plasmatiques auraient pu donner une indication plus claire de l'effet de ce polymorphisme.

Jusqu'à tout récemment, il n'y avait aucune évidence dans la littérature discutant l'impact des polymorphismes des transporteurs ABC au niveau cardiaque. Il peut être prédit que des niveaux cardiaques d'expression de la P-gp faibles ou élevés pourraient augmenter ou réduire, respectivement, la distribution de médicaments substrats de la P-gp menant à des effets thérapeutiques ou toxiques. Meissner et collègues (2004) ont investigué l'effet du polymorphisme C3435T de *MDR1* sur les niveaux d'expression cardiaque de la P-gp. Ils n'ont observé aucune influence significative du polymorphisme sur l'expression de la P-gp sur des échantillons d'oreillettes provenant de cœurs humains. Des études subséquentes sont requises pour évaluer la pertinence clinique des polymorphismes pour les gènes codant pour la P-gp et autres transporteurs ABC particulièrement au niveau ventriculaire.

## 1.6 Problématique et objectifs de recherche

Il est maintenant bien établi que les transporteurs ABC ont un rôle de protection de l'organisme au sein de plusieurs tissus tels que l'intestin, le foie, le cerveau, les testicules ou le placenta par leur mécanisme d'extrusion de substances endogènes et exogènes de l'intérieur vers l'extérieur des cellules. Bien qu'il existait jusqu'à maintenant peu d'information traitant de l'expression et du rôle fonctionnel des transporteurs ABC au niveau du cœur, la revue de la littérature présentée aux pages précédentes suggère la présence de ces transporteurs au niveau du cœur leur conférant possiblement un rôle de protection contre l'accumulation de xénobiotiques dans cet organe. Ces transporteurs étant responsables de l'extrusion de xénobiotiques auraient le potentiel de contrôler les concentrations intracellulaires de xénobiotiques.

Certains médicaments sont reconnus pour posséder la capacité de prolonger l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme en inhibant le canal potassique rectifiant retardé  $I_{Kr}$  responsable de la repolarisation cardiaque. Une repolarisation déficiente prolonge l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme et peut engendrer un épisode de torsades de pointes pouvant mener à la mort subite. Le site de liaison au canal  $I_{Kr}$ , situé dans la membrane plasmique, semble être localisé au niveau intracellulaire. Par conséquent, la régulation des concentrations intracellulaires cardiaques par les

transporteurs ABC pourrait être un facteur déterminant dans l'incidence des cardiotoxicités tel que le syndrome du Long QT médicamenteux, pour des agents bloqueurs du canal  $I_{Kr}$ . Pour ces raisons, nous avons émis l'hypothèse que les transporteurs ABC, telle que la P-gp, par leur régulation des concentrations intracellulaires cardiaques, pourraient potentiellement contrôler l'accès d'un médicament bloqueur d' $I_{Kr}$  à son site de liaison sur ce canal potassique.

De plus, il est connu que la réponse aux médicaments, d'un point de vue thérapeutique ou de toxicités, peut varier grandement d'un individu à l'autre. Ces variations peuvent être expliquées en partie par des différences alléliques au niveau des enzymes du CYP450 mais une grande portion de la variabilité inter-individuelle ne peut être expliquée à ce jour. Par exemple l'incidence de cardiotoxicités, tel que le syndrome du Long QT médicamenteux, est dotée d'une grande variabilité inter-individuelle. Il est bien établi que les femmes sont plus à risque que les hommes à développer cette cardiotoxicité suite à la prise de médicaments ayant le potentiel de prolonger l'intervalle QT. Bien que des évidences suggèrent que les androgènes pourraient jouer un rôle dans cette différence entre genres, les scientifiques s'entendent pour affirmer que les facteurs responsables de cette différence demeurent obscurs. En investiguant si un transporteur ABC, telle que la P-gp, puisse influencer les concentrations intracardiaques d'un médicament bloqueur d' $I_{Kr}$ , les variations

génétiques pour ce transporteur pourraient expliquer en partie les variations inter-individuelles pour l'incidence du syndrome du Long QT médicamenteux.

Suite à une revue de la littérature exhaustive démontrant l'expression de certains transporteurs ABC au niveau du cœur, nous avons vérifié l'implication de la P-gp dans la distribution cardiaque et tissulaire du dompéridone à l'aide de souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp. Le dompéridone est à la fois un substrat de la P-gp et un bloqueur d' $I_{Kr}$  et fut administré à des souris simple mutées (*mdr1a* (-/-)), des souris double-mutées (*mdr1a/1b* (-/-)) ainsi qu'à des souris normales. Suite à l'administration intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone, les souris furent euthanasiées à six différents temps jusqu'à 120 min post-dose. Le sang, le plasma et environ vingt-cinq tissus, incluant les structures du cœur, furent prélevés et analysés pour leur niveau de radioactivité associé au dompéridone par comptage par scintillation liquide. La détermination de la présence relative de la substance mère par rapport aux métabolites radioactifs de la dompéridone fut obtenue par HPLC avec détection radiométrique. Nous avons tenté d'identifier les métabolites majeurs du dompéridone par LC/MS. De plus, de l'autoradioluminographie sur corps entier pour visualiser la distribution de radioactivité associé au dompéridone ainsi que de la micro-autoradiographie pour vérifier la pénétration intracellulaire du dompéridone pour les cardiomyocytes ont été effectués. Des différences entre les souris déficientes pour le



gène codant pour la P-gp et les souris normales pourraient donc nous suggérer un rôle de la P-gp dans la régulation des concentrations intracardiaques de xénobiotiques, et par conséquent dans la modulation de l'incidence de cardiotoxicités.

Plusieurs cas d'interactions médicamenteuses lors de la co-administration de deux médicaments impliquant les transporteurs ABC ont été rapportés dans la littérature. De plus, tel que discuté dans les sections précédentes, certains médicaments auraient le potentiel de moduler les niveaux d'expression des transporteurs ABC. Par exemple, la cyclosporine A a semblé moduler de façon réversible l'expression de la P-gp dans les tissus normaux suite à un traitement de 5 jours de cyclosporine (Jetté et coll., 1996) ou un traitement de 10 jours de rifampicine ou de vérapamil chez des souris augmentait les niveaux de la protéine P-gp (Granzotto et coll., 2004). Les répercussions que peuvent provoquer une modulation des transporteurs ABC par un traitement chronique d'un médicament substrat des transporteurs ABC, au niveau de l'effet thérapeutique ou de l'incidence de toxicités d'un autre substrat, peuvent donc être considérables.

Nous avons donc investigué la possibilité qu'un pré-traitement de 5 jours consécutifs de vérapamil avant l'administration de <sup>3</sup>H-dompéridone à la sixième journée puisse altérer les concentrations intracardiaques et tissulaires du dompéridone

chez les cobayes par une modulation de l'expression de la P-gp ou de son activité par le vérapamil. Les résultats obtenus pour ces animaux furent comparés aux résultats obtenus pour les cobayes pré-traités qu'une seule fois au vérapamil, soit 2 h avant l'administration du dompéridone (inhibition compétitive), ainsi qu'aux résultats du groupe contrôle caractérisé par l'absence de pré-traitement au vérapamil. Le sang, le plasma et une trentaine de tissus, incluant les structures du cœur, furent prélevés de chaque animal et analysés pour leur niveau de radioactivité associé au dompéridone par comptage par scintillation liquide. La détermination de la présence relative de la substance mère par rapport aux métabolites radioactifs de la dompéridone fut obtenue par HPLC avec détection radiométrique. La réponse pharmacodynamique fut évaluée par la mesure de l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme pour ces trois conditions. De plus, étant donné qu'au niveau clinique les femmes semblent être plus prédisposées au syndrome du long QT médicamenteux que les hommes, la différence entre genre fut évaluée pour les résultats de distribution de dompéridone et de pharmacodynamie.

## 1.7 Références

Allen JD, Van Dort SC, Buitelaar M, van Tellingen O, and Schinkel AH (2003) Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res* 63:1339-1344.

Aronica A, Gorter JA, Redeker S, van Vliet EA, Ramkema, M, Scheffer GL, Scheper RJ, van der Valk P, Leenstra, S, Baayen JC, WGM Spliet, and Troost D (2005) Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Microvessel Endothelium of Human Control and Epileptic Brain. *Epilepsia* 46:849-857.

Baas F, and Borst P (1988) The tissue dependent expression of hamster P-glycoprotein genes. *FEBS Lett* 229:329-332.

Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, and Béliveau R (1997) P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J* 326:539–544.

Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR, and Kruh GD (1998) Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J Natl Cancer Inst* 90:1735-1741.

Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, and Kruh GD (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* 62:6172-6177.

Belinsky MG, and Kruh GD (1999) MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br J Cancer* 80:1342-1349.

Bellamy WT, Peng YM, Odeleye A, Ellsworth L, Xu MJ, Grogan TM, and Weinstein RS (1995) Cardiotoxicity in the SCID mouse following administration of doxorubicin and cyclosporin A. *Anticancer Drugs* 6:736-743.

Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, and Pastan I (2002) MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6997-7002.

Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B, and Pastan I. (2001) MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med.* 7:509-516.

Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, and de Jong PT (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25:228-231.

Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blacksley EJ, Valverde E, et al. (2000) Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization : possible role of testosterone. *Am Heart J* 140:678-683.

Brouillette J, Trépanier-Boulay V, and Fiset C (2003) Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 546.2:403-413.

Brown PC, Thorgeirsson SS, and Silverman JA (1993) Cloning and regulation of the rat *mdr2* gene. *Nucleic Acids Res* 21:3885-3891.

Bruera E, Villamayor R, Roca E, Barugel M, Tronge J and Chacon R (1986) QT interval prolongation and ventricular fibrillation with i.v. domperidone. *Cancer Treat Rep* 70:545-546.

Buggisch D, Isenberg G, Ravens U, and Scholtysik G (1985) The role of sodium channels in the effects of the cardiotonic compound DPI 201-106 on contractility and membrane potentials in isolated mammalian heart preparations. *Eur J Pharmacol* 118:303-311.

Cárcel-Trullols J, Torres-Molina F, Araico A, Saadeddin A, and Peris JE (2004) Effect of cyclosporine A on the tissue distribution and pharmacokinetics of etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol* 54:153-160.

Cayre A, Moins N, Finat-Duclos F, Maublant J, Albuisson E, and Verrelle P (1996) In vitro detection of the MDR phenotype in rat myocardium: use of PCR, [<sup>3</sup>H]daunomycin and MDR reversing agents. *Anticancer Drugs* 7:833-837.

Chang G (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* 330:419-430.

Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, and Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-389.

Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, and Kruh GD (2002) Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res* 62:3144-3150.

Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, and Klaassen CD (2002) Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 300:97-104.

Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J, and Lazdunski M (1998) HERG and KvLQT1/IsK, the cardiac K<sup>+</sup> channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. *Mol Pharmacol* 54:695-703.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, and Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650-1654.

Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, and Deeley RG (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54:5902-5910.

Colombo T, Gonzalez Paz O, and D'Incalci M (1996a) Distribution and activity of doxorubicin combined with SDZ PSC 833 in mice with P388 and P388/DOX leukaemia. *Br J Cancer* 73:866-871.

Colombo T, Gonzalez Paz O, Zucchetti M, Maneo A, Sessa C, Goldhirsch A, and D'Incalci M (1996b) Paclitaxel induces significant changes in epidoxorubicin distribution in mice. *Ann Oncol* 7:801-5.

Colombo T, Zucchetti M, and D'Incalci M (1994) Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* 269:22-27.

Couture L, Nash JA, and Turgeon J (2006) The ATP-binding cassette (ABC) transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart. *Pharmacol Rev* 58:244-258.



Cox DS, Scott KR, Gao H, and Eddington ND (2002) Effect of P-glycoprotein on the pharmacokinetics and tissue distribution of enaminone anticonvulsants: Analysis by population and physiological approaches. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1096-1104.

Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P, and Housman DE (1989) The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol* 9:1346-1350.

Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, and Keppler D (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55:929-937.

Dano K (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 323:466-483.

Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Bohm M, Warzok R, Kerb R, Brinkmann U, Schaeffeler E, Schwab M, Cascorbi I, Jedlitschky G, and Kroemer HK (2003) Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol* 163:1567-1577.

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

de Graaf D, Sharma RC, Mechetner EB, Schimke RT, and Roninson IB (1996) P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1238-1242.

de Lannoy IA, and Silverman M (1992) The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 189:551-557.

Dell'Acqua G, Polishchuck R, Fallon JT, and Gordon JW (1999) Cardiac resistance to adriamycin in transgenic mice expressing a rat alpha-cardiac myosin heavy chain/human multiple drug resistance 1 fusion gene. *Hum Gene Ther* 10:1269-1279.

Devault A, and Gros P (1990) Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol* 10:1652-1663.

Dobrev D, and Ravens U (2003) Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 98:137-148.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, and Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15665-15670.

Drici MD, Knollmann BC, Wang WX, and Woosley RL (1998) Cardiac actions of erythromycin. Influence of female sex. *JAMA* 280:1774-1776.

Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, and Turgeon J (1998) Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation* 97:204-210.

el-Sherif N, Zeiler RH, Craelius W, Gough WB, and Henkin R (1988) QTU prolongation and polymorphic ventricular tachyarrhythmias due to bradycardia-dependent early afterdepolarizations. Afterdepolarizations and ventricular arrhythmias. *Circ Res* 63:286-305.

Estevez MD, Wolf A, and Schramm U (2000) Effect of PSC 833, verapamil and amiodarone on adriamycin toxicity in cultured rat cardiomyocytes. *Toxicol In Vitro* 14:17-23.

Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J, and Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* 83:375-383.

Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, and Telenti A; Swiss HIV Cohort Study (2002) Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 359:30-36.

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, and Scheper RJ (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 148:1237-1247.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, and Pastan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:265-269.

Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, and Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol* 157:1575-1580.

Furuya KN, Gebhardt R, Schuetz EG, and Schuetz JD (1994) Isolation of rat pgp3 cDNA: evidence for gender and zonal regulation of expression in the liver. *Biochim Biophys Acta* 1219:636-644.

Ghosh S, Ting S, Lau H, Pulinilkunnil T, An D, Qi D, Abrahani MA, and Rodrigues B (2004) Increased efflux of glutathione conjugate in acutely diabetic cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 82:879-887.

Gianni L, Munzone E, Capri G, Fulfarò F, Tarenzi E, Villani F, Spreafico C, Laffranchi A, Caraceni A, Martini C, Stefanelli M, Valagussa P, and Bonadonna G (1995) Paclitaxel by 3-hour infusion in combination with bolus doxorubicin in women with untreated metastatic breast cancer: high antitumor efficacy and cardiac effects in a dose-finding and sequence-finding study. *J Clin Oncol* 13:2688-2699.

Gonzalez O, Colombo T, De Fusco M, Imperatori L, Zucchetti M, and D'Incalci M (1995) Changes in doxorubicin distribution and toxicity in mice pretreated with the cyclosporin analogue SDZ PSC 833. *Cancer Chemother Pharmacol* 36:335-340.

Gramatte T, and Oertel R (1999) Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R-verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 66:239-245.

Granzotto M, Drigo I, Candussio L, Rosati A, Bartoli F, Giraldi T, and Decorti G (2004) Rifampicin and verapamil induce the expression of P-glycoprotein in vivo in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Lett* 205:107-115.

Gras J, Llenas J, Palacios JM, and Roberts DJ (1996) The role of ketoconazole in the QTc interval prolonging effects of H1-antihistamines in a guinea-pig model of arrhythmogenicity. *Br J Pharmacol* 119:187-188.

Gros P, Croop J, and Housman D (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47:371-380.

Gros P, Raymond M, Bell J, and Housman D (1988) Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol* 8:2770-2778.

Hagen SG, Monroe DG, Dean DM, and Sanders MM (2000) Repression of chick multidrug resistance-associated protein 1 (chMRP1) gene expression by estrogen. *Gene* 257:243-249.

Haimour A, Conseil G, Deeley RG, and Cole SP (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 5:21-53.

Hendricks CB, Rowinsky EK, Grochow LB, Donehower RC, and Kaufmann SH (1992) Effect of P-glycoprotein expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK&F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res* 52:2268-2278.

Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, and Hermodson MA (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323:448-450.

Hill BT, Deuchars K, Hosking LK, Ling V, Whelan RD (1990) Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X irradiation in vitro. *J Natl Cancer Inst* 82:607-612.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, and Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3473-3478.

Holzinger A, Kammerer S, Berger J, and Roscher AA (1997) cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 239:261-264.

Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ, Borst P, Pinedo HM, and Jansen G (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 59:2532-2535.

Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, and Kruh GD (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): Resistance to docetaxel. *Cancer Res* 64:4927-4930.



Hrycyna CA, Ramachandra M, Germann UA, Cheng PW, Pastan I, and Gottesman MM (1999) Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry* 38:13887-13899.

Hsu SI, Lothstein L, and Horwitz SB (1989) Differential overexpression of three *mdr* gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique *mdr* genes. *J Biol Chem* 264:12053-12062.

Hulot JS, Démolis JL, Rivière R, Strabach S, Christin-Maitre S, and Funck-Brentano C (2003) Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration. *Eur Heart J* 24:1663-1667.

Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM, Zelcer N, Wiltshire HR, Beijnen JH, and Schinkel AH (2002) Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS* 16:2295-2301.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, and Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346:362-365.

James AF, Choisy SC, and Hancox JC (2005) Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol Epub ahead of print*

Jetté L, Beaulieu E, Leclerc JM, and Beliveau R (1996) Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues. *Am J Physiol* 270:F756-65.

Jetté L, Pouliot JF, Murphy GF, and Beliveau R (1995) Isoform I (mdr3) is the major form of P-glycoprotein expressed in mouse brain capillaries. Evidence for cross-reactivity of antibody C219 with an unrelated protein. *Biochem J* 305:761-766.

Jones K, Hoggard PG, Sales SD, Khoo S, Davey R, and Back DJ. (2001) Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport. *AIDS* 15:675-681.

Juliano RL, and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162.

Kaminski WE, Wenzel JJ, Piehler A, Langmann T, and Schmitz G (2001) ABCA6, a novel a subclass ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1295-1301.

Kang W, and Weiss M (2001) Influence of P-glycoprotein modulators on cardiac uptake, metabolism, and effects of idarubicin. *Pharm Res* 18:1535-1541.

Kao HH, Huang JD, and Chang MS (2002) cDNA cloning and genomic organization of the murine MRP7, a new ATP-binding cassette transporter *Gene* 286:299-306.

Karlsson J, Kuo SM, Ziemniak J, and Artursson P (1993) Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: Mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* 110:1009-1016.

Kartner N, Shales M, Riordan JR, and Ling V (1983) Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res* 43:4413-4419.

Katzung BG. *Basic and clinical pharmacology* 6<sup>th</sup> edition. Appleton and Lange, 1995.

Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, and Kuwano M (1999) Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett* 456:327-331.

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, and Wilkinson GR (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 101:289-294.

Kleinman LI, Loewenstein MS, and Goldstein L (1966) Sex difference in the transport of p-aminohippurate by the rat kidney. *Endocrinology* 78:403-406.

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F and Borst P (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57: 3537-3547.

Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, and Borst P (1999) MRP3 an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6914-6919.

Kubo Y, Sekiya S, Ohigashi M, Takenaka C, Tamura K, Nada S, Nishi T, Yamamoto A, and Yamaguchi A (2005) ABCA5 resides in lysosomes, and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms. *Mol Cell Biol* 25: 4138-4149.

Laguens RP, Lazarowski AJ, Cuniberti LA, Vera Janavel GL, Cabeza Meckert PM, Yannarelli GG, del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA, and Crottogini AJ (2007) Expression of the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein in cardiomyocytes of conscious sheep undergoing acute myocardial ischemia followed by reperfusion. *J Histochem Cytochem* 55:191-197.

Lazarowski AJ, Garcia Rivello HJ, Vera Janavel GL, Cuniberti LA, Cabeza Meckert PM, Yannarelli GG, Mele A, Crottogini AJ, and Laguens RP (2005) Cardiomyocytes of chronically ischemic pig hearts express the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein. *J Histochem Cytochem* 53:845-850.

Lecureur V, Sun D, Hargrove P, Schuetz EG, Kim RB, Lan LB, and Schuetz JD (2000) Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 57:24-35.

Lee K, Belinsky MG, Bell DW, Testa JR, and Kruh GD (1998) Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res* 58:2741-2747.

Lee K, Klein-Szanto AJ, and Kruh GD (2000) Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst* 92:1934-1940.

Lehmann MH, Hardy S, Archibald D, Quart B, and MacNeil DJ. (1996) Sex difference in risk of torsade de pointes with d,l-sotalol. *Circulation* 94:2535-2541.

Liu B, Sun D, Xia W, Hung MC, and Yu D (1997) Cross-reactivity of C219 anti-p170(mdr-1) antibody with p185(c-erbB2) in breast cancer cells: Cautions on evaluating p170(mdr-1). *J Natl Cancer Inst* 89:1524-1529.

Locher KP, and Borths E (2004) ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS Lett* 564:264-268.

Locher KP, Lee AT, and Rees DC (2002) The E. coli BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296:1091-1098.

Lowes S, and Simmons NL (2002) Multiple pathways for fluoroquinolone secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol* 135:1263-1275.

Magnarin M, Morelli M, Rosati A, Bartoli F, Candussio L, Giraldi T, and Decorti G (2004) Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1,

MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol* 483:19-28.

Makkar RR, Fromm BS, Steinman R, Meissner MD, and Lehmann MH. (1993) Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. *JAMA* 270:2590-2597.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, and Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61:3458-3464.

Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Floot BG, and Schellens JH (1999) Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* 59:4559-4563.

Marban E (2002) Cardiac channelopathies. *Nature* 415:213-218.

Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, and Garry DJ (2004) Persistent expression of the ATP-binding

cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265:262-275.

Medicines Control Council (2006) Interaction between ketoconazole and domperidone and the risk of QT prolongation – important safety information. *S Afr Med J* 96:596.

Meissner K, Heydrich B, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Mosyagin I, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, and Kroemer HK (2006) The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J Histochem Cytochem* 54:215-221.

Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, and Kroemer HK (2004) Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* 14:381-385.

Meissner K, Sperker B, Karsten C, Zu Schwabedissen HM, Seeland U, Bohm M, Bien S, Dazert P, Kunert-Keil C, Vogelgesang S, Warzok R, Siegmund W, Cascorbi



I, Wendt M, and Kroemer HK (2002) Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem* 50:1351-1356.

Miller DS (2001) Nucleoside phosphonate interactions with multiple organic anion transporters in renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* 299:567-574.

Müller M (2003) 49 human ATP-binding cassette transporters. <http://www.nutrigenet.com/humanabc.htm>.

Muramatsu T, Johnson DR, Finch RA, Johnson LK, Leffert JJ, Lin ZP, Pizzorno G, and Sartorelli AC (2004) Age-related differences in vincristine toxicity and biodistribution in wild-type and transporter-deficient mice. *Oncol Res* 14:331-343.

Naruhashi K, Tamai I, Inoue N, Muraoka H, Sai Y, Suzuki N, and Tsuji A (2001) Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. *J Pharm Pharmacol* 53:699-709.

Ng WF, Sarangi F, Zastawny RL, Veinot-Drebot L, and Ling V (1989) Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol Cell Biol* 9:1224-1232.

Nishimura M, Naito S, and Yokoi T (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:135-149.

Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, and Horwitz SB (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22:7280-7295.

Osborne RJ, Slevin ML, Hunter RW and Hamer J (1985) Cardiac arrhythmias during cytotoxic chemotherapy: role of domperidone. *Hum Toxicol* 4:617-626.

Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, Lovelace E, Rutherford AV, and Willingham MC (1988) A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4486-4490.

Pauli-Magnus C, Feiner J, Brett C, Lin E, and Kroetz DL (2003) No effect of MDR1 C3435T variant on loperamide disposition and central nervous system effects. *Clin Pharmacol Ther* 74:487-498.

Pavelic ZP, Reising J, Pavelic L, Kelley DJ, Stambrook PJ, and Gluckman JL (1993) Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 119:753-757.

Peters WH, and Roelofs HM (1992) Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Res* 52:1886-1890.

Piebler A, Kaminski WE, Wenzel JJ, Langmann T, and Schmitz G (2002) Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem Biophys Res Commun* 295:408-416.

Reyes CL and Chang G (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP·vanadate and lipopolysaccharide. *Science* 308:1028-1031.

Roden DM (2004) Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med* 350:1013-1022.

Roden DM, Woosley RL, and Primm RK (1986) Incidence and clinical features of the quinidine-associated long QT syndrome: implications for patient care. *Am Heart J* 111:1088-1093.

Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, and Pastan I (1986) Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4538-4542.

Rosati A, Maniori S, Decorti G, Candussio L, Giraldi T, and Bartoli F (2003) Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny. *Dev Growth Differ* 45:377-387.

Sanguinetti MC (1992) Modulation of potassium channels by antiarrhythmic and antihypertensive drugs. *Hypertension* 19:228-236.

Santostasi G, Kutty RK, and Krishna G (1991) Increased toxicity of anthracycline antibiotics induced by calcium entry blockers in cultured cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 108:140-149.

Sasabe H, Kato Y, Suzuki T, Itose M, Miyamoto G, and Sugiyama Y (2004) Differential involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and p-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 310:648-655.

Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, and Keppler D (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 8:1213-1221.

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJ, and Borst P (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* 77:491-502.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, and van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524.

Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, and Borst P (1995) Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 96:1698-1705.

Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8:161-170.

Schneider E, and Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 22:1-20.

Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, and Fridland A (1999) MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* 5:1048-1051.

Schwab M, Eichelbaum M, and Fromm MF (2003) Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:285-307.

Shah M, Akar FG, and Tomaselli GF (2005) Molecular basis of arrhythmias. *Circulation* 112:2517-2529.

Sharp SY, Smith V, Hobbs S, and Kelland LR (1998) Lack of a role for MRP1 in platinum drug resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer* 78:175-80.

Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK, and Cascorbi I (2002) The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 72:572-583.

Siegsmund M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, and Brauch H (2002) Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 13:1847-1854.

Sims JJ, Neudeck BL, Loeb JM, and Wiegert NA (2004) Tachycardia-induced heart failure does not alter myocardial P-glycoprotein expression. *Pharmacotherapy* 24:1-7.

Smit JJ, Schinkel AH, Mol CA, Majoor D, Mooi WJ, Jongsma AP, Lincke CR, and Borst P (1994) Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest* 71:638-649.

Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJ, Berns AJ, and Borst P (1993) Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451-462.

Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G, Szabo K, Welker E, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B, and Borst P (2000) MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* 275:23530-23539.

Solbach TF, Konig J, Fromm MF, and Zolk O (2006) ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 16:7-15.

Soldner A, Benet LZ, Mutschler E, and Christians U (2000) Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol* 129:1235-1243.

Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, and van Tellingen O (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2031-2035.

Sridhar R, Dwivedi C, Anderson J, Baker PB, Sharma HM, Desai P, and Engineer FN (1992) Effects of verapamil on the acute toxicity of doxorubicin in vivo. *J Natl Cancer Inst* 84:1653-1660.



Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, and Meier PJ (2000) Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118:422-430.

St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, Meier PJ, and Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279:R1495-1503.

Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, Wilson GM, Cole SP, and Deeley RG (1996) Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol* 49:962-971.

Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, and Itoyama S (1997) Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett* 112:23-31.

Takada Y, Yamada K, Taguchi Y, Kino K, Matsuo M, Tucker SJ, Komano T, Amachi T, and Ueda K (1998) Non-equivalent cooperation between the two nucleotide-binding folds of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1373:131-136.

Tamai I, Yamashita J, Kido Y, Ohnari A, Sai Y, Shima Y, Naruhashi K, Koizumi S, and Tsuji A (2000) Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain caused by multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 295:146-152.

Teeter LD, Becker FF, Chisari FV, Li DJ, and Kuo MT (1990) Overexpression of the multidrug resistance gene *mdr3* in spontaneous and chemically induced mouse hepatocellular carcinomas. *Mol Cell Biol* 10:5728-5735.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, and Willingham MC (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 37:159-164.

Tirona RG, and Kim RB (2002) Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deliv Rev* 54:1343-1352.

Török M, Gutmann H, Fricker G, and Drewe J (1999) Sister of P-glycoprotein expression in different tissues. *Biochem Pharmacol* 57:833-835.

Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, and Fiset C (2001) Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 89:437-444.

Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, Wakaumi M, Suzuki M, Schwartz GJ, Imai M, and Fujimura A (2002) Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 298:41-45.

Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, and Pastan I. (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3004-3008.

Urbatsch IL, Beaudet L, Carrier I, and Gros P (1998) Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* 37:4592-4602.

van Asperen J, van Tellingen O, Schinkel AH, and Beijnen JH (1999) Comparative pharmacokinetics of vinblastine after a 96-hour continuous infusion in wild-type mice and mice lacking mdr1a P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 289:329-333.

van Asperen J, Schinkel AH, Beijnen JH, Nooijen WJ, Borst P, and van Tellingen O (1996) Altered pharmacokinetics of vinblastine in Mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Natl Cancer Inst* 88:994-999.

Van der Blik AM, Baas F, Ten Houte de Lange T, Kooiman PM, Van der Velde-Koerts T, and Borst P (1987) The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J* 6:3325-3331.

van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Kuiper CM, Tsuruo T, Lankelma J, Meijer CJ, Pinedo HM, and Scheper RJ (1990) Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule. *Ann Oncol.* 1:56-64.

van Kalken C, Giaccone G, van der Valk P, Kuiper CM, Hadisaputro MM, Bosma SA, Scheper RJ, Meijer CJ, and Pinedo HM (1992) Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus. *Am J Pathol* 141:1063-1072.

Verschraagen M, Koks CH, Schellens JH, and Beijnen JH (1999) P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: The case of digoxin-verapamil. *Pharmacol Res* 40:301-306.

Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, and Schneider E (2002) Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* 62:5035-5040.

Volk EL, Schneider E (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 63:5538-5543.

von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, and Armstrong VW (2001) No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 47:1048-1052.

Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, and Baba M (2003) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol* 63:65-72.

Wenzel JJ, Kaminski WE, Pehler A, Heimerl S, Langmann T, and Schmitz G (2003) ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 306:1089-1098.

Westphal K, Weinbrenner A, Zschiesche M, Franke G, Knoke M, Oertel R, Fritz P, von Richter O, Warzok R, Hachenberg T, Kauffmann HM, Schrenk D, Terhaag B, Kroemer HK, and Siegmund W (2000) Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* 68:345-355.

Wickenden AD, Jegla TJ, Kaprielian R, and Backx PH (1999) Regional contributions of Kv1.4, Kv4.2, and Kv4.3 to transient outward K<sup>+</sup> current in rat ventricle. *Am J Physiol* 276:H1599-607.

Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, and Borst P (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* 3:1275-1279.

Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, and Borst P (2000) Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7476-7481.

Woodahl EL, and Ho RJ (2004) The role of MDR1 genetic polymorphisms in interindividual variability in P-glycoprotein expression and function. *Curr Drug Metab* 5:11-19.

Yang H, Elko P, Fromm BS, Baga JJ, Pires LA, Schuger CD, et al. (1997) Maximal ascending and descending slopes of the T wave in men and women. *J Electrocardiol* 30:267-276.

Zelcer N, Saeki T, Reid G, Beijnen JH, and Borst P (2001) Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J Biol Chem* 276:46400-46407.

Zeng H, Bain LJ, Belinsky MG, and Kruh GD (1999) Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res* 59:5964-5967.

Zeng J, and Rudy Y (1995) Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. *Biophys J* 68:949-964.

Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, and January CT (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* 84:989-998.

Zou A, Curran ME, Keating MT, and Sanguinetti MC (1997) Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 272:H1309-1314.



## **CHAPITRE II**

### **Principales méthodes utilisées**

## **2.1 Introduction**

Le principal composé utilisé dans cette recherche fut le dompéridone, un substrat de la P-gp et un bloqueur du canal  $I_{Kr}$ . De façon à évaluer le rôle de la P-gp dans la distribution cardiaque et tissulaire du dompéridone, ce dernier fut marqué à un isotope radioactif, le tritium. Par conséquent, plusieurs techniques utilisées pour atteindre les objectifs de la recherche sont principalement basées sur la détection d'émissions radioactives. Le  $^3\text{H}$ -dompéridone, ainsi radiomarké, a permis de retracer et quantifier les niveaux de dompéridone dans les tissus. Parmi ces techniques, le comptage par scintillation liquide, l'autoradioluminographie sur corps entier, la micro-autoradiographie, la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec détection radiométrique furent utilisées. Les principes de base de ces techniques reposant sur la détection d'émission de radioactivité sont décrits ci-dessous ainsi que certaines spécificités reliées aux études effectuées

## **2.2 Marquage radioactif du dompéridone et techniques utilisées**

### 2.2.1 Marquage radioactif du dompéridone

L'isotope radioactif, le tritium, fut utilisé pour marquer la molécule du dompéridone. Le tritium est un isotope instable de l'hydrogène et est un faible émetteur d'énergie bêta dans la quête de son état stable. Il possède une demi-vie de 12.3 années. Pour ces études, le tritium fut par conséquent un isotope facile à utiliser par sa longue demi-vie et sa manipulation représentait un risque minimal pour la sécurité de ceux qui le manipulaient.

Le  $^3\text{H}$ -dompéridone a été synthétisé par Perkin-Elmer (Boston, MA) par réduction d'un précurseur brominé provenant de la bromination du dompéridone à une activité spécifique de 48.3 Ci/mmol (1787 GBq/mmol) ou  $1.13 \times 10^5$   $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  (4195.8 MBq/mg). La pureté radiochimique supérieure à 98% a été obtenue par HPLC avec détection radiométrique.

## **2.2.2 Comptage par scintillation liquide**

### **2.2.2.1 Description de la technique de comptage par scintillation liquide**

Le principe du comptage par scintillation liquide est de convertir les émissions radioactives d'un échantillon en photons de lumière visible qu'un tube photomultiplicateur peut détecter. Pour ceci, les échantillons radioactifs ont été transférés dans des fioles et 10 mL de fluide à scintillation furent ajoutés. Ce liquide contenant du fluor, entre en fluorescence lorsque bombardé par des émissions radioactives. Ainsi, le fluor a converti les émissions de radioactivité invisibles en lumière visible. Le compteur à scintillation liquide est doté d'un tube photomultiplicateur qui détecte la lumière (photons) résultant de l'excitation du fluor par les émissions radioactives. L'instrument a donc compté cette lumière ou cette scintillation et les a quantifié en coups par minute (CPM). Les CPM ont été par la suite convertis en désintégrations par minute (DPM) selon l'efficacité de comptage basée sur l'isotope du tritium et les propriétés des échantillons. L'efficacité de comptage est calculée en fonction du masquage (*quench*) qui peut dépendre de la présence dans la fiole de molécules colorées ou de d'autres molécules qui absorbent les photons. Pour ces raisons, les tissus à analyser ont dû être solubilisés dans de l'hydroxide de tétraéthylammonium avant d'être analysés. Le sang a dû être

préalablement décoloré dans du peroxyde d'hydrogène (30% poids/volume) suite à une solubilisation. Les échantillons de plasma ont pu être directement combinés au fluide à scintillation.

La technique du comptage par scintillation liquide possède de grands avantages qui se sont avérés très utiles pour les recherches présentées dans cette thèse compte tenu du nombre élevé de tissus à analyser (s'estimant à plus de 3000 tissus). Ces avantages incluent la facilité de préparation des échantillons et la possibilité d'analyser rapidement une grande quantité d'échantillons. De plus, le comptage par scintillation liquide avec ses limites de détection extrêmement basses, permet la mesure de très faibles émissions de radioactivité tel le rayonnement bêta émis par l'isotope du tritium.

#### **2.2.2.2 Résultats quantitatifs**

Tous les tissus analysés dans le cadre des études animales discutées dans cet ouvrage ont été pesés suite à leur collection. Étant donné que le poids du tissu analysé (lorsqu'il est entier) ou le poids relatif au poids total du tissu (lorsqu'une portion du tissu est comptée) était connu, des résultats de dpm total ou par gramme de tissu ont été calculés par comptage par scintillation liquide. Les résultats obtenus en

dpm ont été par la suite convertis en microcuries ( $\mu\text{Ci}$ ) selon la notion qu'un dpm correspond à  $2.22 \times 10^6 \mu\text{Ci}$ . Les résultats en microcuries par gramme de tissu ( $\mu\text{Ci/g}$ ) ont par la suite été convertis en microgrammes-équivalent de dompéridone par gramme de tissu ( $\mu\text{g eq/g}$ ) en se basant sur l'activité spécifique du  $^3\text{H}$ -dompéridone ( $1.13 \times 10^5 \mu\text{Ci/mg}$ ).

La validité des résultats obtenus par comptage par scintillation liquide a été vérifiée selon différents paramètres. Un standard interne fut inclus pour chaque analyse et son résultat en dpm comparé à son résultat anticipé avec un niveau d'acceptation de  $\pm 5\%$ . Une fiole contenant du fluide à scintillation sans échantillon (*background*) fut également incluse pour chaque analyse et son résultat devait correspondre à un compte inférieur à 70 dpm puisque le tritium était l'isotope utilisé. Une valeur de chémoluminescence a été également obtenue pour chaque échantillon et devait être inférieure à 10%. Le *quench* fut également vérifié pour chaque échantillon.

### **2.2.3 Autoradioluminographie sur corps entier**

Cette technique d'autoradioluminographie sur corps entier (*whole-body autoradioluminography*) implique dans un premier temps la collection de coupes

sagittales d'un animal administré d'un composé radiomarqué. Dans un deuxième temps, ces coupes sont exposées à des plaques de phosphore sensibles à l'émission de radioactivité pour obtenir des images illustrant la distribution de radioactivité associée au composé radiomarqué dans les organes du corps entier.

Pour ce faire, chaque animal administré avec le  $^3\text{H}$ -dompéridone et euthanasié à son temps respectif fut gelé très rapidement dans un mélange de glaces sèches ( $\text{CO}_2$ ) et d'hexane représentant une température de  $-70^\circ\text{C}$ . Par la suite, les carcasses d'animaux furent enrobées dans du carboxyméthylcellulose 2% et le tout subséquemment gelé pour obtenir un bloc solide. Chaque bloc contenant une ou des carcasses fut sectionné à l'aide d'un cryomicrotome pour obtenir des coupes d'une épaisseur de  $30\ \mu\text{m}$  à différents niveaux de façon à obtenir les organes d'intérêt. Les coupes ont été prélevées à l'aide d'un ruban adhésive d'une largeur suffisante et ont été par la suite lyophilisées dans le cryomicrotome avant d'être exposées à des plaques de phosphores spécifiques pour le tritium.

Chaque coupe lyophilisée fut mise en contact avec une plaque de phosphore dans une cassette hermétique à la lumière pour cinq jours. Les cassettes ont été placées dans une boîte de plomb de façon à réduire le bruit de fond et améliorer le signal. Lorsque exposés à une émission de radioactivité, les cristaux de phosphore

photosensibles ( $\text{BaFBr:Eu}^{2+}$ ) contenus dans les plaques de phosphore emmagasinent l'énergie provenant de l'émission de radioactivité. Au terme de la durée d'exposition, les plaques de phosphore furent balayées par un faisceau laser d'un scanner et l'énergie emmagasinée convertie de façon proportionnelle en luminescence. Cette luminescence fut par la suite convertie en un signal électrique par un tube photomultiplicateur permettant l'obtention d'une image illustrant la distribution de la radioactivité associée au  $^3\text{H}$ -dompéridone.

#### 2.2.3.1 Validation

Bien que dans le cadre des études présentées dans cette thèse des données quantitatives aient été obtenues pour quelques temps spécifiques ces résultats n'ont pas été présentés dû à la disponibilité des données quantitatives par comptage par scintillation liquide obtenus pour tous les temps d'analyse. Les données qualitatives, représentées par des autoradioluminogrammes illustrant la distribution de  $^3\text{H}$ -dompéridone, furent incluses dans cette thèse. La technique d'autoradioluminographie sur corps entier a dû préalablement être validée pour certains paramètres tels que: l'homogénéité de l'épaisseur des coupes collectées (intra-coupe et inter-coupes) pour le cryomicrotome; et la linéarité de la réponse en fonction des concentrations de radioactivité et l'homogénéité de la réponse intra-plaque et inter-plaques de phosphore pour le scanner et son logiciel d'analyse.



## 2.2.4 Micro-autoradiographie

La technique de micro-autoradiographie permet d'investiguer la distribution de radioactivité associée au composé radiomarqué à des structures plus petites non visible par autoradioluminographie sur corps entier. Cette technique a consisté dans un premier temps au transfert sur une lame de verre de coupes collectées à l'aide d'un cryomicrotome incluant le myocarde de souris préalablement gelées dans un mélange de glaces sèches (CO<sub>2</sub>) et d'hexane (-70°C) et enrobées dans du carboxyméthylcellulose 2%. Les lames de verre incluant le cœur de souris préalablement administrées avec le <sup>3</sup>H-dompéridone ont été par la suite trempées dans une émulsion photographique et gardées dans une boîte hermétique à la lumière pour une durée d'exposition de deux semaines. Par la suite, les lames contenant l'émulsion furent développées et fixées par l'utilisation de deux solutions. Les lames de verre contenant les structures d'intérêt furent par la suite colorées à l'aide des colorants éosine et hématoxyline et examinées par microscopie électronique par un pathologiste pour évaluer la distribution des grains d'argent dans les structures du cœur. La distribution des grains d'argent correspondait donc à la distribution de radioactivité associée au <sup>3</sup>H-dompéridone. L'apparition des grains d'argent est la résultante de l'interaction de l'émission de radioactivité et des cristaux de bromide d'argent en suspens dans l'émulsion. Cette technique a engendré des résultats

qualitatifs et sont représentés par une illustration de la distribution des grains d'argent.

## **2.2.5 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) avec détection radiométrique**

### **2.2.5.1 Principes de base de la technique de HPLC**

La technique de HPLC est utilisée pour la séparation de molécules d'un mélange homogène de différents produits. Un fluide appelé phase mobile parcourt une colonne qu'on appelle la phase stationnaire. Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne. Par les propriétés de la phase stationnaire et mobile, les constituants du mélange à séparer sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne. Les constituants, étant élués de la colonne les uns après les autres, donc à un temps de rétention différent deviennent séparés. Étant donné que l'échantillon à analyser est poussé dans la colonne par la phase mobile créant une certaine pression, les composants présents n'ont pas le temps de diffuser dans la colonne ce qui produit des pics étroits et une bonne séparation. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un chromatogramme. L'enregistrement d'un pic sur le chromatogramme correspond donc au passage d'un composé séparé.

Pour les expériences décrites dans cette thèse, la technique de HPLC a été effectuée en phase inverse. C'est-à-dire que la phase stationnaire, soit la colonne, consistait en un milieu apolaire composé de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbones (C<sub>18</sub>). La phase mobile consistait donc à un éluant polaire et ce sont les composés polaires qui étaient élués en premier.

#### 2.2.5.2 Détecteur radiométrique

Le principe de détection des métabolites radioactifs par un détecteur radiométrique utilise des principes similaires au comptage par scintillation liquide et consiste en un échantillon qui s'écoule plutôt qu'à un échantillon transféré dans une fiole. L'échantillon à analyser se combine avec un fluide à scintillation. Le fluide à scintillation au contact de l'émission de radioactivité produit une scintillation qui est convertie en photons (ondes de la région visible du spectre électromagnétique) captés par les tubes photomultiplicateurs. Le tube photomultiplicateur consiste en une photocathode, qui est la composante photosensible, ainsi qu'un multiplicateur d'électrons. La photocathode émet des électrons lorsque exposée à la lumière. Le nombre d'électrons émis est proportionnel au nombre de photons reçus. Le multiplicateur d'électrons amplifie le nombre d'électrons résultant de chaque

scintillation pour produire un signal électrique qui est représentatif du nombre de photons libérés pendant la scintillation. Par conséquent, la magnitude de la rafale d'électrons émise par le tube photomultiplicateur est proportionnelle aux nombres de photons libérés pendant la scintillation et donc proportionnelle à l'émission de radioactivité.

### 2.2.5.3 Calibration

Avant de procéder à l'analyse des échantillons pour lesquels les résultats sont rapportés dans cette thèse, quelques tests furent effectués. Tout d'abord une solution de  $^3\text{H}$ -dompéridone fut combinée à un volume de phase mobile et analysée par le système de HPLC avec détection radiométrique pour déterminer le temps de rétention de la substance mère et pour optimiser les conditions chromatographiques. De plus, une solution de  $^3\text{H}$ -dompéridone fut incorporée à un homogénat de foie de souris provenant d'un animal non traité. Les protéines furent précipitées à l'aide d'acétonitrile et l'échantillon centrifugé. Le surnageant fut par la suite filtré avant d'être analysé. Le but de ce test était de confirmer que l'influence du tissu n'affecte pas le comportement chromatographique du dompéridone, c'est-à-dire son temps de rétention. Dans un troisième temps, un échantillon de foie d'une souris administrée de  $^3\text{H}$ -dompéridone, préparé tel que décrit ci-dessus, fut analysé pour confirmer les conditions optimales.

L'échantillon de  $^3\text{H}$ -dompéridone dilué dans la phase mobile était injecté à trois reprises au début et à la fin de chaque série d'analyse d'échantillons des études pour vérifier la réponse et la reproductibilité du système HPLC (*system suitability and reproducibility*). Entre les trois analyses du début, les résultats du nombre total de dpm obtenus dans le chromatogramme devaient correspondre à un coefficient de variation inférieur ou égal à 5%, de même que pour les trois analyses effectuées à la fin de la série d'analyse d'échantillons. De plus, la différence entre les résultats moyens obtenus pour les analyses du début et de la fin devait correspondre à un pourcentage de différence inférieur ou égal à 15%.

## 2.3 Conclusion

Les techniques utilisées dans cet ouvrage ont permis d'évaluer le rôle des transporteurs ABC, telle que la P-gp, dans la distribution du  $^3\text{H}$ -dompéridone dans un grand nombre de tissus avec un intérêt particulier au niveau du cœur. Ces techniques nous ont permis également d'évaluer l'effet de pré-traitements au vérapamil sur la distribution cardiaque et tissulaire du  $^3\text{H}$ -dompéridone. Les objectifs de cette thèse ont été remplis par l'utilisation de ces techniques. Il est à noter que les techniques décrites dans cette section et utilisées dans le cadre des recherches incluses dans cette

thèse furent préalablement validées selon les normes des bonnes pratiques de laboratoire (*good laboratory practice*) et que les manipulations furent effectuées également dans l'esprit de ces normes.

## **CHAPITRE III**

**Étude du rôle de la P-gp sur la distribution du  
dompéridone au cœur et autres tissus par l'utilisation  
de souris mutées pour le gène codant pour la P-  
glycoprotéine**

### **3.1 Involvement of P-glycoprotein in the distribution of domperidone to the heart and other tissues in mice**

Involvement of P-Glycoprotein in the Distribution of Domperidone to the Heart and Other Tissues in Mice

Lucie Couture, John A. Nash, Linh Nguyen, and Jacques Turgeon

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Québec, Canada (L.C., J.T.); and Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal, Senneville, Québec, Canada (L.C., L.N., J.A.N)

Running title: P-glycoprotein and tissue distribution of domperidone

Corresponding author: Jacques Turgeon, Ph.D.


Faculté de pharmacie, Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Phone: 514-343-7270

Fax: 514-343-2098

e-mail: 



AUC<sub>0-tlast</sub>, area under the concentration-time curve from time 0 to the last time point;  
C<sub>max</sub>, peak concentration; HPLC, high-performance liquid chromatography; T<sub>max</sub>,  
time at which the maximal concentration was determined; WBA, whole-body  
autoradioluminography

### 3.1.1 Résumé

Objectif: La P-glycoprotéine (P-gp) agit comme une protéine d'efflux pour transporter les médicaments du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. La P-gp est codée par le gène *MDR1* chez l'humain et par les gènes *mdr1a* et *mdr1b* chez les rongeurs. L'objectif de cette étude était d'évaluer si l'activité de la P-gp pouvait moduler la distribution du dompéridone aux tissus, et plus particulièrement au cœur. Cette information pourrait contribuer à une meilleure compréhension des cardiotoxicités (syndrome du Long QT) associées avec la prise du dompéridone.

Méthodes: Le [<sup>3</sup>H]dompéridone a été administré (5 mg/kg) de façon intraveineuse à trente souris *mdr1a* (-/-) et à trente souris normales de type FVB. Les animaux ont par la suite été sacrifiés à six différents temps jusqu'à 120 min post-administration. Les structures du cœur et environ vingt-cinq tissus ont été prélevés et analysés par comptage par scintillation liquide pour déterminer la radioactivité associée au [<sup>3</sup>H]dompéridone. De l'autoradioluminographie sur corps entier (*whole-body autoradioluminography* ou *WBA*) a été effectué sur certains animaux et du HPLC avec détection radiométrique a également été réalisé sur certains animaux pour évaluer les niveaux de dompéridone versus les métabolites dans quelques tissus.

Résultats: Des niveaux significativement plus élevés de radioactivité associée au [<sup>3</sup>H]dompéridone ont été observés dans les ventricules du cœur, le cerveau, les poumons, les ganglions lymphatiques, les muscles squelettiques, la peau, les

testicules, et pour les parois et le contenu du gros intestin entre les souris *mdr1a* (-/-) et les souris normales ( $p < 0.05$ ). Les ventricules gauche et droit des souris *mdr1a* (-/-) ont présentés des niveaux plus importants (une augmentation jusqu'à 28%) comparés aux souris normales ( $p < 0.01$ ). Conclusion: Le transporteur P-gp semble jouer un rôle dans la modulation de la distribution du dompéridone pour plusieurs tissus incluant le coeur.

### 3.1.2 Abstract

Objective: P-glycoprotein (P-gp) acts as an efflux protein to extrude drugs from the intracellular milieu. P-gp is encoded by *MDR1* in humans and by *mdr1a* and *mdr1b* in rodents. The objective of our study was to determine whether P-gp activity modulates distribution of domperidone to tissues, and in particular to the heart. This information could provide a better understanding of cardiotoxicity (Long QT syndrome) observed with domperidone. Methods: [ $^3\text{H}$ ]Domperidone (5 mg/kg) was administered intravenously to thirty *mdr1a* (-/-) and thirty wild-type FVB mice. Animals were sacrificed at six different time points up to 120 min post-dose. Heart structures and approximately twenty-five tissues were excised and processed by liquid scintillation spectroscopy to determine  $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity levels. Whole-body autoradioluminography (WBA) was also performed on selected animals and HPLC with radiometric detection was used to assess levels of

domperidone vs metabolites in some tissues. Results: Significantly higher levels of  $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity were observed in heart ventricles, brain, lungs, lymph nodes, skeletal muscle, skin, testes, and large intestine wall and contents of *mdr1a* (-/-) vs wild-type mice ( $p < 0.05$ ). Left and right cardiac ventricles of *mdr1a* (-/-) mice had greater levels (up to 28% increase) compared to wild-type mice ( $p < 0.01$ ). Conclusion: The P-gp transporter appears to have a modulatory role in the distribution of domperidone to several tissues including the heart.

### 3.1.3 Introduction

Domperidone (5-chloro-1-[1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidinyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one) is used clinically as an antiemetic agent. Its antiemetic action is due to blockade of peripheral dopamine receptors (Van Nueten et al., 1978). Domperidone does not cross the blood-brain barrier to any appreciable degree and so exerts relatively little effects on cerebral dopaminergic receptors (Brogden et al., 1982; Prakash and Wagstaff, 1998; Barone, 1999). Domperidone is used in many countries but has never been approved by the FDA for the USA market. Indeed, severe adverse cardiac effects including prolongation of the QT interval, ventricular arrhythmias and cardiac arrest were associated with the early use of domperidone (Osborne et al., 1985; Bruera et al., 1986). A block of the rapid component of the delayed-rectifier potassium current ( $I_{Kr}$ ) in a concentration dependent manner has been proposed to explain domperidone-induced cardiac toxicities (Drolet et al., 2000). Since the binding site for blockade of  $I_{Kr}$  is intracellular (Zou et al., 1997; Zhang et al., 1999; Mitcheson et al., 2000), the cardiac intracellular concentration of domperidone may represent a key determinant of drug action and toxicities.

P-gp is a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily that comprises around fifty members. As these transporters are ATP-dependent

efflux proteins, ATP hydrolysis is required to translocate substrates against a concentration gradient from the intracellular toward the extracellular regions. Whereas humans have only one type of drug-transporting P-gp protein, encoded by the *ABCB1* gene (also called *MDR1*), mice have two, *mdr1a* (also called *mdr3*) and *mdr1b* (also called *mdr1*) (Schinkel, 1997). It is suggested that the two P-gp isoforms in mice fulfill the same function as the single MDR1 in humans (Schinkel, 1997). This protein thought at first to be confined to tumor cells, associated with an acquired resistance to anticancer drugs, was subsequently found to be located in normal tissues such as at the apical surface of liver hepatocytes, in proximal tubular cells of kidneys and in enterocytes of intestines (Thiebaut et al., 1987; Gatmaitan and Arias, 1993; Hunter et al., 1993a,b; Terao et al., 1996). This suggested a physiologic function for P-gp in the detoxification of the organism by excreting its substrates into bile, urine and intestine contents. Therefore, given the importance of these tissues in drug absorption, metabolism and excretion, it was rapidly conceived that P-gp could have an important influence on disposition of drugs that were P-gp substrates. Expression of P-gp and other ABC transporters has been reported in other tissues including the myocardium (Couture et al., 2006).

The primary objective of our study was to characterize the modulatory role of P-gp on the tissue distribution of domperidone, a well known P-gp substrate based on *in vitro* data (Schinkel et al., 1996; El Ela et al., 2004; Faassen et al., 2003), by the

use of mutated (*mdr1a* (-/-)) mice, which are deficient in one isoform of the gene coding for P-gp, following a single intravenous administration of [<sup>3</sup>H]domperidone. In particular, our objective was to characterize the role of P-gp in the distribution of domperidone to the heart.

### **3.1.4 Methods**

#### **3.1.4.1 Chemicals**

Unlabeled domperidone was purchased from MP Biomedicals (Aurora, OH). The purity of domperidone was 99.7% by HPLC. [<sup>3</sup>H]domperidone (Fig. 1) was synthesized at Perkin Elmer (Boston, MA) by the reduction of a brominated precursor obtained from the bromination of domperidone. The specific activity of [<sup>3</sup>H]domperidone was 48.3 Ci/mmol (113 mCi/mg) with a radiochemical purity >98% as determined by HPLC with radiometric detection. Hionic fluor was obtained from Perkin Elmer (Boston, MA). All other chemicals were of analytical grade appropriate for HPLC.

### 3.1.4.2 Animals

Adult male FVB wild-type (FVB/Ntac) and FVB *mdr1a* (-/-) (FVB.129P2-*Abcb1a*<sup>tm1Bor</sup>N7) mice were received from Taconic (Germantown, NY) and were acclimated to the laboratory environment for at least 1 week prior to treatment. On the day of treatment, the FVB *mdr1a* (-/-) mice and FVB wild-type mice were 12 weeks and 10 to 13 weeks of age, respectively. Environmental conditions during the study conduct were controlled at a temperature and relative humidity of  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  and  $50 \pm 20\%$ , respectively. The photoperiod was 12 hours light and 12 hours dark except when interrupted due to scheduled activities. All animals had free access to a standard certified pelleted commercial laboratory diet (PMI Certified Rodent Chow 5002: PMI Nutrition International) and tap water except during designated procedures. The research was in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Research Council (NRC publication, revised 1996).

### 3.1.4.3 Confirmation of genotypes

Livers from wild-type and *mdr1a* (-/-) mice were homogenized in water (2 w/v) and homogenates kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Approximately 15 mg of liver homogenates were weighed and DNA isolated using a DNA Isolation Kit from Genra Systems



(Plymouth, MN). Primers designed against exon 6, where deletion in *mdr1a* gene is located for *mdr1a* (-/-) mice, were used for PCR reactions. Primers *mdr1a5f* (5'-GTACGCCTACTATTACACCGGGAT-3') and *mdr1a6r* (5'-CTTTGCCCAAATACCAGCTGA-3') were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Electrophoresis of 25  $\mu$ L of the PCR reaction (including 1  $\mu$ L containing approximately 150 ng of cDNA) was performed using 1% agarose gel. Following migration, bands were compared under UV light to the standard (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Applied Science Indianapolis, IN) and examined for the presence or absence of the 1100 bp band corresponding to exon 6 of the *mdr1a* gene. In order to verify the presence of *mdr1a* gene following the isolation of DNA from liver homogenates, primers *mdr1a5f* (5'-GTACGCCTACTATTACACCGGGAT-3') and *mdr1a5r* (5'-TCTGTGAGCCGGGTGTTGTGCT-3') targeting exon 5 were used in a PCR reaction and products separated by 1% agarose electrophoresis.

#### 3.1.4.4 Dose formulation

The [ $^3$ H]domperidone dose formulation was prepared by combining radiolabeled and unlabeled test articles in vehicle (0.005 M lactic acid in saline) to achieve a target concentration of 0.385 mg/mL and a target radioactivity concentration of 103  $\mu$ Ci/mL. The dose formulation was prepared in order to deliver

a dose level of 5 mg/kg of domperidone and a radioactivity level of 45  $\mu\text{Ci}$  per animal in a dose volume of 13 mL/kg.

#### **3.1.4.5 Dose administration**

Five animals per time point/genotype were administered [ $^3\text{H}$ ]domperidone dose formulation by intravenous injection *via* the tail vein using an Abbocath®. The dose delivered to each animal was calculated gravimetrically on the basis of the net weight of dosage formulation expelled from the syringe, the level of radioactivity recovered in the Abbocath®, and on the basis of the radioactivity concentration in the dose formulation.

#### **3.1.4.6 Study design**

Four animals per time point/genotype (3 animals per time point/genotype for liquid scintillation spectroscopy analysis and 1 animal per time point/genotype for HPLC analysis) were euthanised by exsanguination under isoflurane anesthesia and blood collected from the abdominal aorta at 4, 7, 15, 30, 60 and 120 min post-dose. Plasma was obtained from blood after centrifugation. Twenty-seven structures and organs were collected from each animal. One animal per time point/genotype was

euthanised at 2, 7, 15, 30, 60 and 120 min post-dose by an intravenous injection of Euthanyl® (approximately 200 mg/kg) into the tail vein and prepared for WBA.

### **3.1.4.7 Liquid scintillation spectroscopy**

Duplicate aliquots of whole blood (50 µL) were sampled for radioactivity analysis. The remainder was centrifuged at 3500 rpm (approximately 2000 g) and 4°C for approximately 10 minutes within 60 minutes of collection. Duplicate aliquots of plasma (50 µL) were sampled for radioactivity analysis. Whole blood was solubilized (with Soluene-350, Boston, MA), decolorized and mixed with liquid scintillation fluid (10 mL) for radioactivity measurement. Plasma was mixed directly with liquid scintillation fluid. Whole tissues were processed by solubilization in 35% tetraethylammonium hydroxide (Perkin Elmer, Boston, MA) (except for liver which was homogenized in water (2 w/v)) and the solubilized samples, or duplicate aliquots were then mixed with liquid scintillation fluid for radioactivity measurement. Large intestine contents were homogenized in a known volume of water. Duplicate weighed aliquots (50 µL) of large intestine content homogenates, stomach contents and small intestine contents were solubilized in 35% tetraethylammonium hydroxide and mixed with liquid scintillation fluid for radioactivity measurement. [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity was measured using a Wallac scintillation counter (model 1414) and the software WinSpectral version 2.0 (Perkin Elmer,

Turku, Finland). Duplicate aliquots of each sample were counted for 5 minutes or to a two-sigma error of 0.1%, whichever occurred first. All counts were converted to absolute radioactivity (dpm) by automatic quench correction based on the shift of the spectrum for the external standard.

#### **3.1.4.8 Whole-body autoradioluminography (WBA)**

Following euthanasia, selected animals were prepared for WBA as described by Ullberg (1977). Carcasses were deep frozen in a mixture of hexane and dry ice for 10 minutes and then embedded in 2% CMC medium. The animal specimen block was sectioned using the Leica CM 3600 cryomicrotome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) to obtain 30  $\mu\text{m}$  sagittal sections. Sections were freeze-dried and then exposed to tritium imaging plates (Fuji Medical Systems, Stamford, CT) for 5 days in a lead box to minimise background radiation artefacts. Following exposure, the imaging plates were read by the Fuji BAS-2500 scanner using the Fuji Image Reader software version 1.1. (Fuji Medical Systems, Stamford, CT).

### 3.1.4.9 HPLC with radiometric detection

Following euthanasia, left ventricle of heart, liver, brain and kidney from selected animals were homogenized in ultra pure water (1.5 w/v). Proteins were precipitated from the above samples and plasma by the addition of an equal volume of acetonitrile and centrifuged for 10 min at 4°C. The supernatant was filtered using a 0.45 µm nylon membrane prior to analysis of a 40 µL aliquot by HPLC 1100 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with radiometric detection (Canberra Packard 500TR Scintillation Flow Analyzer, Meriden, CT). The radiolabeled parent drug and metabolites were separated using a Phenomenex C<sub>18</sub> column, 250 x 4.6 mm (5 µm particle size) (Torrance, CA) operated at 30°C using methanol, acetonitrile and 0.01 M disodium citrate pH 3.4 (35:10:55 v/v) containing 1.5 mL/L of triethylamine as the mobile phase A, and methanol as the mobile phase B. The mobile phases were delivered as a gradient: 100:0 (A:B) from 0 to 1 min, then 40:60 (A:B) from 7 to 12 min, and 100:0 (A:B) from 15 to 20 min at a flow rate of 1 mL/min. The liquid scintillation fluid was delivered at a flow rate of 3 mL/min. Data were acquired by Millennium software version 4.0 (Waters, Milford, MA) and processed with Flo-One software version 3.60 (Perkin Elmer, Boston, MA).

#### 3.1.4.10 Data analysis

All radioactivity measurements were entered into a standard computer database program (Debra version 5.2) for the calculation of concentrations of radioactivity. Blood, plasma and tissue concentrations of radioactivity in dpm/g or  $\mu\text{Ci/g}$  were expressed as mass eq/g on the basis of the measured specific activity (dpm/mg) of radiolabeled and unlabeled domperidone in the dose formulation. Non-compartmental disposition kinetics ( $t_{\text{max}}$ ,  $C_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}_{0\text{-tlast}}$ ) of radioactivity in blood, plasma and tissues was determined using Winnonlin version 3.2 (Pharsight Corporation, Cary, NC).  $T_{\text{max}}$  and  $C_{\text{max}}$  parameters were observed values. The  $C_{\text{max}}$  was back-extrapolated to time 0 h for plasma and the  $\text{AUC}_{0\text{-tlast}}$  was calculated by application of the trapezoidal rule (Gibaldi and Perrier, 1982).

#### 3.1.4.11 Statistical methods

Statistical analysis was performed on liquid scintillation spectroscopy data for the concentrations and percent of dose of [ $^3\text{H}$ ]domperidone-related radioactivity in plasma and tissues, and gastrointestinal contents, respectively. A parametric two-way analysis of variance (ANOVA) defined by the factors time and group was performed. Only statistical results related to the factor group are presented in this paper and relevant to the objective of the study. The statistical analysis was conducted using

release 8.1 of the SAS/STAT module. All tests were conducted at the 0.05 level of significance. The initial assessment of variance homogeneity using the Levene test was performed prior to the ANOVA. When variances were heterogeneous, a heteroscedastic two-way ANOVA model implemented using the mixed procedure of SAS/STAT was performed.

### 3.1.5 Results

#### 3.1.5.1 Confirmation of genotype

PCR of *mdr1a* exon 6 was carried out on liver DNA from wild-type and *mdr1a* (-/-) mice and the products separated by 1% agarose electrophoresis. A photograph of an electrophoresis gel presenting the results for a sample of three wild-type and three *mdr1a* (-/-) mice is shown in Figure 2. As expected, a band corresponding to 1100 bp was present for wild-type mice, but was absent for *mdr1a* (-/-) mice which confirmed the assigned genotype of the mice. Moreover, in order to confirm that the absence of the 1100 bp band for *mdr1a* (-/-) mice was not due to an absence of *mdr1a* DNA or a poor DNA quality, PCR amplifying *mdr1a* exon 5 followed by electrophoresis analysis was conducted. This demonstrated the presence of *mdr1a* DNA for all mice (data not shown).

### 3.1.5.2 General tissue distribution and pharmacokinetics of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity

Following single intravenous injection of [<sup>3</sup>H]domperidone, radioactivity was rapidly distributed into tissues of both mouse genotypes. The highest concentrations of radioactivity and/or largest AUC<sub>0-last</sub> were obtained in the kidneys, liver, lungs, heart and small intestine wall (Tables 1 and 2). The lowest concentrations were found in the spinal cord, eyes, brain, skin and testes. The highest total radioactivity concentrations observed (C<sub>max</sub>) for well perfused organs such as kidneys, liver, lungs and heart occurred at the first time point of 4 min (Table 1). Autoradioluminograms of sagittal sections from animals euthanized at 2 min post-dose confirm the rapid distribution of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity into tissues and demonstrated a distribution to glandular tissues such as Harderian, salivary and pituitary glands (Fig. 3A). For both mouse genotypes, the blood to plasma ratios ranged between 0.84 and 0.91 for the study duration, indicating that radioactivity was mainly associated with the plasma and not the blood cell components. Higher concentrations of radioactivity compared to plasma were observed in highly perfused organs. Radioactivity concentrations in the gall bladder and intestine contents suggested that biliary elimination was a substantial route of elimination (Table 2, Fig. 3A). Concentrations of radioactivity in kidneys obtained by liquid scintillation spectroscopy and levels visualized in urinary bladder from autoradioluminograms demonstrated that urinary



excretion contributed to the elimination of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity (Table 1, Fig. 3A).

Table 1: Mean concentrations  $\pm$  SEM ( $\mu\text{g eq/g}$ ) in blood, plasma and tissues of male wild-type and *mdr1a* (-/-) mice following an intravenous administration of [ $^3\text{H}$ ]domperidone.

Tissue	Genotype	Time point (min)						AUC <sub>0-1last</sub> ( $\mu\text{g eq}\cdot\text{min/g}$ )
		4	7	15	30	60	120	
Plasma	wild-type	3.06 $\pm$ 0.15	2.48 $\pm$ 0.08	2.23 $\pm$ 0.07	1.87 $\pm$ 0.04	1.77 $\pm$ 0.01	1.85 $\pm$ 0.07	240
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.73 $\pm$ 0.01	2.42 $\pm$ 0.03	1.97 $\pm$ 0.16	2.04 $\pm$ 0.03	1.91 $\pm$ 0.06	1.98 $\pm$ 0.01	248
	Ratio <sup>a</sup>	0.89	0.98	0.88	1.09	1.08	1.07	1.03
Blood	wild-type	2.78 $\pm$ 0.11	2.20 $\pm$ 0.06	1.94 $\pm$ 0.06	1.62 $\pm$ 0.04	1.56 $\pm$ 0.01	1.60 $\pm$ 0.11	215
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.48 $\pm$ 0.01	2.18 $\pm$ 0.02	1.78 $\pm$ 0.14	1.73 $\pm$ 0.02	1.67 $\pm$ 0.04	1.67 $\pm$ 0.02	220
	Ratio <sup>a</sup>	0.89	0.99	0.92	1.07	1.07	1.04	1.02
Bone femur	wild-type	2.65 $\pm$ 0.21	2.51 $\pm$ 0.22	2.34 $\pm$ 0.24	1.60 $\pm$ 0.13	1.18 $\pm$ 0.13	1.10 $\pm$ 0.08	172
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.42 $\pm$ 0.05	2.70 $\pm$ 0.02	2.39 $\pm$ 0.21	2.02 $\pm$ 0.25	1.31 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.05	180
	Ratio <sup>a</sup>	0.91	1.08	1.02	1.26	1.11	0.75	1.04
Brain***	wild-type	0.88 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.06	1.10 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.02	1.42 $\pm$ 0.04	1.52 $\pm$ 0.05	157
	<i>mdr1a</i> (-/-)	0.90 $\pm$ 0.03	1.11 $\pm$ 0.02	1.32 $\pm$ 0.04	1.56 $\pm$ 0.03	1.72 $\pm$ 0.05	1.72 <sup>b</sup>	180
	Ratio <sup>a</sup>	1.02	1.28	1.20	1.29	1.21	1.13	1.15
Eyes	wild-type	1.17 $\pm$ 0.09	1.22 $\pm$ 0.02	1.45 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.13	1.36 $\pm$ 0.07	1.74 $\pm$ 0.05	168
	<i>mdr1a</i> (-/-)	1.11 $\pm$ 0.05	1.45 $\pm$ 0.15	1.29 $\pm$ 0.11	1.50 $\pm$ 0.04	1.46 $\pm$ 0.11	1.28 $\pm$ 0.09	165
	Ratio <sup>a</sup>	0.95	1.19	0.89	1.24	1.07	0.74	0.98
Heart atriums	wild-type	14.32 $\pm$ 0.65	8.44 $\pm$ 1.09	4.46 $\pm$ 0.67	2.13 $\pm$ 0.25	1.14 $\pm$ 0.15	1.09 $\pm$ 0.22	280
	<i>mdr1a</i> (-/-)	12.04 $\pm$ 0.64	8.09 $\pm$ 0.62	4.62 $\pm$ 0.75	3.26 $\pm$ 0.64	1.58 $\pm$ 0.19	0.99 $\pm$ 0.09	314
	Ratio <sup>a</sup>	0.84	0.96	1.04	1.53	1.39	0.90	1.12
Heart left ventricle**	wild-type	11.31 $\pm$ 0.87	9.22 $\pm$ 0.38	5.25 $\pm$ 0.28	2.78 $\pm$ 0.21	1.67 $\pm$ 0.04	1.52 $\pm$ 0.15	334
	<i>mdr1a</i> (-/-)	13.28 $\pm$ 0.57	10.69 $\pm$ 0.92	6.65 $\pm$ 0.83	3.56 $\pm$ 0.07	1.95 $\pm$ 0.18	1.34 <sup>b</sup>	390
	Ratio <sup>a</sup>	1.17	1.16	1.27	1.28	1.17	0.88	1.17
Heart right ventricle**	wild-type	10.02 $\pm$ 0.45	9.22 $\pm$ 0.47	4.86 $\pm$ 0.16	2.71 $\pm$ 0.12	1.39 $\pm$ 0.04	1.09 $\pm$ 0.07	300
	<i>mdr1a</i> (-/-)	12.64 $\pm$ 0.45	9.77 $\pm$ 0.71	5.54 $\pm$ 0.34	3.33 $\pm$ 0.34	1.75 $\pm$ 0.17	1.12 $\pm$ 0.24	349
	Ratio <sup>a</sup>	1.26	1.06	1.14	1.23	1.26	1.03	1.16
Kidneys	wild-type	30.44 $\pm$ 3.07	23.49 $\pm$ 0.96	13.84 $\pm$ 0.80	7.96 $\pm$ 0.63	3.61 $\pm$ 0.17	2.39 $\pm$ 0.31	808
	<i>mdr1a</i> (-/-)	27.31 $\pm$ 0.98	21.40 $\pm$ 0.78	13.43 $\pm$ 0.79	7.74 $\pm$ 0.30	4.08 $\pm$ 0.40	2.43 <sup>b</sup>	798
	Ratio <sup>a</sup>	0.90	0.91	0.97	0.97	1.13	1.02	0.99
Liver	wild-type	22.10 $\pm$ 1.42	17.79 $\pm$ 0.89	11.50 $\pm$ 0.27	6.28 $\pm$ 0.39	3.58 $\pm$ 0.17	2.74 $\pm$ 0.35	692
	<i>mdr1a</i> (-/-)	19.42 $\pm$ 1.10	18.20 $\pm$ 0.56	11.48 $\pm$ 1.21	6.73 $\pm$ 0.04	4.35 $\pm$ 0.42	2.75 $\pm$ 0.14	730
	Ratio <sup>a</sup>	0.88	1.02	1.00	1.07	1.22	1.00	1.05
Lungs***	wild-type	13.71 $\pm$ 0.24	11.86 <sup>b</sup>	9.38 $\pm$ 0.76	6.43 $\pm$ 0.11	4.03 $\pm$ 0.60	2.05 <sup>b</sup>	609
	<i>mdr1a</i> (-/-)	16.52 $\pm$ 0.06	12.53 $\pm$ 0.48	10.57 $\pm$ 0.44	7.83 $\pm$ 0.54	4.38 $\pm$ 0.29	2.46 $\pm$ 0.09	695
	Ratio <sup>a</sup>	1.20	1.06	1.13	1.22	1.09	1.2	1.14
Lymph nodes (mesenteric) *	wild-type	3.72 $\pm$ 0.16	3.78 $\pm$ 0.02	3.26 $\pm$ 0.26	2.72 $\pm$ 0.14	1.90 $\pm$ 0.19	1.53 $\pm$ 0.08	264
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.98 $\pm$ 0.15	3.71 $\pm$ 0.35	3.66 $\pm$ 0.28	3.42 $\pm$ 0.09	2.69 $\pm$ 0.20	1.88 $\pm$ 0.10	327
	Ratio <sup>a</sup>	0.80	0.98	1.12	1.26	1.42	1.23	1.24
Pancreas	wild-type	10.84 $\pm$ 0.65	11.45 $\pm$ 0.45	9.36 $\pm$ 0.17	6.24 $\pm$ 0.56	2.73 $\pm$ 0.19	1.62 $\pm$ 0.14	520
	<i>mdr1a</i> (-/-)	9.51 <sup>b</sup>	10.56 $\pm$ 0.54	9.31 $\pm$ 0.75	5.55 $\pm$ 0.33	2.32 $\pm$ 0.24	1.59 $\pm$ 0.11	475
	Ratio <sup>a</sup>	0.88	0.92	0.99	0.89	0.85	0.98	0.91
Prostate gland	wild-type	3.14 $\pm$ 0.39	3.22 $\pm$ 0.21	3.43 $\pm$ 0.81	2.45 $\pm$ 0.48	1.94 $\pm$ 0.11	1.75 $\pm$ 0.47	263
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.98 $\pm$ 0.11	2.43 $\pm$ 0.34	3.44 $\pm$ 0.47	3.09 $\pm$ 0.30	3.09 $\pm$ 0.43	1.90 $\pm$ 0.11	329
	Ratio <sup>a</sup>	0.94	0.75	1.00	1.26	1.59	1.09	1.25

(Table I continued)

Skeletal muscle**	wild-type	2.36 ± 0.18	2.27 ± 0.10	2.64 ± 0.29	1.92 <sup>b</sup>	1.50 ± 0.08	1.53 ± 0.14	208
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.58 ± 0.13	3.15 ± 0.21	3.13 ± 0.40	2.67 ± 0.13	1.94 ± 0.34	1.50 ± 0.11	255
	Ratio <sup>a</sup>	1.09	1.39	1.19	1.39	1.29	0.98	1.23
Skin*	wild-type	1.28 ± 0.32	1.19 ± 0.12	1.38 ± 0.13	1.37 <sup>b</sup>	1.23 <sup>b</sup>	1.20 <sup>b</sup>	149
	<i>mdr1a</i> (-/-)	1.50 ± 0.65	1.45 ± 0.13	2.15 ± 0.20	2.00 ± 0.21	1.85 ± 0.27	1.56 ± 0.18	213
	Ratio <sup>a</sup>	1.17	1.22	1.56	1.46	1.50	1.30	1.43
Spinal cord	wild-type	0.68 ± 0.09	0.78 ± 0.08	1.16 ± 0.08	1.05 ± 0.02	1.27 ± 0.04	1.47 ± 0.12	145
	<i>mdr1a</i> (-/-)	0.68 ± 0.09	1.02 ± 0.01	1.20 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.14	1.44 ± 0.04	1.29 ± 0.06	154
	Ratio <sup>a</sup>	1.00	1.31	1.03	1.22	1.13	0.88	1.06
Spleen	wild-type	6.08 ± 0.75	5.83 ± 0.49	4.88 ± 0.22	3.32 ± 0.13	1.95 ± 0.11	1.53 ± 0.12	318
	<i>mdr1a</i> (-/-)	5.05 ± 0.42	4.96 ± 0.47	4.69 ± 0.28	3.33 ± 0.29	2.06 ± 0.11	1.66 ± 0.03	316
	Ratio <sup>a</sup>	0.83	0.85	0.96	1.00	1.06	1.08	0.99
Testes***	wild-type	0.41 ± 0.10	0.64 ± 0.03	1.00 ± 0.09	1.29 ± 0.06	1.58 ± 0.03	1.62 ± 0.12	165
	<i>mdr1a</i> (-/-)	0.47 ± 0.04	0.78 ± 0.02	1.13 ± 0.07	1.62 ± 0.01	1.72 ± 0.09	1.95 ± 0.03	191
	Ratio <sup>a</sup>	1.15	1.22	1.13	1.26	1.09	1.20	1.16
Thymus	wild-type	2.45 ± 0.27	3.00 ± 0.21	2.66 ± 0.07	2.77 ± 0.01	2.41 ± 0.12	2.20 ± 0.12	293
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.37 ± 0.16	2.54 ± 0.09	2.92 ± 0.16	2.94 ± 0.23	2.50 ± 0.09	1.81 ± 0.07	289
	Ratio <sup>a</sup>	0.97	0.85	1.10	1.06	1.04	0.82	0.99
Stomach wall	wild-type	5.74 ± 0.57	5.95 ± 0.32	4.54 ± 0.47	3.08 ± 0.20	2.26 ± 0.40	1.67 ± 0.14	326
	<i>mdr1a</i> (-/-)	5.17 ± 0.20	5.49 ± 0.09	5.15 ± 0.80	4.23 ± 1.15	2.34 ± 0.23	1.73 ± 0.26	360
	Ratio <sup>a</sup>	0.90	0.92	1.13	1.37	1.04	1.04	1.10
Small intestine wall <sup>c</sup> ***	wild-type	5.61 ± 0.57	5.57 ± 0.58	8.03 ± 0.98	10.14 ± 1.17	7.89 ± 0.63	2.57 <sup>b</sup>	803
	<i>mdr1a</i> (-/-)	5.41 ± 0.21	4.84 <sup>b</sup>	6.28 ± 0.30	6.67 ± 0.24	4.95 ± 0.38	3.31 ± 0.32	591
	Ratio <sup>a</sup>	0.96	0.87	0.78	0.66	0.63	1.29	0.74
Large intestine wall <sup>c</sup> ***	wild-type	2.66 ± 0.31	2.53 ± 0.13	1.82 ± 0.27	1.07 ± 0.04	0.84 ± 0.11	2.33 ± 0.74	176
	<i>mdr1a</i> (-/-)	4.25 ± 0.21	4.17 ± 0.28	3.23 ± 0.26	2.38 ± 0.30	1.53 ± 0.20	1.97 ± 0.39	256
	Ratio <sup>a</sup>	1.60	1.65	1.77	2.22	1.82	0.85	1.45

\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  for *mdr1a* (-/-) vs wild-type mice

<sup>a</sup> Ratio *mdr1a* (-/-) mice/wild-type mice

<sup>b</sup> No SEM calculated as  $n=2$

<sup>c</sup> Small intestine comprised duodenum, jejunum and ileum

Table 2: Mean percent of dose  $\pm$  SEM in gastrointestinal tract contents for male wild-type and *mdr1a* (-/-) mice following an intravenous administration of [<sup>3</sup>H]domperidone.

	Genotype	Time point (min)					
		4	7	15	30	60	120
Stomach contents	wild-type	0.36 $\pm$ 0.05	1.08 $\pm$ 0.35	1.41 $\pm$ 0.31	1.13 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.28	0.67 $\pm$ 0.30
	<i>mdr1a</i> (-/-)	0.22 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.11	0.72 $\pm$ 0.11	1.33 $\pm$ 0.45	1.44 $\pm$ 0.62	0.48 $\pm$ 0.08
Small intestine contents	wild-type	5.09 $\pm$ 0.53	6.12 $\pm$ 1.21	14.09 $\pm$ 2.10	22.28 $\pm$ 1.84	24.86 $\pm$ 6.63	17.20 $\pm$ 7.86
	<i>mdr1a</i> (-/-)	2.91 $\pm$ 0.33	4.65 $\pm$ 1.94	13.50 $\pm$ 1.48	22.61 $\pm$ 0.92	26.42 $\pm$ 1.78	20.90 $\pm$ 6.12
Large intestine contents***	wild-type	1.25 $\pm$ 0.04	1.27 $\pm$ 0.05	2.12 $\pm$ 0.22	2.65 $\pm$ 0.29	4.36 $\pm$ 0.47	21.83 $\pm$ 7.49
	<i>mdr1a</i> (-/-)	0.31 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.14	1.52 $\pm$ 0.20	21.73 $\pm$ 2.87
Gall bladder including bile <sup>a</sup>	wild-type	1.25, 0.46	0.63, 1.35	3.26, 1.91	1.85, 0.02	0.01, 4.85	0.14, 3.69
	<i>mdr1a</i> (-/-)	0.01, 0.12	0.38, 2.00	1.18, 0.05	0.03, 1.27	4.19, 0.28	0.17, 2.57

\*\*\*  $p < 0.001$  for *mdr1a* (-/-) vs wild-type

<sup>a</sup> n=2. No mean calculated.

### 3.1.5.3 Differences between mouse genotypes in tissue distribution and pharmacokinetics of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity in whole-body tissues

Similar blood and plasma radioactivity concentrations were observed between wild-type and *mdr1a* (-/-) mice following the intravenous injection of [<sup>3</sup>H]domperidone (Table 1). However, significant differences were obtained for certain tissues between the genotypes. Indeed, higher [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity levels were observed for brain, lungs, mesenteric lymph nodes, skeletal muscle, skin, testes, large intestine wall and contents of *mdr1a* (-/-) mice compared to

wild-type mice (Table 1). Ratios presented in Table 1 showed for many tissues a greater difference between the genotypes for the 30 min time point. In contrast, lower [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity concentrations were observed for small intestine wall of *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice.

A greater distribution of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity was observed in skeletal muscle of *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice ( $p < 0.01$ ) with differences in concentrations reaching up to 39% (Table 1). The  $AUC_{0-t_{last}}$  value was increased by 23% for P-gp deficient mice compared to wild-type mice (Table 1).

Comparison of lung results showed a highly significant group difference between the two genotypes in the distribution of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity ( $p < 0.001$ ). Concentrations were consistently more elevated throughout the study duration, up to 22%, in *mdr1a* (-/-) compared to wild-type mice with a higher  $AUC_{0-t_{last}}$  value of 14% (Tables 1 and 2). This difference for lungs was visualised on autoradioluminograms (Fig. 3A).

Although brain and testes had low levels of radioactivity, group differences between the two genotypes were highly significant ( $p < 0.001$ ). Higher levels of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity up to 29% and 26% for brain and testes, respectively, were observed for *mdr1a* (-/-) vs wild-type mice (Table 1).

Accordingly,  $AUC_{0-t_{last}}$  for brain and testes were higher for *mdr1a* (-/-) mice by approximately 16% for both tissues (Table 1). This difference for brain was visualized on autoradioluminograms presented in Fig. 3A where greater levels of radioactivity are observed for the *mdr1a* (-/-) mouse compared to the wild-type mouse.

Tissue distribution of [ $^3$ H]domperidone-related radioactivity for both mesenteric lymph nodes and skin was significantly different between mouse genotypes ( $p < 0.05$ ). Higher levels in concentrations of radioactivity up to 42% and 56% for mesenteric lymph nodes and skin, respectively, were observed for *mdr1a* (-/-) mice (Table 1). Accordingly, greater  $AUC_{0-t_{last}}$  values by 24% and 43%, for mesenteric lymph nodes and skin, respectively, were calculated for *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice (Table 1).

For the small intestine wall, a highly significant group difference was observed between mouse genotypes ( $p < 0.001$ ) with lower concentrations of [ $^3$ H]domperidone-related radioactivity obtained for *mdr1a* (-/-) mice, down by 37%, compared to wild-type mice (Table 1). The  $AUC_{0-t_{last}}$  value for small intestine wall was 26% lower for P-gp-deficient mice in comparison to wild-type mice (Table 1). In contrast to the small intestine wall, higher concentrations of [ $^3$ H]domperidone-related radioactivity (greater levels up to 2.2-fold) were observed for the large

intestine wall of *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice with a highly significant group differences between mouse genotypes ( $p < 0.001$ ) (Table 1). Accordingly,  $AUC_{0-t_{last}}$  value was more important for large intestine wall of P-gp-deficient mice by 45% compared to wild-type mice (Table 1). The rapid and relatively high distribution of [ $^3H$ ]domperidone-related radioactivity in gastrointestinal walls is in accordance with the target and therapeutic effect of domperidone as it is a prokinetic drug.

Gastrointestinal tract contents were collected and analysed for their levels of [ $^3H$ ]domperidone-related radioactivity and reported as percent of dose in Table 2. Fig. 4 compares graphically percent of administered dose in stomach, small intestine and large intestine walls and contents. Although no significant group differences were observed between mouse genotypes for the stomach contents, a clear trend could be observed for the first time points up to 15 min post-dose where *mdr1a* (-/-) mice showed lower levels compared to wild-type mice. Small intestine contents showed very high variability for all the time points except for the first time point of 4 min where percent of dose was lower for *mdr1a* (-/-) mice in comparison to wild-type mice. For large intestine contents, a highly significant difference was obtained between genotypes ( $p < 0.001$ ) and percent of dose of [ $^3H$ ]domperidone-related radioactivity was much lower for *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice for all time points.

Certain tissues such as liver, kidneys, pancreas, spleen and thymus had no differences in [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity concentrations between *mdr1a* (-/-) and wild-type mice. Tissue concentrations vs time curves (graphs not presented) showed superimposed curves for the two genotypes for those tissues, as translated by the *mdr1a* (-/-)/wild-type mice tissue concentration ratios and AUC<sub>0-tlast</sub> ratios presented in Table 1.

#### **3.1.5.4 Differences between mouse genotypes in tissue distribution and pharmacokinetics of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity in the heart**

Greater levels of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity concentrations were obtained in both left and right ventricles of the heart in *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice with significant group differences between genotypes ( $p < 0.01$ ). Concentrations of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity in left and right ventricles were consistently higher for all time points for *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice (with increases reaching up to 28%) except for the last time point of 120 min (Table 1). The AUC<sub>0-tlast</sub> values were greater by approximately 17% for left and right ventricles of *mdr1a* (-/-) mice vs wild-type mice (Table 1). For atriums, higher concentrations were observed in *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice only



for the 15, 30 and 60 min time points. No significant group difference between genotypes was obtained for atriums. Autoradioluminograms presented in Fig. 3B confirm the highest distribution of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity in the myocardium of *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice.

### 3.1.5.5 HPLC with radiometric detection

Analyses of the total radioactivity can be complicated by the rapid metabolism of domperidone into radiolabeled metabolites that can penetrate tissues. For that reason, we performed HPLC analysis with radiometric detection to determine the amount of the radiolabeled parent drug domperidone in some important organs (Table 3). Results from chromatograms showed that 4 min after the administration of [<sup>3</sup>H]domperidone, 41% to 46% and 62% to 64% of radioactivity detected for plasma and liver, respectively, was attributed to the parent domperidone. This suggested a very rapid metabolism of domperidone. For kidney and left ventricle of the heart, domperidone accounted for more than 90% of the radiolabeled compounds detected at 4 min post-dose. Domperidone could still be detected at 120 min post-dose for most of the organs analysed.

Interestingly, results from Table 3 showed that the parent compound domperidone did not distribute into the brain of wild-type mice at both time points

studied whereas 27% and 8% of radioactivity detected on chromatograms was associated to domperidone at 4 and 120 min post-dose, respectively, for *mdr1a* (-/-) mice. Higher levels of radiolabeled domperidone were observed for kidney (40% vs 26%) and heart left ventricle (7% vs 3%) samples of *mdr1a* (-/-) mice at the 120 min time point compared to wild-type mice.

For liver, concentrations ( $\mu\text{g eq/g}$ ) of total radioactivity and radiolabeled domperidone vs time are represented graphically in Fig. 5. Concentrations of radiolabeled domperidone were estimated based on percent chromatogram associated to radiolabeled domperidone and on total radioactivity results obtained by liquid scintillation spectroscopy. Results demonstrated that approximately 50% of total radioactivity in liver of mice was associated with radiolabeled domperidone throughout the study duration. Fig. 5 presents that similarly to total [ $^3\text{H}$ ]domperidone-related radioactivity concentrations, no differences are observed for concentrations of the parent drug domperidone between genotypes.

Table 3: Percent of radioactivity detected from chromatograms associated to the radiolabeled parent drug domperidone in plasma and selected tissues of male wild-type and *mdr1a* (-/-) mice obtained by HPLC with radiometric detection following an intravenous administration of [<sup>3</sup>H]domperidone.

Genotype		Time point (min)	
		4	120
Plasma	wild-type	40.9	0
	<i>mdr1a</i> (-/-)	46.3	0.13
Liver	wild-type	61.8	57.7
	<i>mdr1a</i> (-/-)	63.5	30.4
Brain	wild-type	0	0
	<i>mdr1a</i> (-/-)	26.6	7.9
Kidneys	wild-type	91.6	26.3
	<i>mdr1a</i> (-/-)	92.2	40.0
Left ventricle	wild-type	95.0	3.4
	<i>mdr1a</i> (-/-)	96.5	6.9

Based on retention time of authentic [<sup>3</sup>H]domperidone radiochromatogram

### 3.1.6 Discussion

This study examined the modulatory role of the membrane transporter P-gp on the distribution of domperidone to whole-body tissues with a special look at the heart. Mice genetically deficient in the gene coding for the P-gp isoform *mdr1a* were used. Results showed that the P-gp transporter has a modulatory role in the distribution of domperidone to several tissues including brain, lungs, lymph nodes, skeletal muscle, skin, testes, small and large intestines. Cardiac distribution of domperidone was also modulated by P-gp and may therefore represent a key determinant of cardiotoxicity associated with this drug. To our knowledge, it is the first time that domperidone has been recognised as a P-gp substrate *in-vivo*.

It is well recognised in literature that the transporter P-gp is highly expressed in human and rodent small and large intestine walls (Mutch et al., 2004; Zimmermann et al., 2005; Englung et al., 2006; Seithel et al., 2006). The significantly higher concentrations and lower percent of dose of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity in large intestine wall and contents, respectively, of *mdr1a* (-/-) mice are in accordance with an impairment of P-gp activity in those mice. Indeed, the deficiency in the efflux of domperidone from enterocytes toward the lumen of large intestine led to the much higher levels of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity in large intestine wall of *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice. This

impaired P-gp activity in enterocytes of *mdr1a* (-/-) mice explains the lower levels retrieved in the large intestine lumen of those mice. The low percent of dose retrieved in contents of the large intestine up to 60 min post-dose indicated that the distribution of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity into large intestine wall was most likely due to the distribution from the blood compartment rather than from the contents of intestines. For the small intestine contents, results showed similar percent of dose between genotypes, except for the first time point of 4 min where *mdr1a* (-/-) mice presented lower levels than wild-type mice. This latter result for the 4 min time point is in accordance with the theory that due to the impaired P-gp activity in small intestine wall of those mice less radioactivity should be retrieved in the content of small intestine. The high variability in small intestine contents observed from the 7 min time point and after could be a consequence of spasmodic gallbladder emptying of bile into the small intestine lumen. Hence, the effect that should have been observed based on the theory of the deficient P-gp activity in small intestine wall of *mdr1a* (-/-) mice could have been masked by the emptying of bile in the lumen of the small intestine which is influenced by animal ingestion of food.

It is known that domperidone exerts little effects on cerebral dopaminergic receptors (Brogden et al., 1982; Prakash and Wagstaff, 1998; Barone, 1999). Accordingly, our experiments demonstrated that the parent drug domperidone (based on HPLC with radiometric detection results) did not cross the blood-brain barrier of

wild-type mice whereas the drug did distribute into brain of P-gp-deficient mice. This is in accordance with P-gp being a main component of the blood-brain barrier protecting xenobiotics that are substrates of P-gp from accumulating into the brain (Kim et al., 1998). Thus, the significant group difference observed between mouse genotypes was likely attributed to the parent drug domperidone crossing the blood-brain barrier for *mdr1a* (-/-) mice.

Testis like brain is recognised to highly express P-gp as part of the blood-tissue barrier (Melaine et al., 2002). The similar concentrations of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity and differences between genotypes for testis and brain suggest that testis may possess a similar blood-tissue barrier to brain that involves P-gp to protect tissue accumulation of xenobiotics.

Higher levels of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity were also obtained for skeletal muscle, lungs, mesenteric lymph nodes and skin of *mdr1a* (-/-) mice compared to wild-type mice. Skeletal muscle and lungs were reported to express intermediate levels of P-gp in mouse and human (Baas and Borst, 1988; Croop et al., 1989). It remains unclear whether lymph nodes and skin express significant levels of P-gp.

Tissues such as liver and kidney, that are well recognised to highly express P-gp, did not present differences in [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity concentrations between genotypes. For liver, supporting data obtained by HPLC with radiometric detection confirmed the lack of differences between genotypes in concentrations of the radiolabeled parent drug domperidone. This could be explained by the expression of other efflux transporters that could have compensated for the deficiency of P-gp in *mdr1a* (-/-) mice. Another hypothesis is a possible compensatory response translated by an increased expression of the isoform *mdr1b* in liver and kidney of *mdr1a* (-/-) mice. Indeed, a previous study showed that most tissues, including brain and intestine, did not have significantly increased levels of *mdr1b* expression in *mdr1a* (-/-) mice while liver and kidney showed an up-regulation of *mdr1b* expression (Schinkel et al., 1994).

Our experiments showed that the deficiency in the gene coding for the P-gp isoform *mdr1a* facilitated the distribution of domperidone in heart ventricles due to the impairment of the ATP-dependent P-gp-related drug efflux. Higher concentrations of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity found in heart ventricles of P-gp deficient mice compared to wild-type mice suggest that P-gp could modulate risk of cardiac toxicity associated with domperidone. It was not possible to examine the pharmacodynamic response of heart (prolongation of the QT interval) in mice following the administration of domperidone due to the lack of expression of the

potassium channel  $I_{Kr}$  in ventricular tissue of adult mice, which is involved in the prolongation of the QT interval. The role of P-gp in the distribution of domperidone to the heart, suggests possible drug-drug interactions in the case of co-administration of domperidone with other P-gp substrates. Indeed, it is predictable that a decreased activity of P-gp due to the co-administration of another P-gp substrate or inhibitor would lead to increased cardiac concentrations of domperidone and potentially cardiotoxicities. Recently, the risk of QT prolongation has been recognised (Medecines Control Council, 2006) following the observation of QT prolongation when domperidone and ketoconazole, a P-gp inhibitor (Siegmund et al., 1994; Wang et al., 2002), were administered concomitantly. No prolongation of the QT interval was observed when domperidone was administered alone. Cases of increased concentrations of drugs in the heart occurring following the administration of concomitant P-gp substrates confirm the important role of this protein in the transport of drugs like domperidone in the heart (Couture et al., 2006).

Differences in tissue distribution of domperidone between mouse genotypes obtained in this study are not as large as observed for some other P-gp substrates like vinblastine and loperamide (Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1996). This latter fact along with domperidone recognized to be a strong substrate of P-gp by *in vitro* experiments (Schinkel et al., 1996; El Ela et al., 2004; Faassen et al., 2003) suggest the possibility of domperidone being transported by other transporters. This could



have masked a more pronounced differences between wild-type and P-gp deficient mice in the distribution of domperidone. Whether domperidone is substrate of other ABC transporters remains to be clarified.

In brief, the P-gp transporter appears to have a modulatory role in the distribution of domperidone to several tissues including brain, lungs, lymph nodes, skeletal muscle, skin, testes, small and large intestine. Cardiac distribution of domperidone is also modulated by P-gp and the control of cardiac intracellular concentrations of domperidone may represent a key determinant of cardiotoxicity associated with this drug.

### **3.1.7 Acknowledgments**

The authors would like to thank Geneviève Coutu, Marielle Bouchard, Marcel Lafleur, Dominic Rivet, Lara M. Castro and their team and Pierre Martin from Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal Inc. for their technical support, as well as Kodoré Camara for statistical analysis. Many thanks to François Bélanger from the Faculté de pharmacie of the Université de Montréal for his technical assistance.

### 3.1.8 References

Barone JA (1999) Domperidone: a peripherally acting dopamine<sub>2</sub>-receptor antagonist. *Ann Pharmacother* **33**:429-440.

Baas F and Borst P (1988) The tissue dependent expression of hamster P-glycoprotein genes. *FEBS Lett* **229**:329-332.

Brogden RN, Carmine AA, Heel RC, Speight TM and Avery GS (1982) Domperidone. A review of its pharmacological activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the symptomatic treatment of chronic dyspepsia and as an antiemetic. *Drugs* **24**:360-400.

Bruera E, Villamayor R, Roca E, Barugel M, Tronge J and Chacon R (1986) QT interval prolongation and ventricular fibrillation with i.v. domperidone. *Cancer Treat Rep* **70**:545-546.

Couture L, Nash JA and Turgeon J (2006) The ATP-binding cassette (ABC) transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart. *Pharmacol Rev* **58**:244-258.

Cox DS, Scott KR, Gao H and Eddington ND (2002) Effect of P-glycoprotein on the pharmacokinetics and tissue distribution of enaminone anticonvulsants: Analysis by population and physiological approaches. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:1096-1104.

Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P and Housman DE (1989) The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol* **9**:1346-1350.

Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Bohm M, Warzok R, Kerb R, Brinkmann U, Schaeffeler E, Schwab M, Cascorbi I, Jedlitschky G and Kroemer HK (2003) Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol* **163**:1567-1577.

Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R and Turgeon J (2000) Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation* **102**:1883-1885.

El Ela AA, Hartter S, Schmitt U, Hiemke C, Spahn-Langguth H and Langguth P (2004) Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive

compounds-implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J Pharm Pharmacol* **56**:967-975.

Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazarova L, Gråsjö J, Kindmark A and Artursson P (2006) Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* **29**:269-277.

Faassen F, Vogel G, Spannings H and Vromans H (2003) Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *Int J Pharm* **263**:113-122.

Gatmaitan ZC and Arias IM (1993) Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol* **24**:77-97.

Gibaldi M and Perrier D (1982) Drugs and the Pharmaceuticals Sciences, vol. 15, in *Pharmacokinetics, 2nd ed*, Marcel Dekker Inc, New York.

Goldschmidt N, Azaz-Livshits T, Gotsman, Nir-Paz R, Ben-Yehuda A and Muszkat M (2001) Compound cardiac toxicity of oral erythromycin and verapamil. *Ann Pharmacother* **35**:1396-1399.

Hunter J, Hirst BH and Simmons NL (1993a) Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm Res* **10**:743-749.

Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL and Hirst BH (1993b) Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem* **268**:14991-14997.

Kaeser YA, Brunner F, Drewe J and Haefeli WE (1998) Severe hypotension and bradycardia associated with verapamil and clarithromycin. *Am J Health Syst Pharm* **55**:2417-2418.

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM and Wilkinson GR (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* **101**:289-294.

Medicines Control Council (2006) Interaction between ketoconazole and domperidone and the risk of QT prolongation – important safety information. *S Afr Med J* **96**:596.

Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I and Kroemer HK (2004) Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* **14**:381-385.

Melaine N, Lienard MO, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H and Jegou B (2002) Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, guinea pig, and human. *Biol Reprod* **67**:1699-1707.

Mutch DM, Anderle P, Fiaux M and Mansourian R (2004) Regional variations in ABC transporter expression along the mouse intestinal tract. *Physiol Genomics* **17**:11-20.

Osborne RJ, Slevin ML, Hunter RW and Hamer J (1985) Cardiac arrhythmias during cytotoxic chemotherapy: role of domperidone. *Hum Toxicol* **4**:617-626.

Piehler A, Kaminski WE, Wenzel JJ, Langmann T and Schmitz G (2002) Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem Biophys Res Commun* **295**:408-416.

Prakash A and Wagstaff AJ (1998) Domperidone. A review of its use in diabetic gastropathy. *Drugs* **56**:429-445.

Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* **8**:161-170.

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJ and Borst P (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**:491-502.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA and van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* **97**:2517-2524.

Siegmund MJ, Cardarelli C, Aksentijevich I, Sugimoto Y, Pastan I and Gottesman MM (1994) Ketoconazole effectively reverses multidrug resistance in highly resistant KB cells. *J Urol* **151**:485-491.

Seithel A, Karlsson J and Hilgendorf C (2006) Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* **28**:291-299.

Steenbergen JA and Stauffer VL (1998) Potential macrolide interaction with verapamil. *Ann Pharmacother* **32**:387-388.

Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I and Tsuji A (1996) Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J Pharm Pharmacol* **48**:1083-1089.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:7735-7738.

Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM and Pastan I (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:3004-3008.



Ullberg S (1977) The technique of whole-body autoradiography: Cryosectioning of large specimens, in *Scientific Tools, the LKB Instrument Journal special issue* (Elvefeldt O, eds) pp 2-29, Sweden.

Van Nueten JM, Ennis C, Helsen L, Laduron PM and Janssen PAJ (1978) Inhibition of dopamine receptors in the stomach: an explanation of the gastrokinetic properties of domperidone. *Life Sci* **23**:453-458.

Wang EJ, Lew K, Casciano CN, Clement RP and Johnson WW (2002) Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:160-165.

Zimmermann C, Gutmann H, Hruz P, Gutzwiller J-P, Beglinger C and Drewe J (2005) Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metab Dispos* **33**:219-224.

### 3.1.9 Figure legends

Figure 1: Structure of domperidone. Asterisks indicate the likely positions of tritium on aromatic rings (three tritium per molecule of domperidone).

Figure 2: Confirmation by PCR analysis of the presence/absence of *mdr1a* exon 6 in wild-type and *mdr1a* (-/-) mouse livers. PCR products were separated by 1% agarose electrophoresis.

Figure 3: Autoradioluminograms of distribution of [<sup>3</sup>H]domperidone-related radioactivity in male wild-type and *mdr1a* (-/-) mice following an intravenous administration of <sup>3</sup>H-domperidone. 3A presents whole-body of mice euthanised at 2 min post-dose where intensity of radioactivity is proportional to density of grey. 3B presents myocardium of mice euthanised at 15 min post-dose where colors from blue to red (blue<green<yellow<orange<red) indicate the intensity of distributed radioactivity.

Figure 4: Mean percent of dose  $\pm$  SEM in gastrointestinal tract wall and contents for male wild-type and *mdr1a* (-/-) mice following an intravenous administration of [<sup>3</sup>H]domperidone.

Figure 5: Mean concentrations of total radioactivity (n=3) and domperidone (n=1) in liver of wild-type and *mdr1a* (-/-) mice following an intravenous administration of [<sup>3</sup>H]domperidone. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for concentrations of total radioactivity.

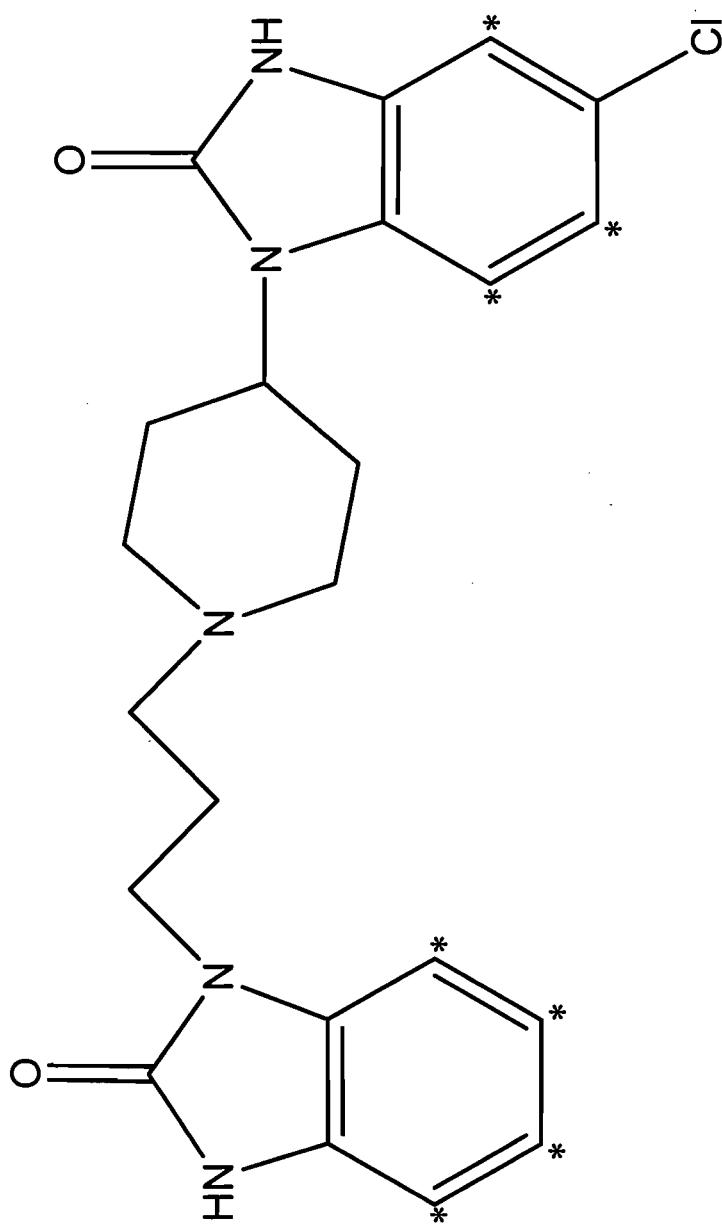


Figure 1:

Figure 2:

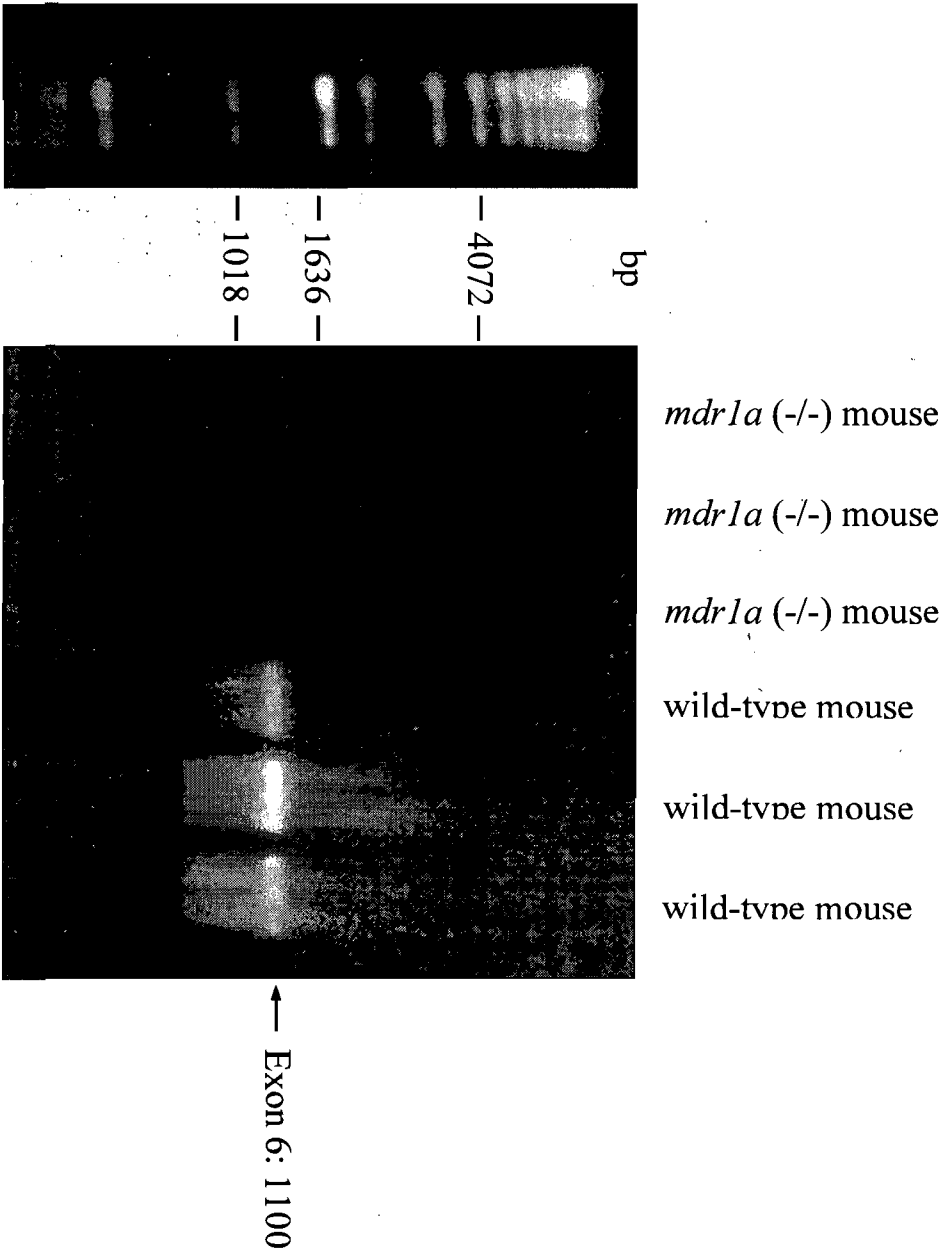
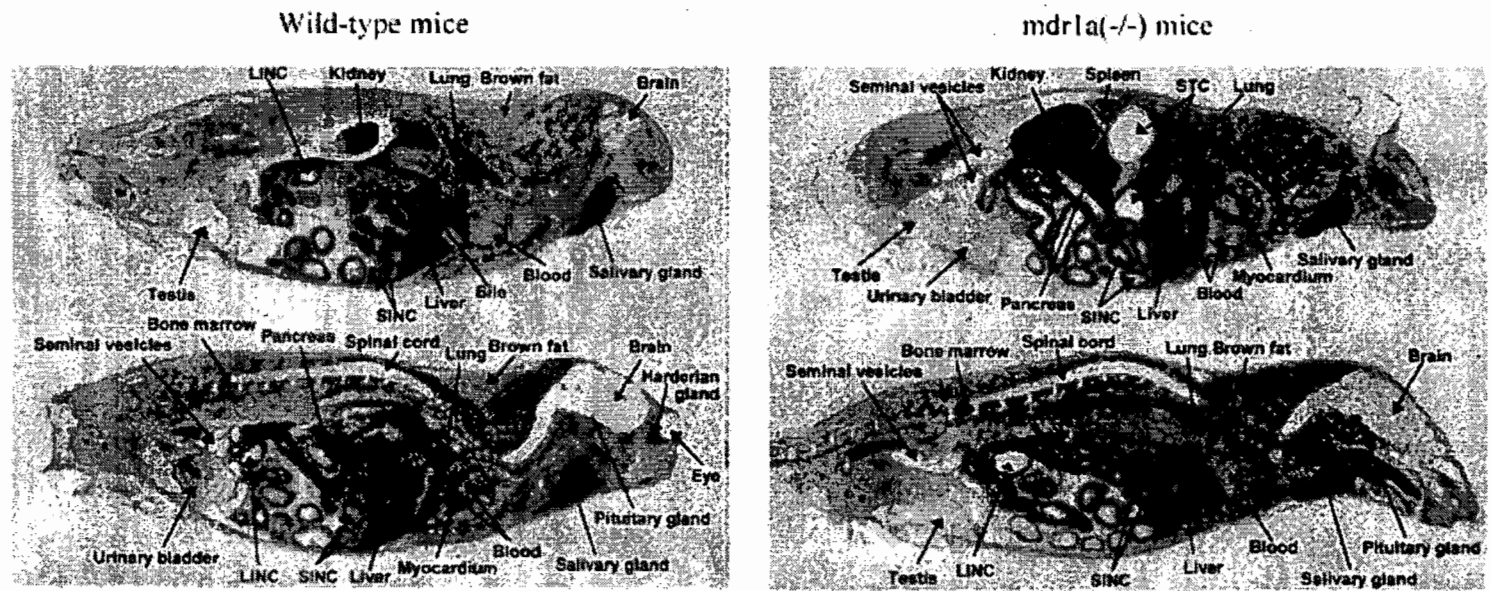


Figure 3:

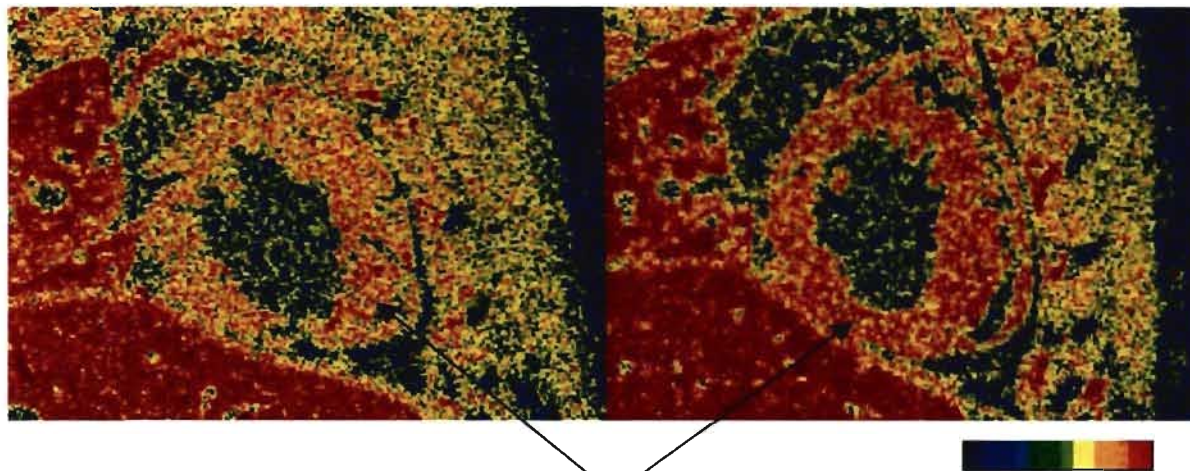
A



B

Wild-type mice

*mdr1a* (-/-) mice



Myocardium

Figure 4:

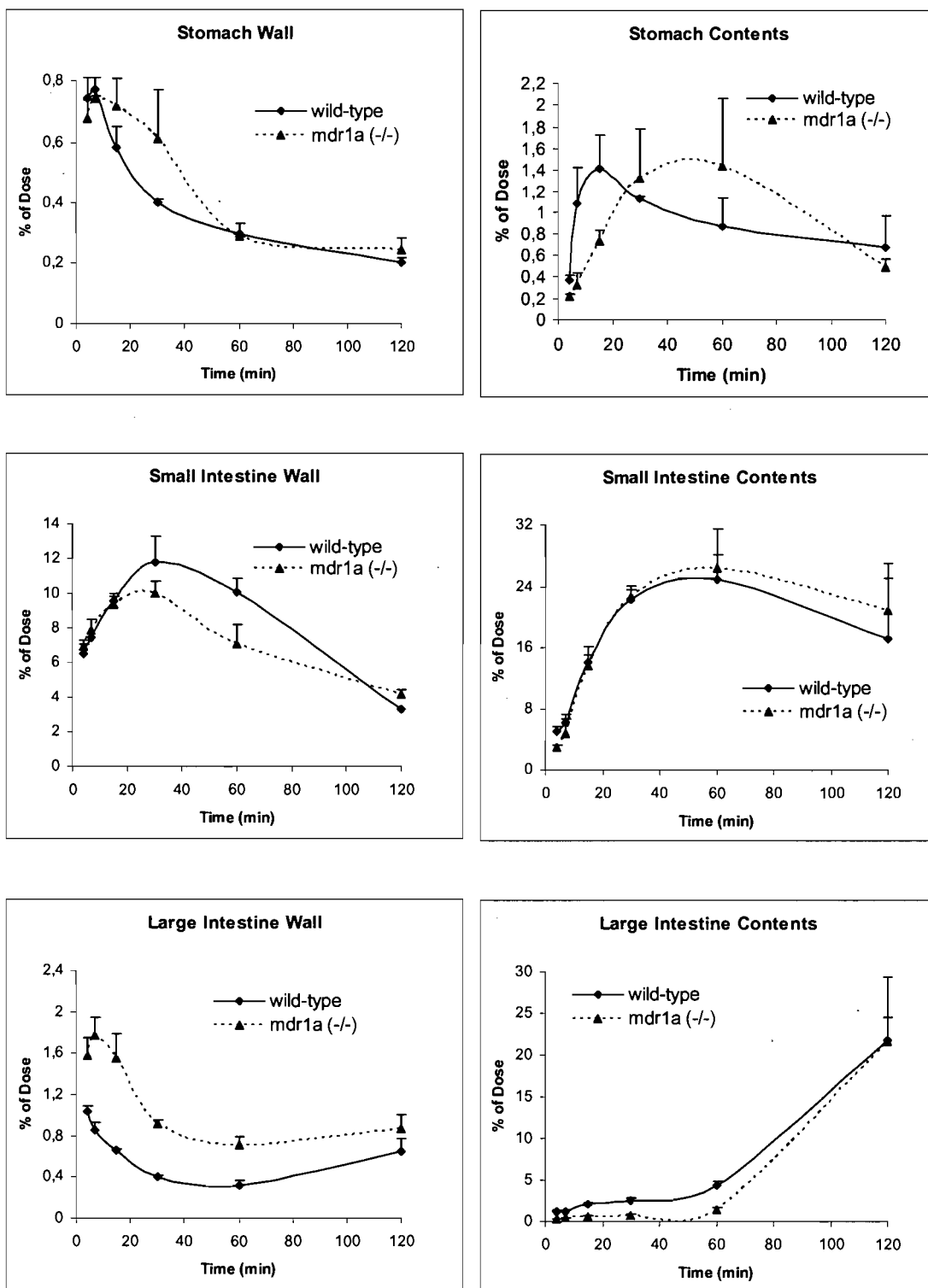
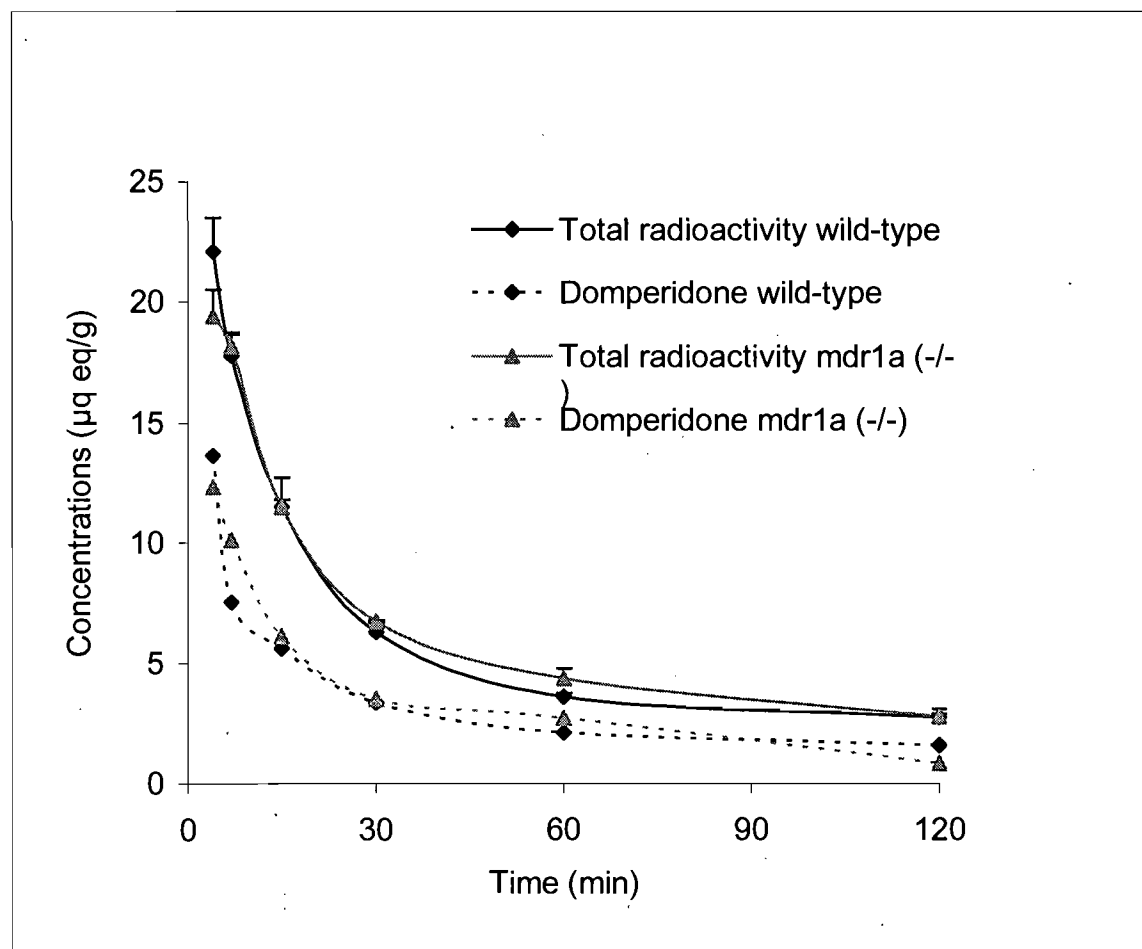


Figure 5:





## 3.2 Résultats additionnels de souris double-mutées

### *mdr1a/1b (-/-)*

Les résultats relatifs aux souris double-mutées *mdr1a/1b (-/-)* qui seront rapportés dans cette section ont été obtenus dans le cadre de l'étude présentée à la section précédente (section 3.1). Les résultats décrits dans cette section constituent une suite aux résultats présentés à la section 3.1. Par conséquent, les énoncés inclus dans l'introduction de la section précédente (section 3.1.3) décrivant les motifs de la réalisation de l'étude s'appliquent également à cette section.

### 3.2.1 Introduction

Le transporteur ABC, P-gp, est codée chez l'homme par le gène *ABCB1* (aussi appelé *MDR1*) et par les gènes *mdr1a* (aussi appelé *mdr3*) et *mdr1b* (aussi appelé *mdr1*) chez les rongeurs (Schinkel, 1997) (Tableau 4 de la section 1.3.1). Les deux isoformes de la P-gp chez la souris semblent remplir la même fonction que *MDR1* chez l'humain (Schinkel et coll., 1997). Les résultats de l'implication de la P-gp sur la distribution cardiaque et tissulaire de la dompéridone par l'utilisation de souris simple-mutées *mdr1a (-/-)* et normales ont été présentés à la

section précédente (section 3.1). Dans le cadre de cette même étude, bien que *mdr1a* semble être l'isoforme le plus important pour l'activité de la P-gp, des souris double-mutées *mdr1a/1b* (-/-) ont également été utilisées. Le but était d'évaluer l'effet d'une déficience des deux isoformes du gène codant pour la P-gp sur la distribution de dompéridone. Bien que les résultats obtenus n'aient pas été inclus dans l'article présenté à la section précédente dû à un effectif plus restreint, il demeure intéressant de se pencher sur ces résultats.

## 3.2.2 Matériel et méthodes

### 3.2.2.1 Substances chimiques

Voir section 3.1.4.1.

### 3.2.2.2 Animaux

En plus des souris normales et simple-mutées *mdr1a* (-/-) (section 3.1.4.2), des souris mâles adultes FVB (FVB.129P2-Abcb1a<sup>tm1Bor</sup>-Abcb1b<sup>tm1Bor</sup>N12) ont été reçues également de Taconic (Germantown, NY). Les souris ont été acclimatées au laboratoire pour au moins 1 semaine avant le traitement. À la journée du

traitement, les souris *mdr1a/1b* (-/-) étaient âgées de 16 semaines et présentaient un poids de 31.8 à 35.3 g. Les conditions environnementales au cours de l'étude étaient contrôlées à une température de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $50 \pm 20\%$ . La photopériode était de 12 h de lumière et 12 h de noirceur exceptée lors des activités cédulées. Les animaux ont eu un accès libre à une nourriture commerciale certifiée (*PMI Certified Rodent Chow 5002: PMI Nutrition International*) et à de l'eau. La recherche fut en accord avec le "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" publié par le *US National Research Council* (*NRC publication*, révisé en 1996).

### 3.2.2.3 Formulation

Voir section 3.1.4.4.

### 3.2.2.4 Administration de la dose

En plus des souris normales et *mdr1a* (-/-) (voir section 3.1.4.5), un total de neuf souris *mdr1a/1b* (-/-) furent administrées la formulation de  $^3\text{H}$ -dompéridone par injection intraveineuse *via* la queue en utilisant un Abbocath®. La dose reçue pour chaque animal fut calculée se basant sur le poids du volume de la formulation

expulsé de la seringue, le niveau de radioactivité retrouvé dans l'Abbocath® et sur la base de la concentration de radioactivité dans la formulation.

### 3.2.2.5 Structure de l'étude

En plus des souris normales et *mdr1a* (-/-) (voir section 3.1.4.6), une souris *mdr1a/1b* (-/-) (destinée à l'analyse par comptage par scintillation liquide) fut euthanasiée par exsanguination sous anesthésie par isoflurane et le sang collecté de l'aorte abdominale à 4, 7, 15, 30, 60 et 120 min suite à l'administration de <sup>3</sup>H-dompéridone. De plus, une souris additionnelle *mdr1a/1b* (-/-) pour le premier (4 min) et dernier temps (120 min) (destinée à l'analyse HPLC avec détection radiométrique) fut également euthanasiée de cette façon. Le plasma fut obtenu par centrifugation du sang. Environ vingt-cinq structures et organes furent collectés de chaque animal. Une souris *mdr1a/1b* (-/-) additionnelle fut euthanasiée par injection intraveineuse d'Euthanyl® (approximativement 200 mg/kg) au temps de 2 min et utilisée pour la micro-autoradiographie.

### 3.2.2.6 Comptage par scintillation liquide

Voir section 3.1.4.7.

### **3.2.2.7 HPLC avec détection radiométrique**

Voir section 3.1.4.9.

### **3.2.2.8 Analyse des données**

Voir section 3.1.4.10.

## **3.2.3 Résultats**

### **3.2.3.1 Différences entre les souris *mdr1a/1b* (-/-) et les souris normales et *mdr1a* (-/-) pour la distribution tissulaire et cardiaque de la radioactivité associée au <sup>3</sup>H-dompéridone**

À la section précédente (section 3.1), il a été démontré que la distribution tissulaire était généralement plus importante pour les souris *mdr1a* (-/-) que pour les souris normales due à une déficience d'un des deux isoformes du gène codant pour la P-gp. La Figure 1, présentant les différences de  $AUC_{0-tlast}$  entre les trois génotypes pour tous les tissus, montre que la distribution tissulaire de la

radioactivité associée au dompéridone est également plus importante pour les souris double-mutées *mdr1a/1b* (-/-) que pour les souris normales. Les pourcentages de différence les plus importants entre les AUC<sub>0-tlast</sub> pour les souris *mdr1a/1b* (-/-) et les souris normales ont été observées pour la paroi du petit intestin, les nœuds lymphatiques (56%), la paroi du gros intestin (55%), les structures du cœur (28 à 40%), les testicules (29%) et la prostate (27%). De plus, les valeurs de AUC<sub>0-tlast</sub> se sont révélées être plus élevées pour les souris *mdr1a/1b* (-/-) que pour les souris *mdr1a* (-/-) pour plusieurs tissus. Les structures du cœur sont parmi les tissus qui ont présentés les plus grandes différences entre les souris double-mutées et simple-mutées (Figure 1).

Pour les structures du cœur, alors qu'une augmentation de 12 à 17% était observée pour les valeurs de AUC<sub>0-tlast</sub> entre les souris *mdr1a* (-/-) et les souris normales, une augmentation de 28 à 40% a été observée entre les souris *mdr1a/1b* (-/-) et les souris normales (Tableau 1, Figure 2). De plus, la Figure 3 présente une section de myocarde provenant d'une souris *mdr1a/1b* (-/-) euthanasiée à un temps de 2 min montrant une distribution dense de grains d'argent dans les cardiomyocytes comparativement au niveau *background* (lame sans tissu, image non présentée). Ceci suggère une distribution intracellulaire de la radioactivité associée au <sup>3</sup>H-dompéridone dans les myocytes.

Tableau 1: Paramètres de pharmacocinétique pour la radioactivité associée au  $^3\text{H}$ -dompéridone dans le plasma et les structures du cœur pour les souris normales, *mdr1a* (-/-) et *mdr1a/1b* (-/-) obtenus par comptage par scintillation liquide.

	Génotype <sup>a</sup>	Paramètres		
		C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g eq/g}$ )	AUC <sub>0-tlast</sub> ( $\mu\text{g eq}\cdot\text{min/g}$ )	% d'augmentation vs souris normales
Plasma	normale	4.13	240	-
	<i>mdr1a</i> (-/-)	3.27	248	3.3
	<i>mdr1a/1b</i> (-/-)	3.87	272	13.3
Ventricule gauche	normale	11.3	334	-
	<i>mdr1a</i> (-/-)	13.3	390	16.8
	<i>mdr1a/1b</i> (-/-)	12.8	426	27.5
Ventricule droit	normale	10.0	300	-
	<i>mdr1a</i> (-/-)	12.6	349	16.3
	<i>mdr1a/1b</i> (-/-)	13.1	420	40.0
Oreillettes	normale	14.3	280	-
	<i>mdr1a</i> (-/-)	12.0	314	12.1
	<i>mdr1a/1b</i> (-/-)	12.2	381	36.1

<sup>a</sup> n=3 par temps pour les souris normales et *mdr1a* (-/-) et n=1 par temps pour les souris *mdr1a/1b* (-/-)

### 3.2.3.2 HPLC avec détection radiométrique

La portion de radioactivité totale associée à la substance mère, le dompéridone, a été évaluée par HPLC avec détection radiométrique également pour certains tissus provenant des souris *mdr1a/1b* (-/-). Le Tableau 2 montre des résultats similaires pour les souris *mdr1a/1b* (-/-) vs les souris *mdr1a* (-/-) bien que pour le temps de 120 min une plus grande proportion associée au dompéridone semblait être présente pour le ventricule gauche des souris double-mutées (11%) vs les souris simple-mutées (7%) vs souris normales (3%). Les résultats pour le cerveau confirme la prédominance de l'isoforme *mdr1a* responsable de la barrière hémato-céphalique (Schinkel et coll., 1994) puisque les résultats pour les souris *mdr1a/1b* (-/-) ne se sont pas avérés plus élevés que les résultats pour les souris *mdr1a* (-/-).



Tableau 2: Pourcentages de radioactivité associée au  $^3\text{H}$ -dompéridone dans le plasma et certains tissus de souris normales, *mdr1a* (-/-) et *mdr1a/1b* (-/-) obtenus par HPLC avec détection radiométrique. (tableau adapté du Tableau 3 de la section 3.1)

Génotype		Temps (min)	
		4	120
Plasma	normale	40.9	0
	<i>mdr1a</i> (-/-)	46.3	0.13
	<b><i>mdr1a/1b</i> (-/-)</b>	<b>dm</b>	<b>dm</b>
Foie	normale	61.8	57.7
	<i>mdr1a</i> (-/-)	63.5	30.4
	<b><i>mdr1a/1b</i> (-/-)</b>	<b>66.6</b>	<b>43.2</b>
Cerveau	normale	0	0
	<i>mdr1a</i> (-/-)	26.6	7.9
	<b><i>mdr1a/1b</i> (-/-)</b>	<b>22.0</b>	<b>5.4</b>
Reins	normale	91.6	26.3
	<i>mdr1a</i> (-/-)	92.2	40.0
	<b><i>mdr1a/1b</i> (-/-)</b>	<b>88.8</b>	<b>44.3</b>
Ventricule gauche	normale	95.0	3.4
	<i>mdr1a</i> (-/-)	96.5	6.9
	<b><i>mdr1a/1b</i> (-/-)</b>	<b>95.9</b>	<b>11.1</b>

Basé sur le temps de rétention du  $^3\text{H}$ -dompéridone

dm = donnée manquante

### 3.2.4 Discussion

L'influence de l'absence de l'isoforme *mdr1b* n'a pas causé de différence notable pour certains tissus, tel que le cerveau, tel que démontré par la comparaison des résultats de HPLC avec détection radiométrique et des valeurs de  $AUC_{0-t_{last}}$  pour les souris *mdr1a/1b(-/-)* et *mdr1a(-/-)*. Par contre, cette absence de l'isoforme *mdr1b* pour les souris double-mutées a semblé augmenter davantage la distribution de dompéridone au cœur probablement dû à la déficience complète de la P-gp dans le processus d'extrusion du dompéridone du myocarde. Ces résultats obtenus pour les souris *mdr1a/1b(-/-)* appuient donc la conclusion énoncée à la section 3.1 que le transporteur P-gp a fort possiblement un rôle dans le contrôle des concentrations intracellulaires cardiaques de xénobiotiques substrats de cette protéine.

De plus, la photographie de micro-autoradiographie a démontré une accumulation intracellulaire de la radioactivité associée au dompéridone dans les cardiomyocytes. Comme discuté précédemment, le site majeur de liaison au canal  $I_{Kr}$ , le canal potassique associé à la prolongation de l'intervalle QT, est intracellulaire (Zou et coll., 1997; Zhang et coll., 1999). Ainsi, l'accumulation intracellulaire de dompéridone dans les myocytes et une distribution cardiaque plus élevée pour les souris *mdr1a(-/-)* et davantage plus élevée pour les souris *mdr1a/1b(-/-)* comparativement aux souris

normales suggèrent que la P-gp pourrait moduler le risque de cardiotoxicités associé au dompéridone.

Les différences dans la distribution du dompéridone au niveau cardiaque entre les souris *mdr1a* (-/-) et normales, et entre les souris *mdr1a/1b* (-/-) et *mdr1a* (-/-) suggèrent que le dompéridone soit substrat des deux isoformes, *mdr1a* et *mdr1b*, codant pour la P-gp. Les résultats suggèrent que ces deux isoformes semblent posséder un rôle dans l'efflux de dompéridone des cardiomyocytes vers le milieu extracellulaire. Ceci est en accord avec une étude précédente qui a suggéré que bien qu'il y avait une prédominance de l'un ou l'autre isoforme pour certains tissus (tel que le cerveau pour lequel *mdr1a* est prédominant), dans d'autres tissus, tel que le cœur, des niveaux similaires d'ARNm de *mdr1a* et *mdr1b* étaient présents (Schinkel et coll., 1994).

Il est à noter que les résultats de distribution tissulaire ( $AUC_{0-t_{last}}$ ) présentés dans cette section pour les souris *mdr1a/1b* (-/-) sont basés sur un effectif de 1 animal par temps de collection (6 temps de collection). Bien que les résultats obtenus soient en accord avec les résultats observés pour les souris *mdr1a* (-/-), une étude avec un effectif plus élevé de souris double-mutées serait requise pour confirmer les résultats obtenus.

### 3.2.5 Conclusion

En conclusion, une distribution cardiaque de dompéridone plus élevée pour les souris *mdr1a/1b* (-/-), déficientes pour les deux isoformes du gène codant pour le transporteur P-gp, comparativement aux souris normales et aux souris *mdr1a* (-/-), appuie la conclusion énoncée pour la section 3.1 que le transporteur P-gp a fort possiblement un rôle dans le contrôle des concentrations intracellulaires cardiaques de ses substrats. Par conséquent, la P-gp pourrait possiblement moduler le risque de cardiotoxicités associé au dompéridone.

### 3.2.6 Références

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJ and Borst P (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* 77:491-502.

Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, and January CT (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* 84:989-998.

Zou A, Curran ME, Keating MT, and Sanguinetti MC (1997) Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 272:H1309-1314.

### 3.2.7 Légende de figures

Figure 1: Comparaison des valeurs de  $AUC_{0-t_{last}}$  pour les concentrations de radioactivité associée au  $^3H$ -dompéridone dans le sang, le plasma et les tissus de souris normales, *mdr1a* (-/-) et *mdr1a/1b* (-/-) suite à une administration intraveineuse de  $^3H$ -dompéridone.

Figure 2: Courbes de concentrations de radioactivité associée au  $^3H$ -dompéridone (moyenne  $\pm$  SEM) dans le plasma et les structures du cœur de souris normales, *mdr1a* (-/-) et *mdr1a/1b* (-/-) suite à une administration intraveineuse de  $^3H$ -dompéridone.

Figure 3: Photographie de micro-autoradiographie provenant d'une coupe de myocarde d'une souris *mdr1a/1b* (-/-) euthanasiée à un temps de 2 min suite à l'administration intraveineuse de  $^3H$ -dompéridone.

Figure 1 :

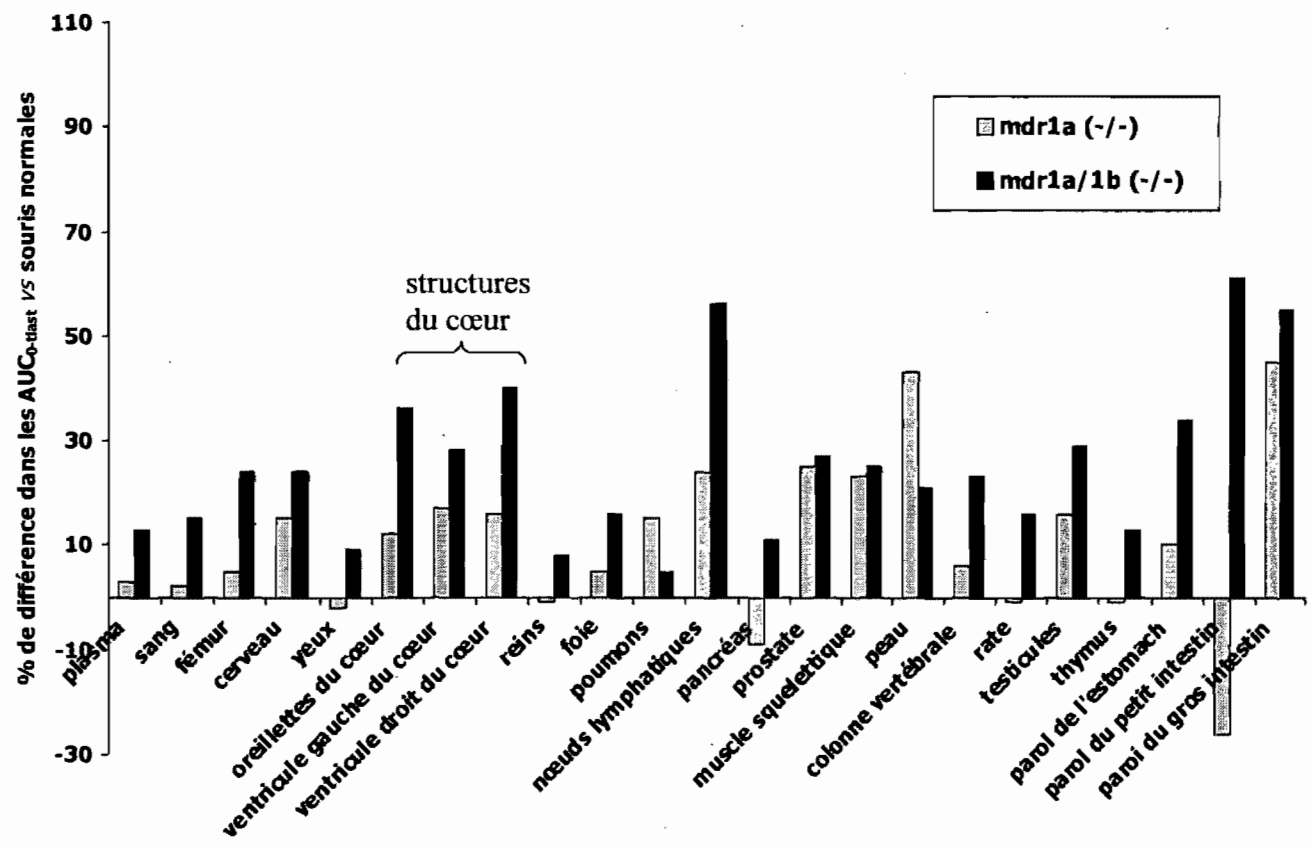


Figure 2:

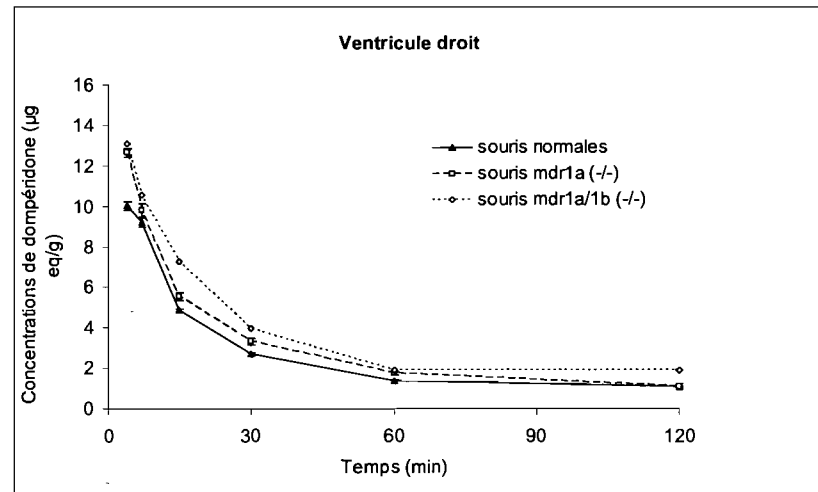
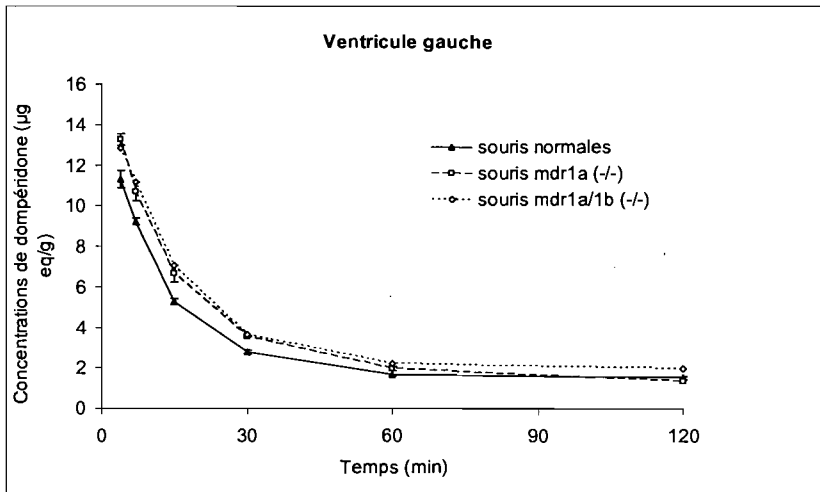
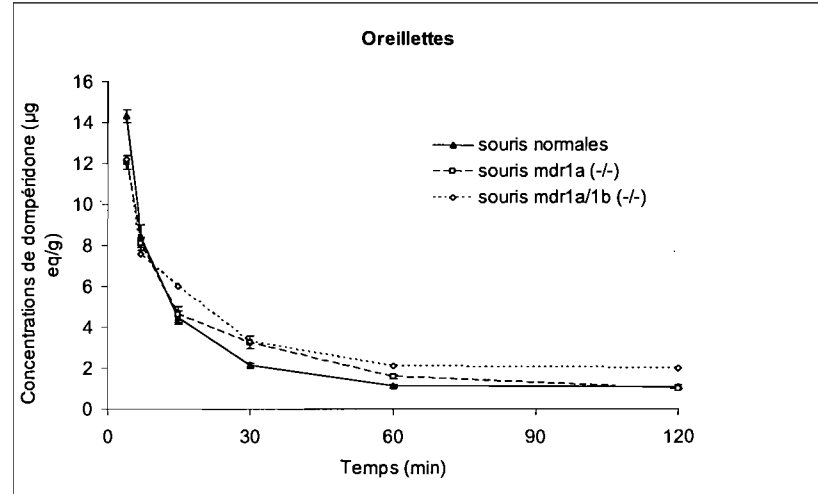
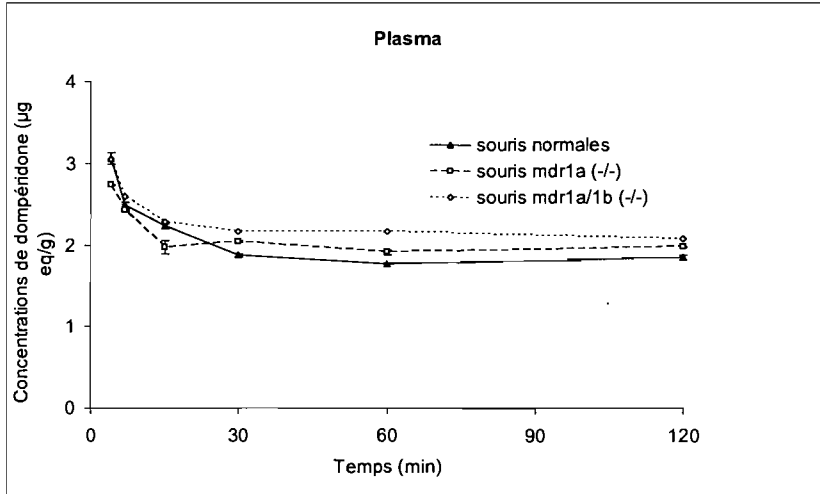
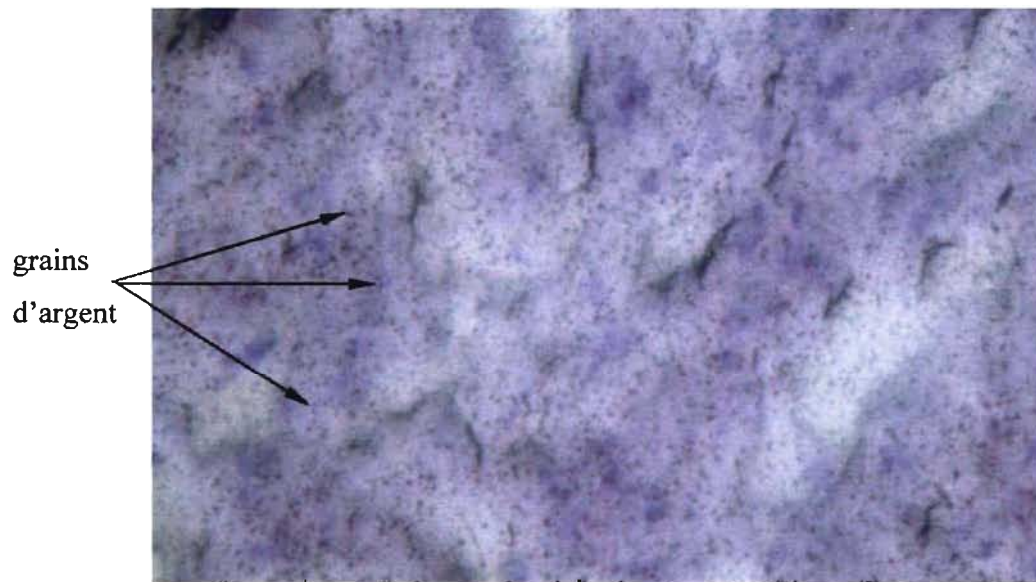




Figure 3:



## **3.3 Résultats additionnels d'identification des métabolites du dompéridone**

### **3.3.1 Introduction**

Dans le cadre de l'étude *in-vivo* dans laquelle des souris normales et mutées pour le gène codant pour le transporteur P-gp ont reçu une administration intraveineuse de <sup>3</sup>H-dompéridone, la technique de HPLC avec détection radiométrique fut utilisée pour évaluer la proportion de radioactivité totale associée à la substance mère pour certains tissus (section 3.1). À partir d'un chromatogramme d'un échantillon de foie, des fractions ont été collectées dans le but d'identifier les métabolites radioactifs présents dans chacune des fractions ainsi que dans des échantillons entiers de foie (l'ensemble des fractions) par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS). Le but de ces analyses LC/MS était de tenter d'identifier les métabolites du dompéridone obtenus dans des échantillons de foie de souris. Contrairement aux sections précédentes 3.1 et 3.2, le but n'était pas de comparer les résultats des différents génotypes.

## 3.3.2 Matériel et méthodes

### 3.3.2.1 HPLC avec détection radiométrique

Voir section 3.1.4.9.

### 3.3.2.2 Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Pour caractériser les métabolites, six fractions furent collectées (fractions 1, 4/5, 7, 8, 9, 10) à partir d'un chromatogramme obtenu par HPLC avec détection radiométrique d'un échantillon de foie de souris *mdr1a* (-/-) euthanasiée à 4 min suite à une administration de <sup>3</sup>H-dompéridone (Figure 1A). La fraction 1 fut également obtenue d'une souris *mdr1a* (-/-) euthanasiée à 120 min. Les fractions furent concentrées 4 fois par évaporation avant d'être analysées par LC/MS en utilisant un appareil MicroMass ZQ (Waters, Milford, MA) et une colonne Xterra MS C<sub>18</sub>, 150 x 2.1 mm, 5 μm (Waters, Milford, MA). Les phases mobiles A et B ont consisté en 0.2% d'acide formique dans l'eau et de 0.2% d'acide formique dans l'acétonitrile, respectivement, avec un débit de 0.25 mL/min. Les phases mobiles ont été délivrées selon un gradient: 90:10 (A:B) au temps zéro, 70:30 (A:B) à 20 min, 90:10 (A:B) de 21 à 30 min. L'interface d'ionisation par

nébulisation électrostatique (*electrospray*) fut ajustée selon les paramètres suivants: voltage du capillaire, 3.5 kV; voltage du cône, 35 V; voltage de radiofréquences des lentilles, 0.2 V; température du quadripôle, 120°C; température de dissolution, 350°C; durée du scan, 0.04 sec. Les données moléculaires ioniques  $[M+H]^+$  furent acquises et analysées par le logiciel MassLinx (Milford, MA).

De plus, une autre analyse LC/MS fut effectuée avec un autre instrument sur des échantillons de foie provenant de souris *mdr1a* (-/-) et normales euthanasiées à 15 min suite à l'administration de  $^3\text{H}$ -dompéridone. Les séparations ont été effectuées sur un HPLC de la série 1100 couplé à un appareil spectromètre de masse de type MSD-TOF (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) opéré en mode positif. La source *electrospray* a été maintenue à 350°C et les voltages appliqués sur le capillaire et le fragmenteur ont été de 4000 V et 300 V, respectivement. La colonne chromatographique fut une Gemini C6-Phenyl, 150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, CA) opérée à 0.5 mL/min. Un gradient rapide passant de 0 à 90% acétonitrile dans l'eau en 5 min, pour un temps total de séparation de 9 min, a permis l'élution. Les spectres de masse ont été enregistrés pour un rapport masse/charge ( $m/z$ ) allant de 100 à 1200 en utilisant le logiciel Mass Hunter (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) et l'analyse de données fut

effectuée à l'aide du logiciel Analyst (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA).

### 3.3.3 Résultats

La Figure 1 présente des chromatogrammes obtenus par HPLC avec détection radiométrique pour des échantillons de foie et de ventricule gauche pour des souris *mdr1a* (-/-) pour les temps de 4 et 120 min. La présence rapide de métabolites radioactifs à 4 min suite à l'administration de  $^3\text{H}$ -dompéridone, particulièrement pour le foie, suggère un métabolisme rapide de ce médicament. Un métabolisme du dompéridone plus important pour les échantillons de foie que pour ceux du ventricule gauche est en accord avec le foie étant un organe principal de métabolisme. Bien que non présentés, des chromatogrammes similaires ont également été obtenus pour les souris normales et *mdr1a/1b* (-/-).

La première série d'expériences d'identification des métabolites par LC/MS fut effectuée à partir des six fractions collectées d'un échantillon de foie de souris *mdr1a* (-/-) euthanasiée à un temps de 4 min. Cette analyse a montré la présence d'au moins 3 métabolites de masse 442 provenant des fractions 4/5, 7, 8

et 9 (Figure 2). Les chromatogrammes et spectres de masse présentés à la Figure 2 suggèrent possiblement un chevauchement de métabolites de masse 442 pour les différentes fractions. Les temps d'élution pour les métabolites de cette masse furent de 15.45 à 17.78 min comparativement à un temps d'élution de 19.43 min pour le dompéridone. La fraction 10, tel qu'anticipé, consistait au dompéridone ( $m/z$  426). Les spectres de masse pour ces métabolites comportaient une signature de chlore, caractérisée par la présence d'un pic à deux unités de masse de plus que le pic principal correspondant à une intensité égale environ au tiers de ce dernier. L'ion chlore étant conservé de la substance mère. Pour la fraction 1, caractérisée par un temps d'élution très rapide par HPLC avec détection radiométrique, il n'a pas été possible d'identifier le ou les métabolite(s) radioactif(s) associé(s) à ce pic (Figure 1). Des analyses de lyophilisation et de chromatographie sur couche mince (résultats non présentés) ont par ailleurs permis de confirmer que cette fraction n'était pas associée à de l'eau tritiée.

La deuxième série d'expériences d'identification des métabolites par LC/MS fut effectuée à l'aide d'un spectromètre de masse plus sensible. L'utilisation de l'instrument de type MSD-TOF a permis l'identification en plus de métabolites de masse 442, des métabolites de masse 618 et 252 à partir des échantillons de foie de souris *mdr1a* (-/-) et normales euthanasiées aux temps de

15 min (Figure 3). Le temps de rétention des métabolites de masse 618 étaient de 3.37 et 3.54 min (le spectre de masse à la Figure 3 n'est présenté que pour l'un de ces deux métabolites isomères) et de 3.65 min pour le métabolite de masse 252, comparativement à un temps de rétention de 3.92 pour le dompéridone. Une signature de chlore était également visible sur les spectres de masse pour ces métabolites (Figure 3). Les fractions 1 obtenues par HPLC avec détection radiométrique à partir d'échantillon de foie de souris *mdr1a* (-/-) euthanasiées à 4 et 120 min ont été analysées avec cet instrument pour tenter d'identifier le ou les métabolite(s) associé(s) à cette fraction. Bien que l'analyse a confirmé que les métabolites précédemment identifiés ( $m/z$  442, 618, 252) n'étaient pas associés à cette fraction 1, des composés de masse 215 (sans signature de chlore) et 263 (avec une signature de chlore) se sont révélés être présents (résultats non présentés). Les structures de ces composés en relation avec le dompéridone n'ont par contre pas été identifiées.

### 3.3.4 Discussion

Les analyses de LC/MS effectuées sur des échantillons de foie provenant de souris normales et *mdr1a* (-/-) ayant reçu une injection intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone ont permis d'identifier au moins trois métabolites de masse 442, deux métabolites de masse 618 et un métabolite de masse 252.

Les analyses ont permis d'identifier des métabolites de masse 442 qui ont consisté en une hydroxylation aromatique du dompéridone. Le métabolite de masse 252 a été obtenu suite à une *N*-déalkylation de la substance mère. Ces métabolites ont été identifiés dans plusieurs recherches antérieures étudiant le métabolisme du dompéridone *in-vitro* (Simard et coll., 2004; Ward et coll., 2004; Michaud et coll., 2006) et *in-vivo* (Meuldermans et coll., 1981). Les métabolites de masse 618 obtenus dans cette analyse représentent une hydroxylation du dompéridone suivit d'une glucuronidation. Bien qu'aucun métabolite de masse 618 n'a été identifié dans le cadre de recherches *in-vitro*, un métabolite de cette masse fut préalablement identifié dans des échantillons de bile provenant de rats, de chiens et d'humains suite à une administration de dompéridone (Meuldermans et coll., 1981): La présence de ces métabolites de masse 618 dans les échantillons de foie de souris pour cette étude est en accord avec l'identification antérieure de ce métabolite au niveau de la bile, étant donné sa synthèse et sa sécrétion par le foie. La Figure 4 présente les différents métabolites du dompéridone et leur structure possible obtenu dans cette étude à partir d'échantillons de foie de souris suite à une administration intraveineuse de <sup>3</sup>H-dompéridone.



Des études *in-vitro* utilisant des microsomes de foie humain suggèrent que les cytochromes de la sous-famille 3A sont les enzymes qui seraient principalement impliqués dans le métabolisme du dompéridone avec une contribution mineure de CYP1A2 et CYP2D6 (Simard et coll., 2004; Ward et coll., 2004).

### 3.3.5 Conclusion

Des métabolites du dompéridone de masse 442 (hydroxylation), 618 (hydroxylation suivit d'une glucuronidation) et 252 (*N*-déalkylation) ont été obtenus à partir d'échantillons de foie de souris euthanasiées à 4 et 15 min suite à une administration intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone. Tel que discuté dans les sections précédentes, des cardiotoxicités tel que le prolongement de l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme ont été rapportés avec la prise du dompéridone. Étant donné le métabolisme du dompéridone par les enzymes CYP3As et le rôle probable du transporteur P-gp dans la modulation des concentrations intracardiaques de dompéridone (section 3.1), l'administration concomitante de ce médicament à des substrats des CYP3A et/ou de la P-gp peut représenter un facteur de risque dans l'incidence de cardiotoxicités associées au dompéridone.

### 3.3.6 Références

Michaud V, Simard C, and Turgeon J (2007) An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to in vitro drug metabolism studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 [Epub ahead of print]

Simard C, Michaud V, Gibbs B, Massé R, Lessard É, and Turgeon J (2004) Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of domperidone. *Xenobiotica* 34:1013-1023.

Meuldermans W, Hurkmans R, Swysen E, Hendrickx J, Michiels M, Lauwers W, and Heykants J (1981) On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man III. Comparative study on the excretion and metabolism of domperidone in rats, dogs and man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 6:49-60.

Ward BA, Morocho A, Kandil A, Galinsky RE, Flockart DA, and Desta Z (2004) Characterization of human cytochrome P450 enzymes catalyzing domperidone N-dealkylation and hydroxylation *in vitro*. *Br J Clin Pharmacol* 58:277-287.

### 3.3.7 Légende de figures

Figure 1: Chromatogrammes obtenus par HPLC avec détection radiométrique d'échantillons de foie (A) et de ventricules gauches (B) de souris *mdr1a* (-/-) euthanasiées à 4 et 120 min suite à l'administration intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone. Le panneau A indique les fractions collectées pour l'analyse LC/MS.

Figure 2: Chromatogrammes et spectres de masse obtenus par LC/MS de fractions collectées d'échantillons de foie pour des souris *mdr1a* (-/-) euthanasiées à 4 min suite à l'administration intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone.

Figure 3: Chromatogrammes et spectres de masse obtenus par LC/MS d'échantillons de foie pour des souris *mdr1a* (-/-) euthanasiées à 15 min suite à l'administration intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone.

Figure 4: Formation des métabolites du dompéridone identifiés par LC/MS dans des échantillons de foie de souris ayant reçues une administration intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone.

Figure 1:

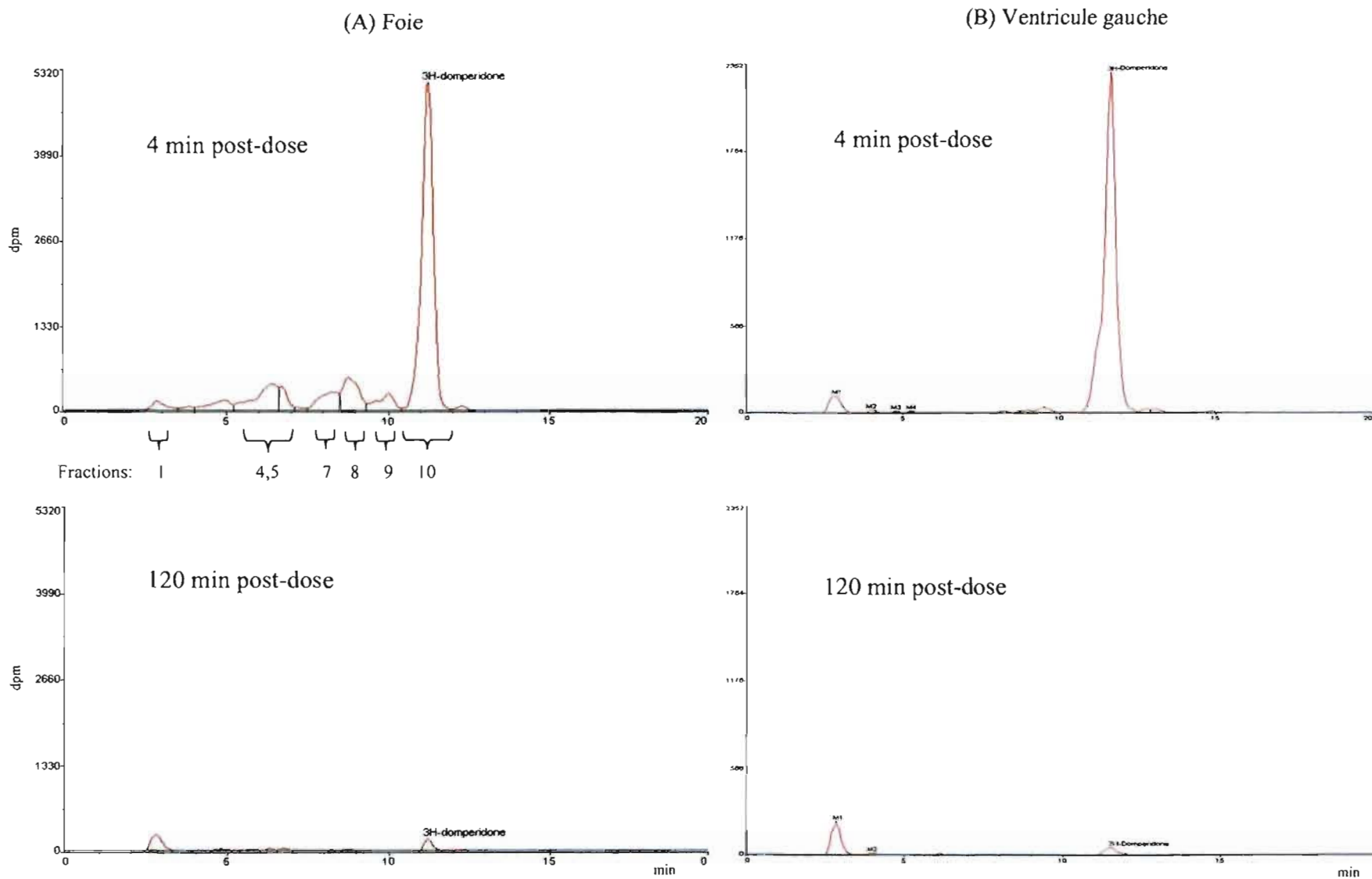


Figure 2:

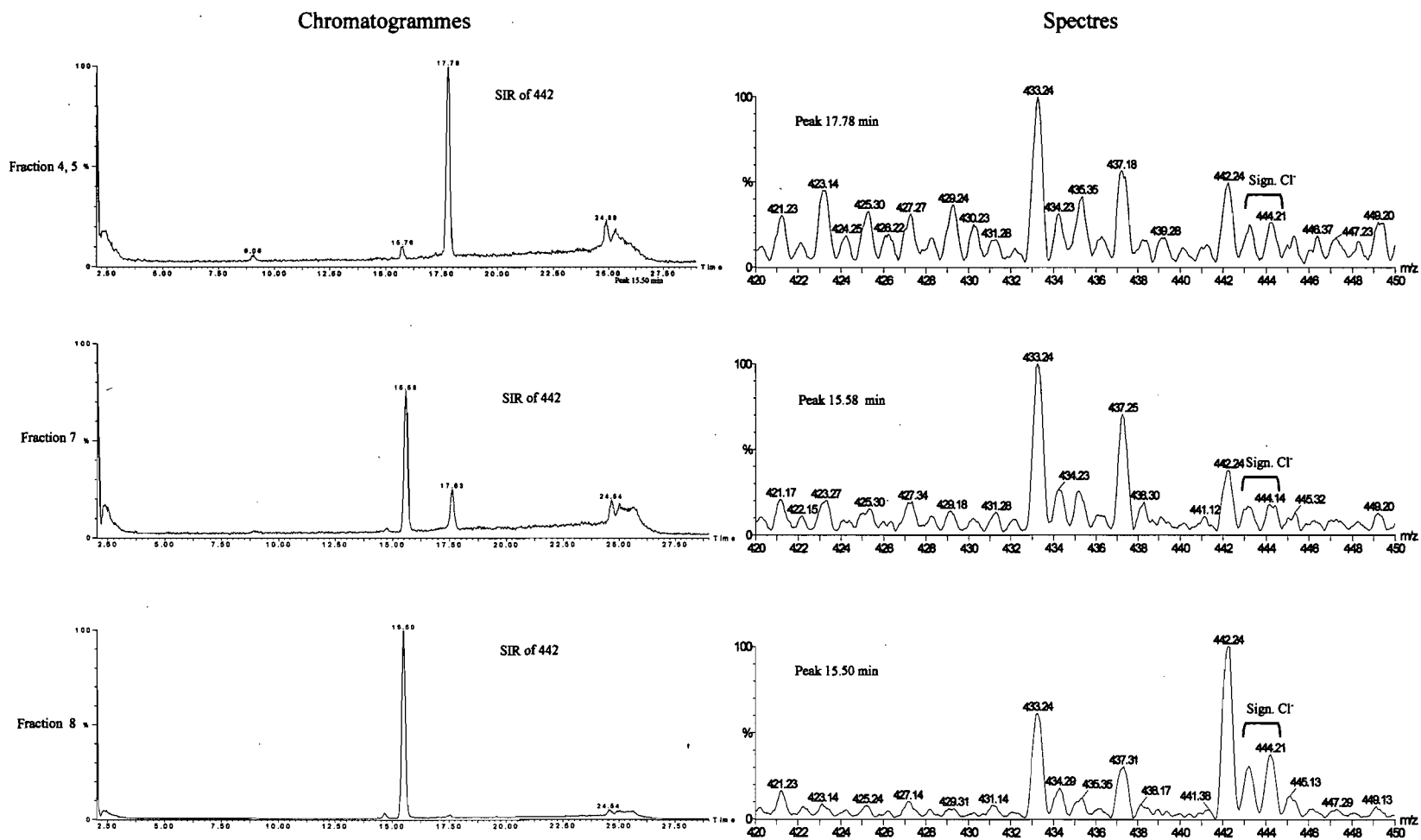


Figure 2 (suite):

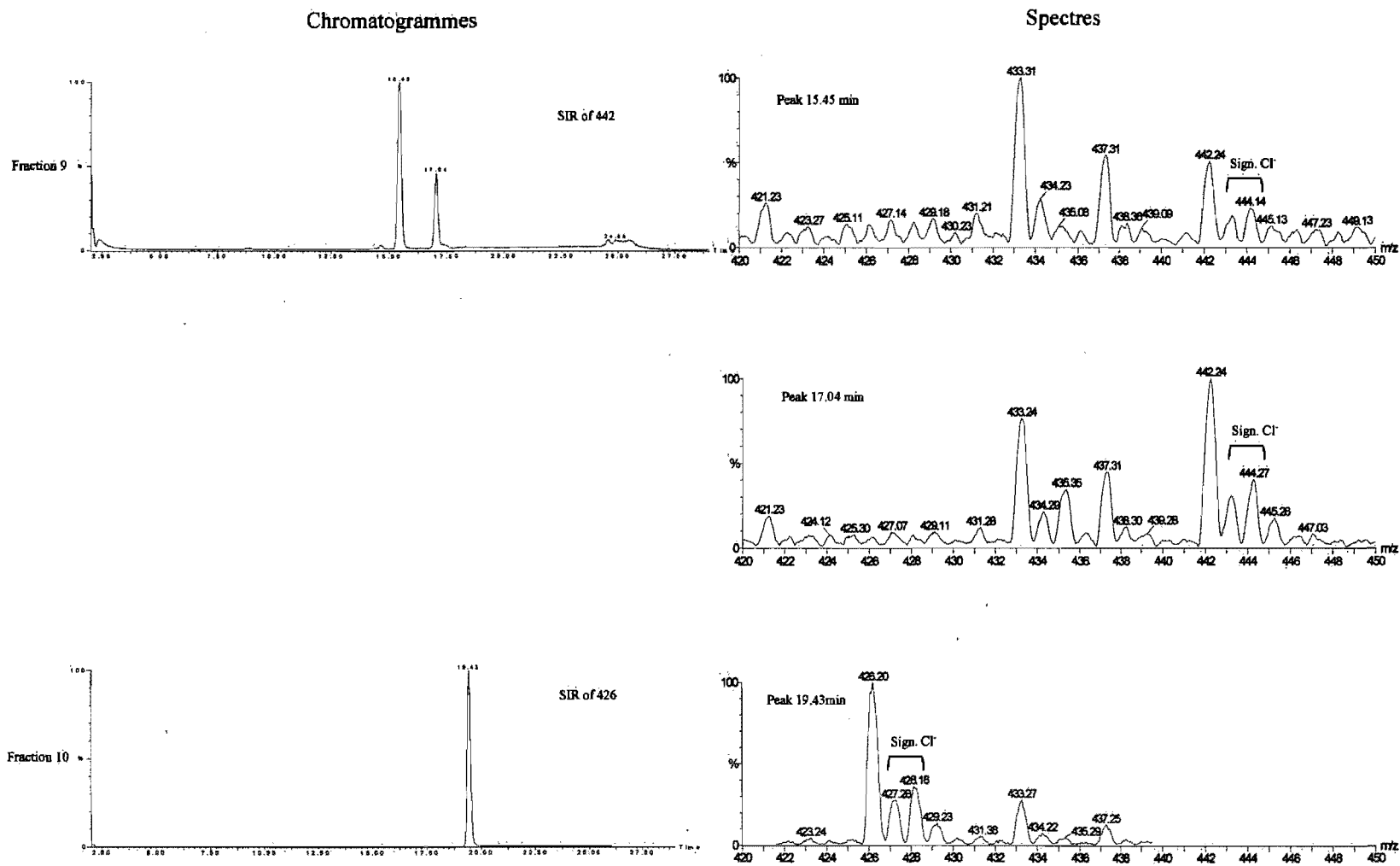


Figure 3:

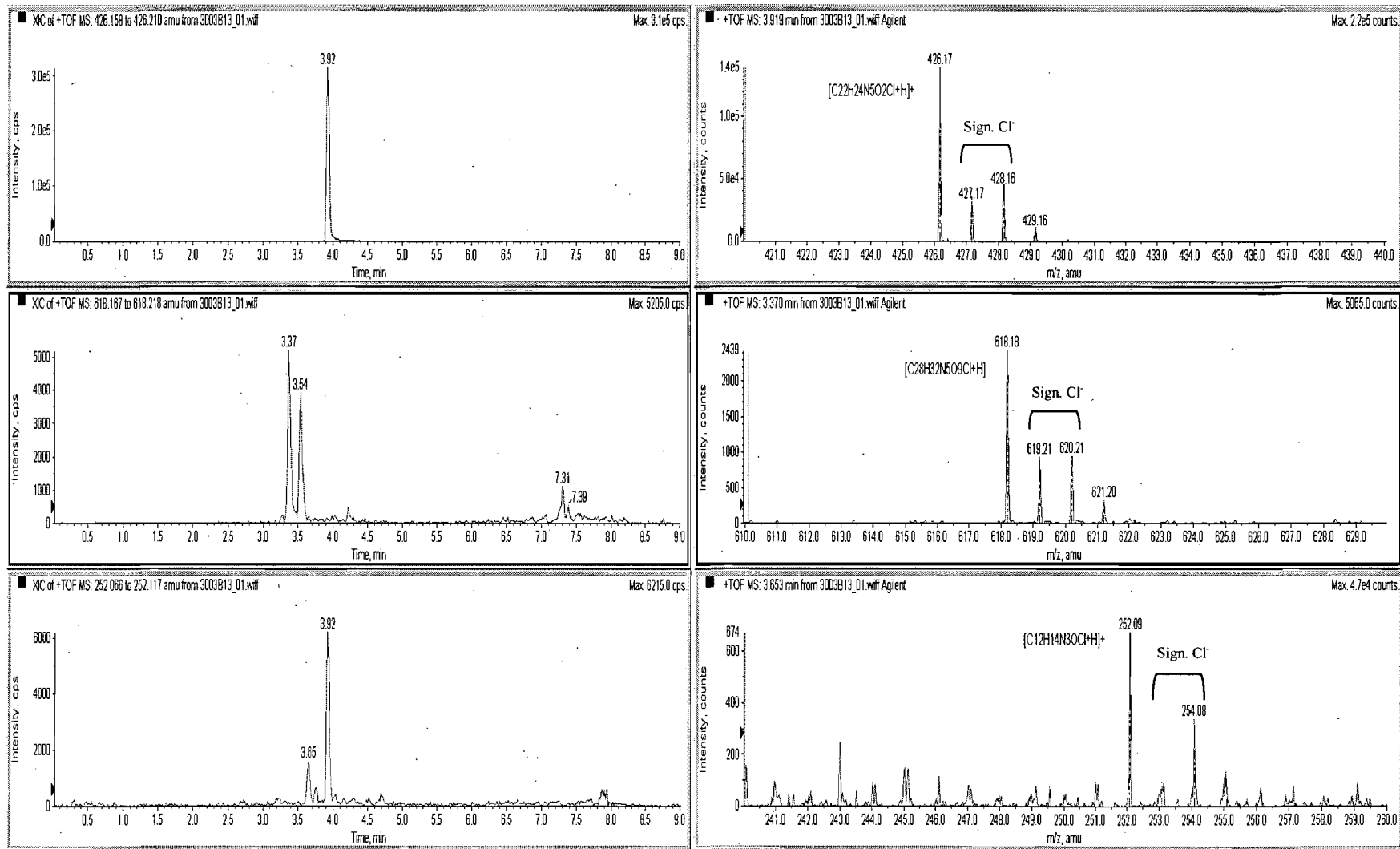
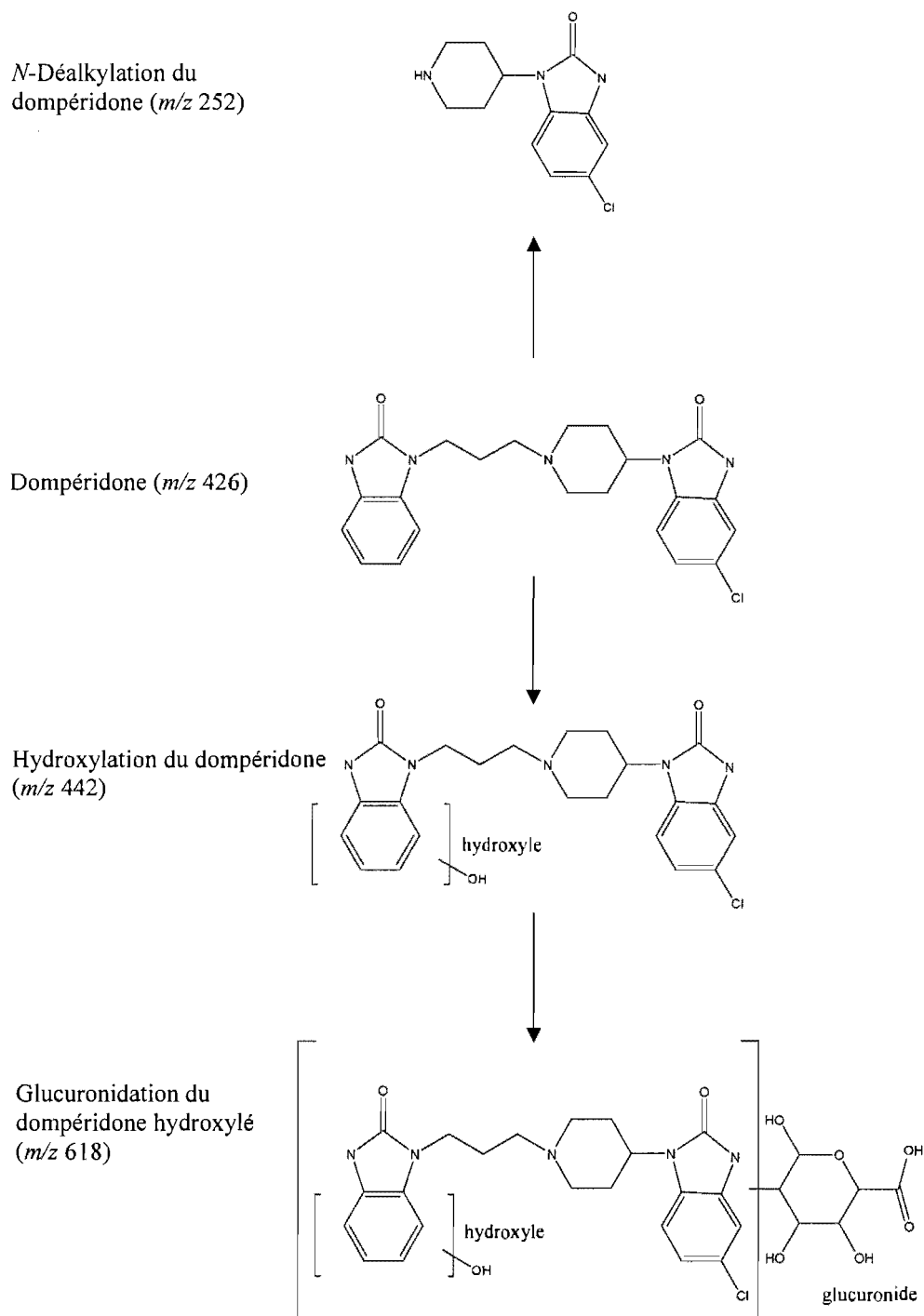


Figure 4:





## **CHAPITRE IV**

**Effets de pré-traitements au vérapamil sur la  
distribution du dompéridone au cœur et autres tissus  
chez des cobayes mâles et femelles et répercussions  
pharmacodynamiques sur l'intervalle QT**

## **4.1 Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone to the heart and other tissues in guinea pigs**

### **4.1.1 Résumé**

Les transporteurs ABC, telle que la P-glycoprotéine (P-gp), sont exprimés dans différents tissus incluant le cœur. Le but de notre étude était de déterminer si le vérapamil, un modulateur de la P-gp, pouvait altérer la distribution du dompéridone, un substrat de la P-gp, au cœur et aux autres tissus suite à deux types de pré-traitement : 1) une dose de vérapamil (11.6 mg/kg i.p.) administrée 2 h avant l'administration du dompéridone pour évaluer l'inhibition compétitive entre les deux substrats de la P-gp; 2) un pré-traitement de 5 jours au vérapamil (11.6 mg/kg i.p.) pour évaluer la modulation potentielle de l'expression de la P-gp ou de son activité. Suite à une injection de  $^3\text{H}$ -dompéridone (2.5 mg/kg i.p.) aux cobayes mâles et femelles (n=60), les animaux furent sacrifiés à 9 différents temps jusqu'à 7 h post-administration. Les tissus ont été prélevés et analysés par comptage par scintillation liquide pour déterminer les niveaux de radioactivité associés au  $^3\text{H}$ -dompéridone. Les  $\text{AUC}_{0-60}$  pour les ratios de concentrations tissu/plasma ont augmenté pour les structures du cœur (de 13 à 22%) et pour les autres tissus (jusqu'à 59%) pour les animaux pré-traités au vérapamil 2 h avant l'administration du dompéridone vs les animaux contrôles (non pré-traités). Il n'y a pas eu de différence notable observée

entre les animaux pré-traités au vérapamil pour 5 jours vs les animaux contrôles. Des différences entre genres ont été observées pour la distribution tissulaire du dompéridone puisque les  $AUC_{0-60}$  pour les ratios de concentrations tissu/plasma se sont révélés être plus importants pour les mâles vs les femelles pour 61 des 69 tissus (trois conditions de pré-traitement). Nos résultats suggèrent que l'inhibition compétitive pour les transporteurs ABC, telle que la P-gp, par le vérapamil peut mener à une distribution cardiaque plus importante pour les médicaments substrats de ces transporteurs.

Mots-clés: dompéridone, vérapamil, P-glycoprotéine, cœur, distribution, inhibition, modulation, interactions médicamenteuses, genre

### 4.1.2 Abstract

ABC transporters such as P-glycoprotein (P-gp) are expressed in various tissues including the heart. The aim of our study was to determine whether verapamil, a P-gp modulator, would alter the distribution of domperidone, a P-gp substrate, to the heart and other tissues following two types of pre-treatments: 1) a single dose of verapamil (11.6 mg/kg i.p.) administered 2 h prior to the administration of domperidone to assess competitive inhibition between the two P-gp substrates; 2) a 5 day pre-treatment with verapamil (11.6 mg/kg/day i.p.) to assess potential modulation of P-gp expression or activity. Sex-specific differences were assessed. Following an injection of  $^3\text{H}$ -domperidone (2.5 mg/kg i.p.) to male and female guinea pigs (n=60), animals were sacrificed at 9 timepoints up to 7 h post-dose. Tissues were excised and processed by liquid scintillation spectroscopy to determine  $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity levels.  $\text{AUC}_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratios were increased in heart structures (from 13 to 22%) and other tissues (up to 59%) of animals pre-treated with verapamil 2 h prior the administration of domperidone compared to controls (non pre-treated animals). No differences relative to controls were observed for animals pre-treated with verapamil for 5 days. Tissue distribution of domperidone appeared sex-specific with  $\text{AUC}_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratios greater in males vs females in 61 out of 69 tissues (three pre-treatment conditions). Our results suggest that competitive inhibition of drug efflux transporters such as P-gp by

verapamil may lead to increased cardiac distribution of drugs that are substrates of such transporters.

Keywords: domperidone, verapamil, P-glycoprotein, heart, distribution, inhibition, modulation, drug interactions, gender

### 4.1.3 Introduction

Domperidone (5-chloro-1-{1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidinyl}-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one) is used clinically as an antiemetic agent. Its antiemetic action is due to blockade of peripheral dopamine receptors.<sup>1</sup> Indeed, domperidone does not cross the blood-brain barrier to any appreciable degree and so exerts relatively little effects on cerebral dopaminergic receptors.<sup>2-4</sup> However, severe adverse cardiac effects including prolongation of the QT interval, ventricular arrhythmias, and cardiac arrest have been observed with the use of domperidone in man.<sup>5,6</sup> A block of the rapid component of the delayed-rectifier potassium current ( $I_{Kr}$ ) in a concentration dependent manner has been proposed to explain these drug-induced cardiac toxicities.<sup>7</sup> The binding site of drugs to  $I_{Kr}$  in cardiac ventricular myocytes is intracellular.<sup>8,9,10</sup> Consequently, factors that regulate the intracellular concentration of  $I_{Kr}$  blocker represents a key determinant of drug action and toxicities.

*In-vitro* experiments have demonstrated that domperidone is a good substrate of the ATP-binding cassette (ABC) transporter, P-glycoprotein (P-gp).<sup>11,12</sup> The ABC transporter superfamily comprises around fifty members which are ATP-dependent efflux proteins. ATP hydrolysis is required to translocate substrates against a concentration gradient from the intracellular toward the extracellular regions. P-gp

thought at first to be confined to tumor cells, was subsequently found to be located in normal tissues such as at the apical surface of liver hepatocytes, in proximal tubular cells of kidneys and in enterocytes of intestines.<sup>13-17</sup> Therefore, given the importance of these tissues in drug absorption, metabolism and excretion, it was rapidly conceived that P-gp had an important influence on drug disposition and detoxification of the organism by excreting its substrates into bile, urine and intestine contents. The expression of ABC transporters such as P-gp has also been reported in various other tissues including the heart.<sup>18</sup>

The aim of the study described herein was to determine effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone to the heart and other tissues. Two types of verapamil pre-treatments were compared with results obtained from control animals: 1) a single dose of verapamil was administered 2 h prior to the administration of domperidone to assess competitive inhibition between the two P-gp substrates; 2) a 5 day pre-treatment with verapamil to assess potential regulation of P-gp expression or activity. Sex-specific differences were assessed.

## 4.1.4 Methods

### 4.1.4.1 Chemicals

Unlabeled domperidone (99.7% purity by HPLC) was purchased from MP Biomedicals (Aurora, OH).  $^3\text{H}$ -domperidone was synthesized at Perkin Elmer (Boston, MA) by the reduction of a brominated precursor obtained from the bromination of domperidone. The specific activity was 1787 GBq/mmol (4195.8 MBq/mg) and the radiochemical purity was greater than 98% by HPLC with radiometric detection. Verapamil hydrochloride (99% purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). The purity of verapamil hydrochloride was more than 99% by perchloric acid titration. Hionic fluor was obtained from Perkin Elmer (Boston, MA). All other chemicals were of analytical grade appropriate for HPLC.

### 4.1.4.2 Animals

Adult male and female Hartley guinea pigs (*Cavia porcellus*, CrI:(HA)BR-Hartley) were received from Charles River Canada (St-Constant, Quebec, Canada) and were acclimated to the laboratory environment for approximately 1 week prior to treatments. On the day of  $^3\text{H}$ -domperidone treatment, the male and female Hartley



guinea pigs were 33 to 55 days of age, with body weights ranging from 294 to 374 g and 296 to 346 g for male and female, respectively. Environmental conditions during the conduct of the study were controlled at a temperature and relative humidity of  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  and  $50 \pm 20\%$ , respectively. The photoperiod was 12 h light and 12 h dark except when interrupted due to scheduled activities. All animals had free access to a standard certified pelleted commercial laboratory diet (PMI Certified Rodent Chow 5002: PMI Nutrition International) and tap water except during designated procedures. The research was in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Research Council (NRC publication, revised 1996).

#### **4.1.4.3 Dose formulation**

The  $^3\text{H}$ -domperidone dose formulation was prepared by combining radiolabeled and unlabeled test articles in vehicle (0.007 M lactic acid in saline) to achieve a target concentration of 0.5 mg/mL and a target radioactivity concentration of 3.15 MBq/mL. The dose formulation was prepared in order to deliver a dose level of 2.5 mg/kg of domperidone and a radioactivity level of 5 MBq per animal in a dose volume of 5 mL/kg. The verapamil pre-treatment dose formulation was prepared by dissolving verapamil in vehicle (0.9% sodium chloride) to achieve a target

concentration of 2.32 mg/mL in order to deliver 11.6 mg/kg in a dose volume of 5 mL/kg.

#### 4.1.4.4 Study design

Three groups of animals were administered 2.5 mg/kg (i.p.) of  $^3\text{H}$ -domperidone. The control group received no verapamil pre-treatment. One group of animals received 11.6 mg/kg (i.p.) of verapamil 2 h prior the administration of  $^3\text{H}$ -domperidone and the other group received a pre-treatment of 5 days with 11.6 mg/kg/day (i.p.) of verapamil prior to the administration of  $^3\text{H}$ -domperidone on the sixth day (24 h after the last verapamil administration). The dose delivered to each animal was calculated on the basis of the net weight of dosage formulation expelled from the syringe and on the basis of the radioactivity concentration in the dose formulation. One male and one female animal per timepoint/group were euthanised by exsanguination under isoflurane anesthesia and blood collected from the abdominal aorta at 4, 7, 12, 20, 35, 60 min and 2, 4 and 7 h post-dose. Approximately thirty tissues and organs including heart structures [atria (left and right together), left ventricle and septum (together), right ventricle], were collected from each animal. Blood was centrifuged at 3500 rpm (approximately 2000 g) and 4°C for approximately 10 minutes to obtain plasma. Selected tissues or samples (plasma, right kidney, right part of the brain, liver right lateral lobe and caudate, left ventricle homogenate, right ventricle homogenate) from each animal were stored at -

80°C pending HPLC analysis. One additional male and female animals per group was euthanised by an intravenous injection of Euthanyl® (approximately 275 mg/kg) into the jugular vein at 5 min post-dose and prepared for whole-body autoradioluminography (WBA).

#### **4.1.4.5 Liquid scintillation spectroscopy**

Duplicate aliquots of blood (100 µL) were sampled for radioactivity analysis and solubilized (with Soluene-350, Boston, MA), decolorized and mixed with liquid scintillation fluid (10 mL) for radioactivity measurement. Duplicate aliquots of plasma (100 µL) were mixed directly with liquid scintillation fluid. Whole tissues (except for heart left and right ventricles which were homogenized in water (2 w/v)) were processed by solubilization in 35% tetraethylammonium hydroxide (Perkin Elmer, Boston, MA) and the solubilized samples, or duplicate aliquots were then mixed with liquid scintillation fluid for radioactivity measurement. Large intestine contents were homogenized in a known volume of water. Duplicate weighed aliquots (300 µL) of heart left and right ventricles homogenates, large intestine content homogenates, stomach contents and small intestine contents were solubilized in 35% tetraethylammonium hydroxide and mixed with liquid scintillation fluid for radioactivity measurement. <sup>3</sup>H-domperidone-related radioactivity was measured using a Wallac scintillation counter (model 1414) and the software WinSpectral

version 2.0 (Perkin Elmer, Turku, Finland). Samples were counted for 5 minutes or to a two-sigma error of 0.1%, whichever occurred first. All counts were converted to absolute radioactivity (dpm) by automatic quench correction based on the shift of the spectrum for the external standard.

#### **4.1.4.6 Whole-body autoradioluminography (WBA)**

Following euthanasia, animals were prepared for WBA as described by Ullberg.<sup>19</sup> Carcasses were deep frozen in a mixture of hexane and dry ice for 10 minutes and then embedded in 2% carboxymethylcellulose (CMC) medium. The animal specimen block was sectioned using the Leica CM 3600 cryomicrotome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany) to obtain 30  $\mu\text{m}$  sagittal sections. Sections were freeze-dried and then exposed to tritium imaging plates (Fuji Medical Systems, Stamford, CT) for 5 days in a lead box to minimise background radiation artefacts. Following exposure, the imaging plates were read by the Fuji BAS-2500 scanner using the Fuji Image Reader software version 1.1. (Fuji Medical Systems, Stamford, CT) and autoradioluminograms were obtained.

#### 4.1.4.7 HPLC with radiometric detection

Selected tissue samples were homogenized in ultra pure water (1.5 w/v). Proteins were precipitated from the selected tissue samples and plasma by the addition of an equal volume of acetonitrile and centrifuged for 10 min at 4°C. The supernatant was filtered using a 0.45 µm nylon membrane prior to analysis of a 40 µL aliquot by HPLC (1100 series Agilent Technologies, Palo Alto, CA) with on-line radiometric detection (Canberra Packard 500TR Scintillation Flow Analyzer, Meriden, CT)). Data were acquired by Millennium software version 4.0 (Waters, Milford, MA) and processed with Flo-One software version 3.60 (Perkin Elmer, Boston, MA). The radiolabeled parent drug and metabolites were separated using a Phenomenex C<sub>18</sub> column, 250 x 4.6 mm (5 µm particle size), CIV-049 (Torrance, CA) operated at 30°C using methanol, acetonitrile and 0.01 M disodium citrate pH 3.4 (35:10:55 v/v) containing 1.5 mL/L of triethylamine as the mobile phase A, and methanol as the mobile phase B. The gradient profile was: 100:0 (A:B) from 0 to 1 min, 40:60 (A:B) from 7 to 12 min, and 100:0 (A:B) from 15 to 20 min at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was delivered at a flow rate of 3 mL/min.

#### **4.1.4.8 Data analysis**

All radioactivity measurements were entered into a standard computer database program (Debra version 5.2) for the calculation of concentrations of radioactivity. Blood, plasma and tissue concentrations of radioactivity in dpm/g or kBq/g were expressed as mass eq/g on the basis of the measured specific activity (dpm/mg) of radiolabeled and unlabeled domperidone in the dose formulation. Non-compartmental disposition kinetics of radioactivity in blood, plasma and tissues was determined using Winnonlin version 3.2 (Pharsight Corporation, Cary, NC). The  $AUC_{0-60}$  was calculated by application of the trapezoidal rule.<sup>20</sup>

### **4.1.5 Results**

#### **4.1.5.1 Metabolite profiling by HPLC with radiometric detection**

Analysis of the total radioactivity can be complicated by the rapid metabolism of  $^3\text{H}$ -domperidone into radiolabeled metabolites. Therefore, we performed HPLC analysis with radiometric detection to determine the amount of the radiolabeled parent drug domperidone and metabolites in plasma and selected organs. Results from chromatograms demonstrated that 20 min after the administration of  $^3\text{H}$ -domperidone, approximately 30% and 50% of radioactivity detected in plasma and liver, respectively, was attributed to the parent domperidone. This suggested a very

rapid metabolism of domperidone. For kidneys and the right ventricle of the heart, domperidone accounted for approximately 55% and for 90 to 100%, respectively, of the radiolabeled compounds detected at 20 min post-dose. For all samples analysed, except for plasma and liver, chromatograms showed that post-dose radioactivity was predominantly associated to the parent drug domperidone for up to 60 min (results not shown). Therefore, AUC from 0 to 60 min post-dose ( $AUC_{0-60}$ ) for tissue-to-plasma concentration ratios of  $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity were calculated and are presented in Figure 1 (n=6 guinea pigs per treatment group). Tissue-to-plasma concentration ratios were compared to assess the actual distribution to tissues.

#### **4.1.5.2 General tissue distribution of $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity in male and female guinea pigs**

Following single intraperitoneal injection of  $^3\text{H}$ -domperidone, radioactivity was rapidly distributed into tissues of male and female guinea pigs. In control male and female animals as well as in verapamil pre-treated animals, the highest  $AUC_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratios of  $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity were obtained in the mesenteric lymph nodes, pancreas, intestine walls, liver, kidneys and spleen (Figure 1). For females, ovaries and uterus also presented high levels. The lowest levels were found in the spinal cord, brain and eyes. An autoradioluminogram of a sagittal section from an animal euthanized at 5 min post-

dose confirms the rapid distribution of  $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity into tissues (Figure 2).

Radioactivity concentrations retrieved in intestine contents (up to approximately 65% of the dose at 4 h post-dose for the large intestine) and in the gallbladder suggest that biliary elimination was a substantial route of elimination for all pre-treatment conditions (data not shown). Concentrations retrieved in kidneys suggest that urinary excretion also contributed to the elimination of  $^3\text{H}$ -domperidone-related radioactivity (Figure 1).

#### **4.1.5.3 Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone in whole-body tissues in male and female guinea pigs**

For both male and female animals, higher  $\text{AUC}_{0-60}$  values were generally observed in tissues of animals pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone administration compared to control animals or animals pre-treated with verapamil for 5 days. Indeed, the  $\text{AUC}_{0-60}$  values for guinea pigs pre-treated with verapamil 2 h prior domperidone were higher (up to 59%) for 44 out of 50 tissues (males and females) compared to control animals, whereas  $\text{AUC}_{0-60}$  values were similar between animals pre-treated with verapamil for 5 days and control animals as shown by their



AUC<sub>0-60</sub> ratios close to 1 (Figures 4A and 4B). For males, the greatest differences for AUC<sub>0-60</sub> values between animals pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone and control animals were observed for lymph nodes (53%), adipose tissue (42%), testes (40%), intestine wall (22 to 29%) and liver (30%). For females, the greatest differences between animals pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone and control animals were observed for adipose tissue (59%), liver (28%), stomach wall (37%) and thyroid gland (31%). In contrast to other tissues, ovaries and uterus did not present higher AUC<sub>0-60</sub> values following a pre-treatment with verapamil 2 h prior to domperidone, whereas lower AUC<sub>0-60</sub> values were observed following a pre-treatment for 5 days with verapamil for these tissues (reduced by 15 to 18%) compared to control animals. Moreover, comparison between sex showed that for all verapamil pre-treated and control guinea pigs, tissue-to-plasma concentration ratios were greater in male animals compared to females for 61 out of 69 tissues (three pre-treatment conditions) (Figure 4C).

HPLC analysis with radiometric detection showed that domperidone did not distribute into the brain of control guinea pigs or guinea pigs pre-treated with verapamil for 5 days whereas it did distribute in brain of animals pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone. Indeed, for animals from this group, a peak on chromatograms was observed for the retention time associated to the parent drug domperidone (data not shown).

#### **4.1.5.4 Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone in the heart in male and female guinea pigs**

For both male and female guinea pigs, tissue-to-plasma concentration ratios for heart structures were generally higher for animals pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone compared to control animals or animals pre-treated with verapamil for 5 days (Figures 3, 4A and 4B). The  $AUC_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratios for guinea pigs pre-treated with verapamil 2 h prior domperidone are higher in heart structures for both males and females (from 13 to 22%) compared to control animals (Figures 3, 4A and 4B).  $AUC_{0-60}$  values were similar between animals pre-treated with verapamil for 5 days and control animals as demonstrated by their  $AUC_{0-60}$  ratios close to 1. Comparison between sex showed that for all verapamil pre-treated and control guinea pigs, the  $AUC_{0-60}$  values were higher (up to 16%) for heart structures of male animals compared to females (Figure 4C).

#### **4.1.6 Discussion**

This study examined the effect of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone in whole-body tissues with a special look at the heart. We compared results from non pre-treated guinea pigs (control) to animals receiving a single dose

of verapamil 2 h prior to domperidone administration (competitive inhibition) or receiving a pre-treatment of 5 days with verapamil (modulation). Results showed that a pre-treatment with verapamil 2 h prior to domperidone administration increased the distribution of domperidone in most tissues, including the heart, for both male and female animals. A pre-treatment of 5 days with verapamil prior domperidone administration did not generally modify the tissue distribution of domperidone for both male and female guinea pigs. Distribution of domperidone was greater in tissues, including the heart, of male animals compared to females for all pre-treatment groups. The higher  $AUC_{0-60}$  based on tissue-to-plasma concentration ratios observed in animals pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone suggested that the higher tissue distribution of domperidone was not only a consequence of higher plasma levels but due to an actual increase in the retention of domperidone in the heart and other tissues.

Domperidone and verapamil are recognised P-gp substrates. The measurement of higher  $AUC_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratios in most tissues of animals pre-treated with verapamil 2 h prior domperidone is consistent with a competitive inhibition by verapamil of the P-gp transporter. Consequently, the deficiency in the efflux of domperidone from the inside toward the outside of tissue cells led to the increase in the tissue distribution and retention of domperidone. The higher  $AUC_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratio in intestine walls of animals

pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone administration compared to control animals is also consistent with a deficiency in the efflux of domperidone from enterocytes toward the lumen of intestines due to inhibition by verapamil of the transporter. Accordingly, this resulted in lower percent of dose in small intestine contents of these verapamil pre-treated guinea pigs compared to control animals (data not shown).

It is known that domperidone does not cross the blood-brain barrier.<sup>2,3</sup> Thus, we would have expected verapamil to increase the distribution of domperidone into the brain since P-gp is a main component of the blood-brain barrier preventing accumulation of xenobiotics in the brain.<sup>21</sup> Although no differences were observed between AUC<sub>0-60</sub> values for total <sup>3</sup>H-domperidone-related radioactivity for verapamil pre-treated and control animals, HPLC with radiometric detection results demonstrated that the parent drug domperidone did cross the blood-brain barrier only in animals pre-treated with verapamil 2 h prior to domperidone.

The higher AUC<sub>0-60</sub> for tissue-to-plasma concentration ratios for male compared to female animals were observed even in non pre-treated guinea pigs (control). The more important distribution for males than for females cannot be explained due to conflictual results in the literature.<sup>22-24</sup> Further research is required to clarify sex-specific differences in P-gp expression in whole-body tissues.

Our experiments showed that the P-gp inhibitor verapamil when administered 2 h prior to domperidone caused a slight accumulation of domperidone in the heart probably due to the impairment of the ATP-dependent P-gp-related drug efflux. The more important distribution observed in the heart structures of those verapamil pre-treated guinea pigs are in accordance with a previous study reporting increased myocardial uptake of idarubicin, a P-gp substrate, following the co-administration of verapamil in isolated perfused rat heart.<sup>25</sup> The inhibition of myocardial P-gp efflux transport by verapamil could have clinical implications for predicting potential drug interactions with other P-gp substrates, especially if they are  $I_{kr}$  blockers such as domperidone. Recently, the risk of QT prolongation has been recognised Medecines Control Council<sup>26</sup> following the concomitant administration of domperidone and ketoconazole, which is a P-gp inhibitor.<sup>27,28</sup> Prolongation of the QT interval was not observed when domperidone was administered alone. Cases of increased concentrations of drugs in the heart and/or cardiotoxicities occurring following the administration of concomitant P-gp substrates confirm the substantial role of this protein in the transport of xenobiotics in the heart.<sup>18</sup>

The absence of an effect of the 5 day verapamil pre-treatment on cardiac and tissue distribution of domperidone suggested that P-gp expression was likely not modulated by verapamil *in-vivo*. In a previous study, isolated cardiomyocytes treated

with cisapride, a P-gp substrate, showed higher intracellular concentrations of this drug when guinea pigs were pre-treated for 5 days with verapamil compared to non pre-treated animals.<sup>29</sup> These contradictory results may be explained by the different drug substrate or experimental techniques. A previous *in-vitro* study showed an increased level of P-gp after 10 days of verapamil administration although no increase in the transcript levels was detected.<sup>30</sup> It was not possible in our study to measure the level of expression of P-gp following verapamil pre-treatments due to the unavailability of membrane transporter antibodies for the guinea pig. Further research is required to elucidate the role of verapamil in the modulation of the expression or activity of P-gp and other membrane transporters.

In conclusion, a pre-treatment of verapamil 2 h prior to domperidone facilitated the distribution of domperidone to the heart and other tissues whereas a pre-treatment with 5 days of verapamil had generally no effects on tissue distribution of domperidone. Our results suggest that competitive inhibition of drug efflux transporters such as P-gp by verapamil may lead to increased cardiac distribution of drugs that are substrates of such transporters.

### **4.1.7 Acknowledgments**

The study was supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and Stroke Foundation of Quebec. We would like to thank Rx&D's Health Research Foundation and the Faculté de pharmacie of the Université de Montréal for the Robert-Dugal grant awarded to Lucie Couture. The authors would like to thank Geneviève Coutu, Marielle Bouchard, Marcel Lafleur, Dominic Rivet, Lara M. Castro and their team from Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal Inc. for their technical support.

### 4.1.8 References

1. Van Nueten JM, Ennis C, Helsen L, Laduron PM, Janssen PAJ. 1978. Inhibition of dopamine receptors in the stomach: an explanation of the gastrokinetic properties of domperidone. *Life Sci* 23:453-458.
2. Brogden RN, Carmine AA, Heel RC, Speight TM, Avery GS. 1982. Domperidone. A review of its pharmacological activity, pharmacokinetics and therapeutics efficacy in the symptomatic treatment of chronic dyspepsia and as an antiemetic. *Drugs* 24:360-400.
3. Barone JA. 1999. Domperidone: a peripherally acting dopamine<sub>2</sub>-receptor antagonist. *Ann Pharmacother* 33:429-440.
4. Prakash A, Wagstaff AJ. 1998. Domperidone. A review of its use in diabetic gastropathy. *Drugs* 56:429-445.
5. Osborne RJ, Slevin ML, Hunter RW, Hamer J. 1985. Cardiac arrhythmias during cytotoxic chemotherapy: role of domperidone. *Hum Toxicol* 4:617-626.



6. Bruera E, Villamayor R, Roca E, Barugel M, Tronge J Chacon R. 1986. QT interval prolongation and ventricular fibrillation with i.v. domperidone. *Cancer Treat Rep* 70:545–546.
7. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. 2000. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation* 102:1883-1885.
8. Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. 1997. Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 272:H1309-H1314.
9. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. 1999. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* 84:989-998.
10. Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. 2000. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 97:12329-12333.

11. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524.
12. El Ela AA, Hartter S, Schmitt U, Hiemke C, Spahn-Langguth H, Langguth P. 2004. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds-implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J Pharm Pharmacol* 56:967-975.
13. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7735-7738.
14. Gatmaitan ZC, Arias IM. 1993. Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol* 24:77-97.
15. Hunter J, Hirst BH, Simmons NL. 1993a. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharm Res* 10:743-749.

16. Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL, Hirst BH. 1993b. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem* 268:14991-14997.
17. Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, Tsuji A. 1996. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J Pharm Pharmacol* 48:1083-1089.
18. Couture L, Nash JA, Turgeon J. 2006. The ATP-binding cassette (ABC) transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart. *Pharmacol Rev* 58:244-258.
19. Ullberg S. 1977. The technique of whole-body autoradiography: Cryosectioning of large specimens. In Elvefeldt O, editors. *Scientific Tools, the LKB Instrument Journal special issue*, Sweden: p 2-29.
20. Gibaldi M, Perrier D. 1982. *Drugs and the Pharmaceuticals Sciences*, vol. 15. Pharmacokinetics, 2nd ed., New York: Marcel Dekker Inc.

21. Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, Wilkinson GR. 1998. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 101:289-294.
22. Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD. 1995. Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1011-1018.
23. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. 2003. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 38:978-988.
24. Paine MF, Ludington SS, Chen ML, Stewart PW, Huang SM, Watkins PB. 2005. Do men and women differ in proximal small intestinal CYP3A or P-glycoprotein expression? *Drug Metab Dispos* 33:426-433.
25. Kang W, Weiss M. 2001. Influence of P-glycoprotein modulators on cardiac uptake, metabolism, and effect of idarubicin. *Pharm Res* 18:1535-1541.

26. Medicines Control Council. 2006. Interaction between ketoconazole and domperidone and the risk of QT prolongation – important safety information. *S Afr Med J* 96:596.
27. Siegsmund MJ, Cardarelli C, Aksentijevich I, Sugimoto Y, Pastan I, Gottesman MM. 1994. Ketoconazole effectively reverses multidrug resistance in highly resistant KB cells. *J Urol* 151:485–491.
28. Wang EJ, Lew K, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. 2002. Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* 46:160-165.
29. Morissette P, Hreiche R, Turgeon J. 2006. Modulatory role of verapamil treatment on the cardiac electrophysiological effects of cisapride. *Can J Physiol Pharmacol* 84:1285-1290.
30. Granzotto M, Drigo I, Candussio L, Rosati A, Bartoli F, Giraldi T, Decorti G. 2004. Rifampicin and verapamil induce the expression of P-glycoprotein in vivo in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Lett* 205:107-115.

#### 4.1.9 Figure legends

Figure 1:  $AUC_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratios of  $^3H$ -domperidone-related radioactivity in blood, plasma and tissues of male and female verapamil pre-treated and control guinea pigs following the intraperitoneal administration of  $^3H$ -domperidone. The control condition represents an absence of pre-treatment. The inhibited condition represents a pre-treatment with verapamil 2 h prior  $^3H$ -domperidone treatment. The modulated condition represents a pre-treatment with verapamil for 5 days prior  $^3H$ -domperidone treatment.

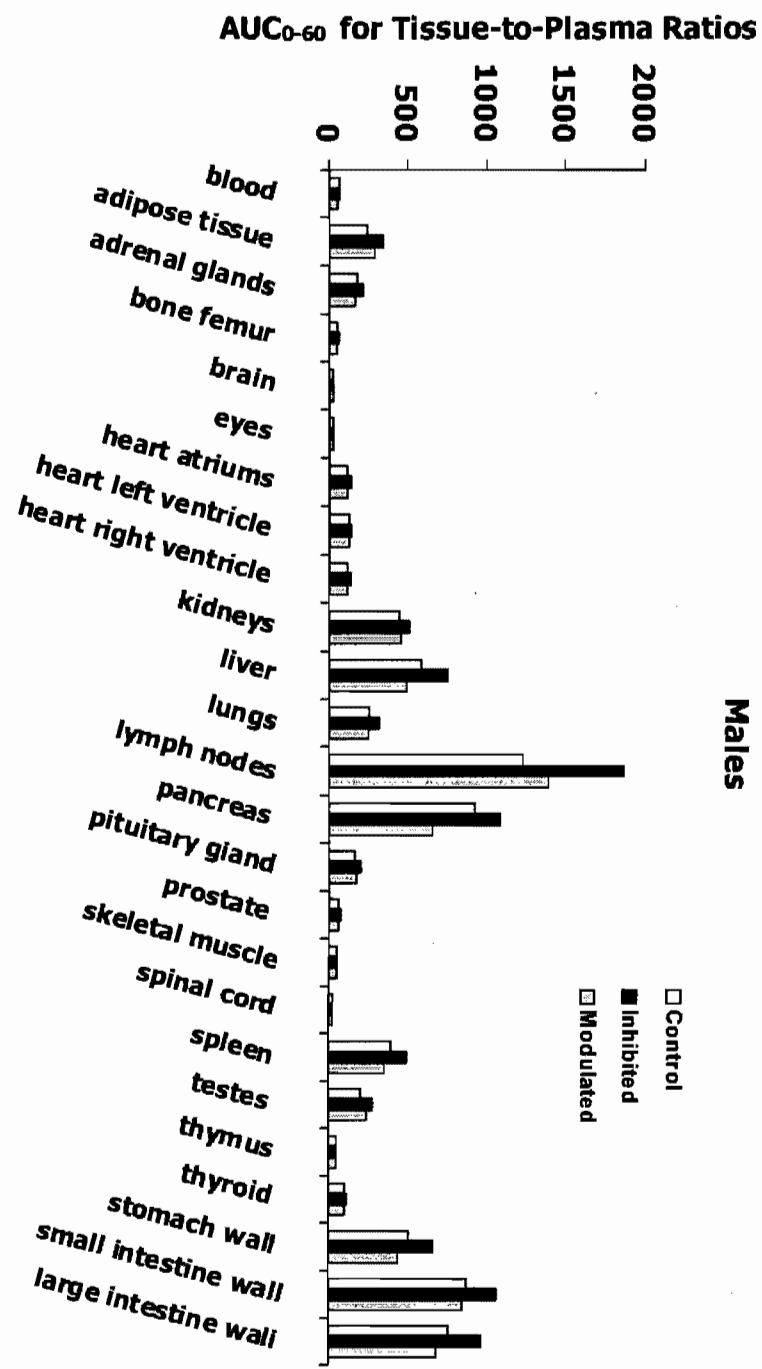
Figure 2: Autoradioluminograms presenting the rapid distribution of  $^3H$ -domperidone-related radioactivity in a female guinea pig at 5 min following the intraperitoneal administration of  $^3H$ -domperidone. Colors from blue to red (blue<green<yellow<orange<red) indicate the intensity of distributed radioactivity, red corresponding to the highest intensity.

Figure 3: Tissue-to-plasma concentration ratios of  $^3H$ -domperidone-related radioactivity in heart structures of male and female verapamil pre-treated and control guinea pigs vs time following the intraperitoneal administration of  $^3H$ -domperidone. The control condition represents an absence of pre-treatment. The inhibited condition represents a pre-treatment with verapamil 2 h prior  $^3H$ -domperidone treatment. The modulated condition represents a pre-treatment with verapamil for 5 days prior  $^3H$ -domperidone treatment.

Figure 4: Comparisons of  $AUC_{0-60}$  for tissue-to-plasma concentration ratios of  $^3H$ -domperidone-related radioactivity in verapamil pre-treated vs control guinea pigs for blood and tissues of male (A) and female (B) animals, and males vs females (C) following the intraperitoneal administration of  $^3H$ -domperidone. The control condition represents an absence of pre-treatment. The inhibited condition represents a pre-treatment with verapamil 2 h prior  $^3H$ -domperidone treatment. The modulated condition represents a pre-treatment with verapamil for 5 days prior  $^3H$ -domperidone treatment.

Figure 1:

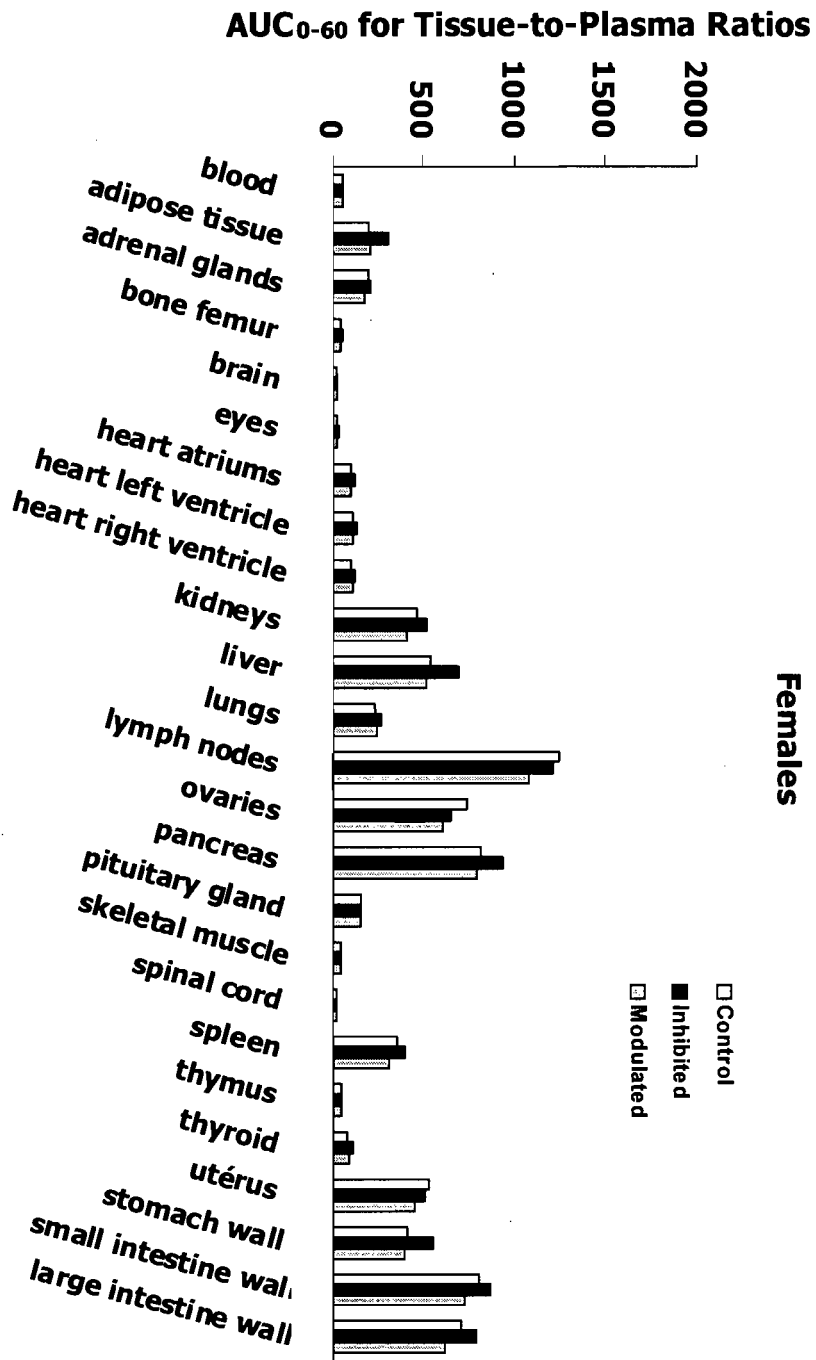
A



Males

□ Control  
 ■ Inhibited  
 ▒ Modulated





Females

□ Control  
■ Inhibited  
▒ Modulated

Figure 2 :

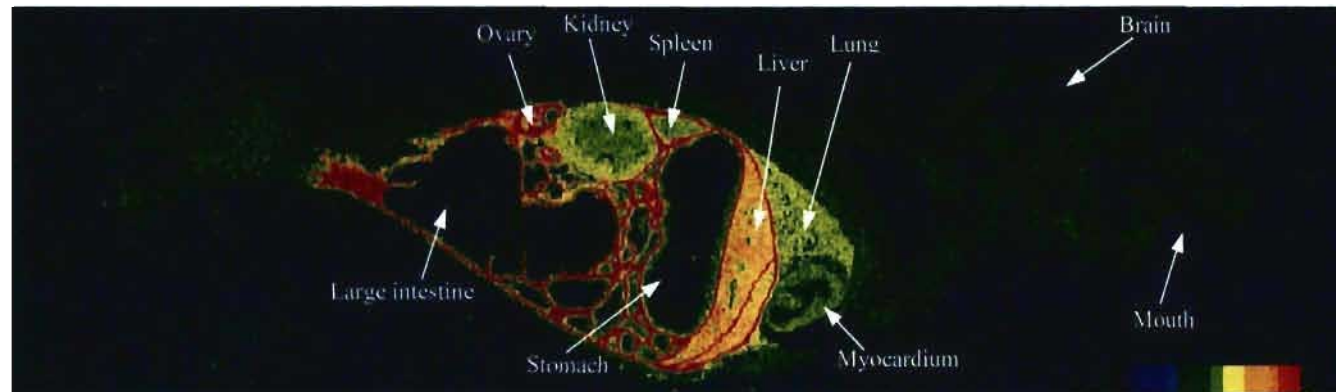


Figure 3:

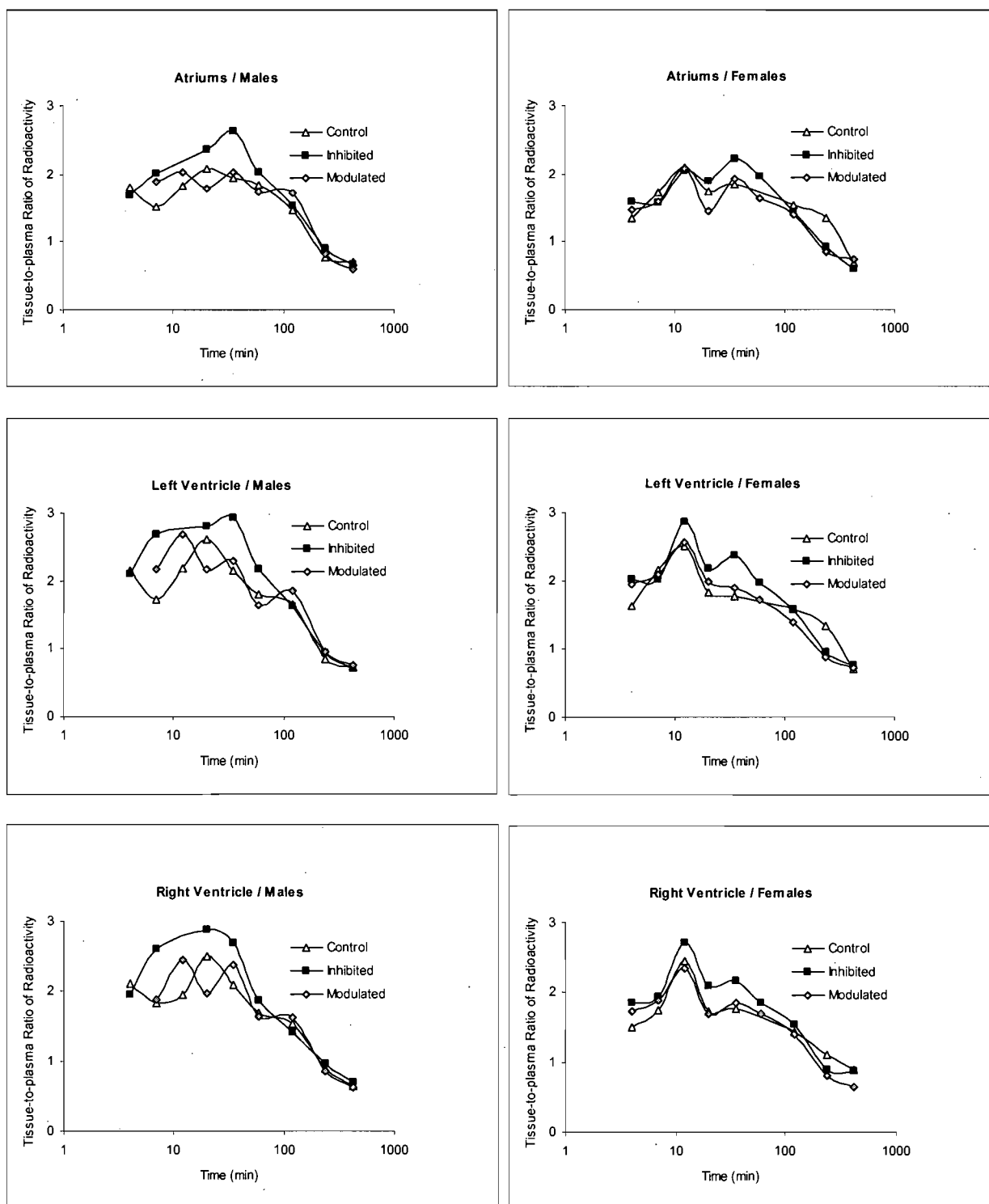
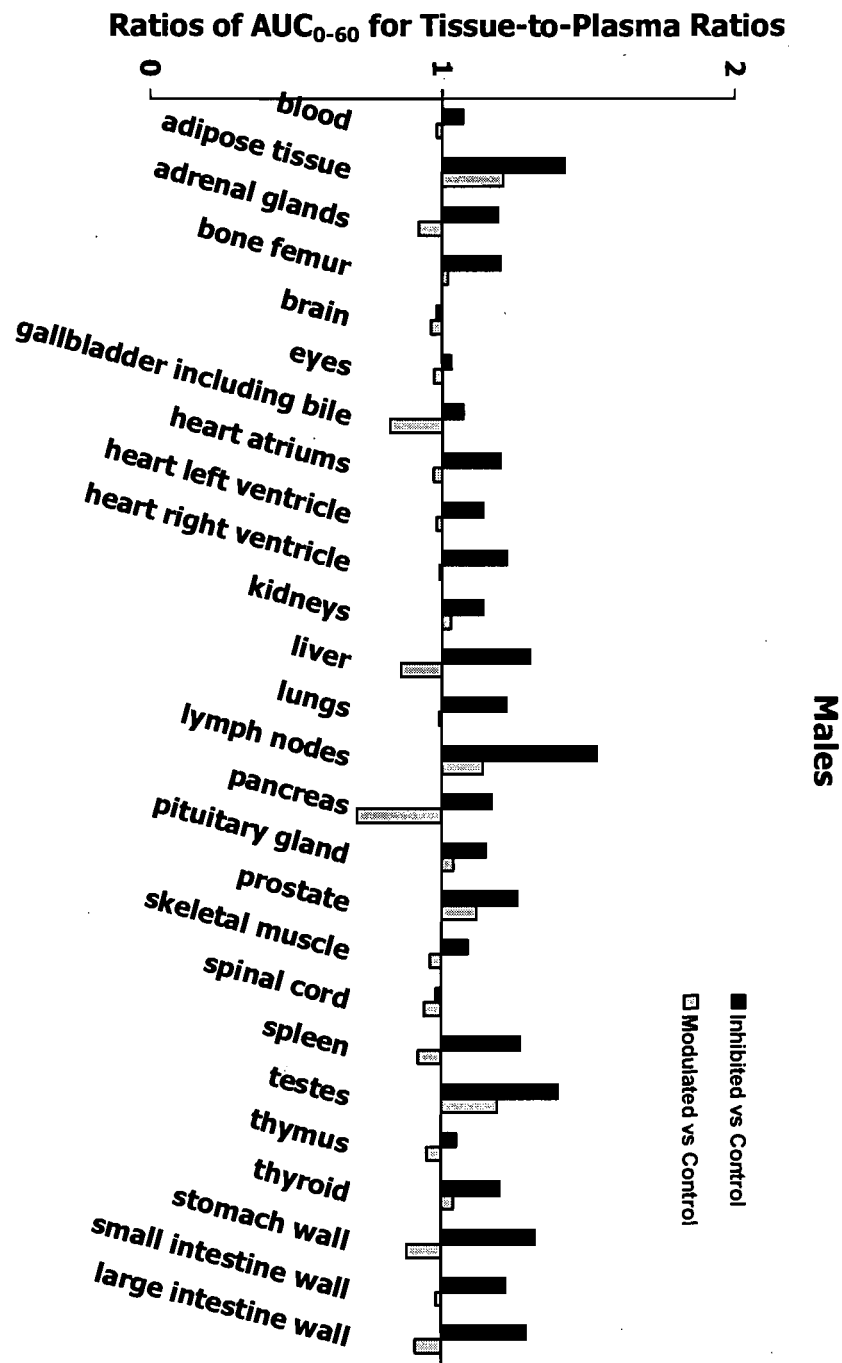
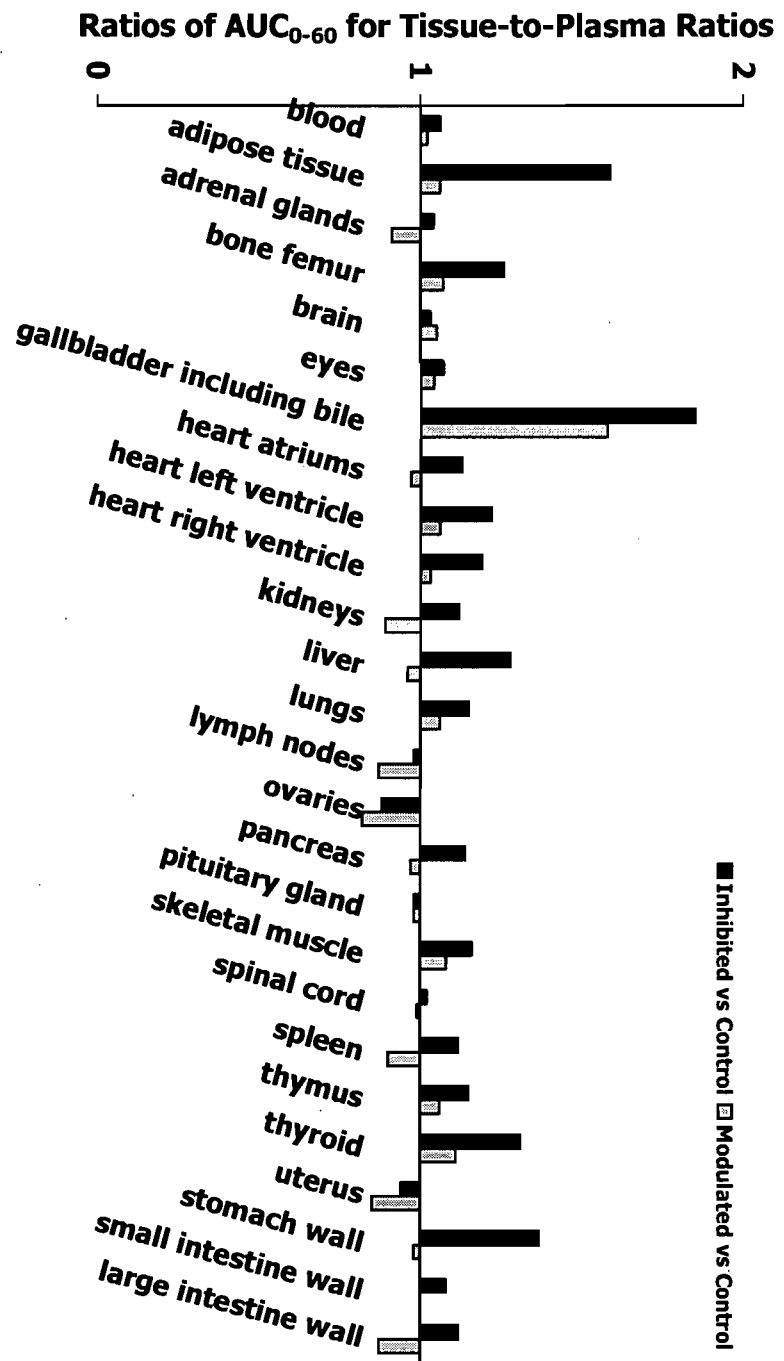


Figure 4:

A

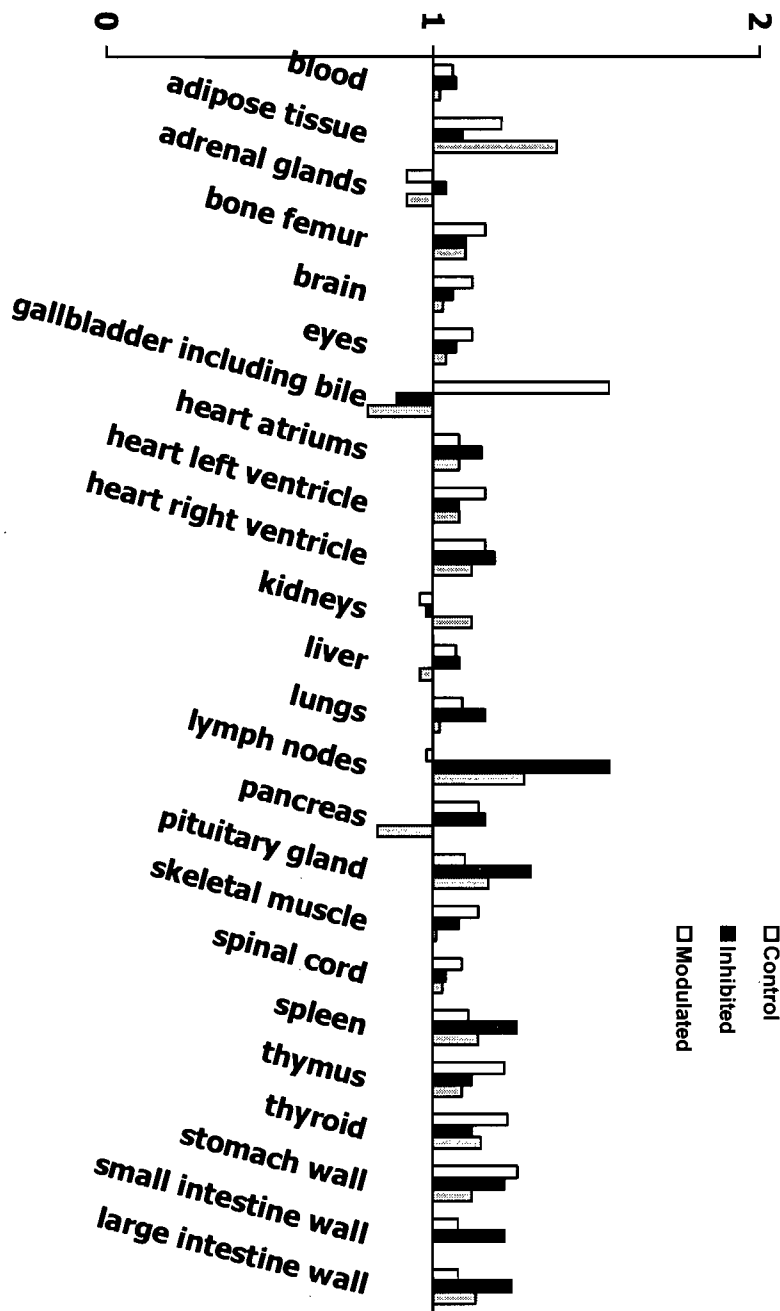




Females

■ Inhibited vs Control ▨ Modulated vs Control

### Ratios of AUC<sub>0-60</sub> for Tissue-to-Plasma Ratios



Males vs Females

□ Control  
 ■ Inhibited  
 ▒ Modulated

## 4.2 Résultats additionnels

Les résultats de pharmacodynamie qui seront rapportés dans cette section ont été obtenus dans le cadre de l'étude présentée à la section précédente (section 4.1). Les résultats décrits dans cette section constituent une suite aux résultats présentés à la section 4.1. Par conséquent, les énoncés dans l'introduction de la section précédente (section 4.1.3) décrivant les motifs de la réalisation de l'étude ainsi que les sections 4.1.4.1, 4.1.4.2, 4.1.4.3 et 4.1.4.4 s'appliquent également à cette section.

### 4.2.1 Introduction

Le blocage du canal potassique rectifiant retardé  $I_{Kr}$  apparaît être le mécanisme sous-jacent du prolongement de la repolarisation observé chez les patients traités avec des médicaments ayant la capacité de prolonger l'intervalle QT. Le site de liaison au canal  $I_{Kr}$  semble être localisé au niveau intracellulaire (Zou et coll., 1997; Zhang et coll., 1999). En contrôlant l'accès des xénobiotiques au milieu intracellulaire et au site de liaison de  $I_{Kr}$ , les transporteurs ABC pourraient moduler l'efficacité ou la toxicité des médicaments. Par conséquent, la régulation des concentrations intracellulaires de médicaments bloqueurs de  $I_{Kr}$  par les transporteurs ABC pourrait donc présenter un facteur de modulation important des risques de toxicités cardiaques, tel que le syndrome du Long QT médicamenteux.

À la section précédente (section 4.1), nous avons discuté de l'effet de pré-traitements au vérapamil sur la distribution cardiaque et tissulaire du dompéridone. Les résultats des animaux non pré-traités au vérapamil ont été comparés aux résultats des animaux ayant reçu une dose de vérapamil 2 h avant l'administration du dompéridone (inhibition compétitive), et aux animaux pré-traités pendant 5 jours consécutifs au vérapamil (modulation). Les résultats ont montré qu'un pré-traitement au vérapamil 2 h avant l'administration du dompéridone augmentait la distribution du dompéridone dans la majorité des tissus, incluant le cœur, et ce pour les cobayes mâles et femelles. Par contre, un pré-traitement de 5 jours au vérapamil n'a pas altéré la distribution cardiaque et tissulaire du dompéridone. De plus, cette distribution du dompéridone s'est avérée plus importante pour les mâles que pour les femelles, et ce pour les trois conditions de pré-traitement au vérapamil.

Nous avons évalué l'effet pharmacodynamique du dompéridone suite aux pré-traitements au vérapamil sur l'intervalle QT de l'électrocardiogramme sur certains animaux jusqu'à 60 min suite à l'administration de dompéridone. Nous avons donc vérifié si une corrélation était possible entre les données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.



## 4.2.2 Matériel et méthodes

### 4.2.2.1 Enregistrement d'électrocardiogramme

Des électrocardiogrammes provenant des cobayes mâles et femelles assignés aux temps de prélèvement de 2 et 4 h (voir section 4.1.4.4) pour chacune des trois conditions de pré-traitement au vérapamil (pour un total de 12 animaux) furent enregistrés. Pour chaque animal, un électrocardiogramme fut enregistré avant l'administration du <sup>3</sup>H-domperidone ainsi qu'à 1, 2, 4, 7, 15, 30 et 60 min post-administration (pour un total de 96 enregistrements). Les enregistrements furent effectués en utilisant les dérivations des membres I, II, III, aVR, aVL, et aVF. L'intervalle QT a été corrigé pour la fréquence cardiaque (QTc) en utilisant la formule de Fridericia ( $QTc(F) = \text{intervalle QT} \div \sqrt[3]{\text{intervalle RR}}$ ) (Fridericia, 1920). La formule de Fridericia est la plus appropriée pour les cobayes non-anesthésiés selon Hamlin et collègues (2003).

### 4.2.3 Résultats

L'effet de pré-traitements au vérapamil sur la réponse pharmacodynamique en mesurant l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme a montré une tendance pour un intervalle QTc(F) prolongé pour les cobayes pré-traités au vérapamil 2 h avant l'administration du dompéridone (Figure 1). En effet, pour les temps de 30 et 60 min, un prolongement de l'intervalle QTc(F) moyen a pu être observé (jusqu'à 12 msec) avec un effet légèrement plus prononcé pour les femelles que les mâles. Cette tendance pour une prolongation de l'intervalle QT n'a par contre pas été observée pour les animaux pré-traités au vérapamil pour 5 jours consécutifs et pour les animaux non-pré-traités.

### 4.2.4 Discussion

L'inhibition par le vérapamil de l'efflux de xénobiotiques médié par les transporteurs ABC, telle que la P-gp, peut mener à des répercussions cliniques importantes. En effet, une telle inhibition peut prédire des interactions médicamenteuses potentielles avec d'autres substrats de la P-gp, particulièrement s'ils sont des bloqueurs du canal  $I_{Kr}$ . Pour cette raison, nous avons examiné l'effet de pré-traitements au vérapamil sur la réponse pharmacodynamique du dompéridone

(prolongation de l'intervalle QT) chez les cobayes. D'ailleurs, les cobayes sont reconnus comme étant un excellent modèle pour une évaluation électrophysiologique car ils possèdent des canaux ioniques similaires à l'homme (à l'exception de  $I_{to}$ ) (Bünger et coll., 1975; Roden et coll., 1988).

Les résultats provenant des électrocardiogrammes ont montré une tendance pour un prolongement de l'intervalle QT pour les cobayes pré-traités au vérapamil 2 h avant le dompéridone avec un effet légèrement plus prononcé pour les femelles. Cette tendance observée semble être en accord avec les résultats de pharmacocinétiques car en effet les ratios tissu/plasma pour les concentrations de dompéridone se sont révélés plus élevés pour les animaux pré-traités au vérapamil 2 h avant le dompéridone au temps de 35 et 60 min comparativement aux deux autres conditions. Par contre, contrairement à la tendance observée au niveau de la pharmacodynamie, ce sont les mâles qui ont présenté une distribution de dompéridone plus importante comparativement aux femelles. Par contre, une tendance plus évidente pour les cobayes femelles à un prolongement de l'intervalle QT lors de l'administration de vérapamil 2 h avant le dompéridone dans cette étude serait en accord avec les évidences cliniques qui démontrent que les femmes semblent être davantage prédisposées que les hommes à un prolongement de cet intervalle suite à la prise de médicaments (Makkar et coll., 1993; Drici et coll., 1998). Une étude

future avec un effectif de mesures d'intervalle QTc plus élevé serait requise pour confirmer les tendances observées discutées dans cette section.

Cette augmentation de la distribution cardiaque de dompéridone et la tendance possible à une prolongation de l'intervalle QT suggèreraient que le vérapamil en inhibant la P-gp pourrait faciliter l'accès au dompéridone au site de liaison intracellulaire sur le canal  $I_{Kr}$ . Récemment, le risque de prolongation de l'intervalle QT a été reconnu suite à une co-administration de dompéridone et de kétoconazole, également un inhibiteur de la P-gp (Siegsmond et coll., 1994; Wang et coll., 2002) ce qui n'a pas été observé lors de l'administration de dompéridone seul (Medecines Control Council, 2006).

#### **4.2.5 Conclusion**

Les mesures de l'intervalle QT ont montré une tendance pour un prolongement de cet intervalle pour les cobayes pré-traités au vérapamil 2 h avant le dompéridone avec un effet légèrement plus prononcé pour les femelles. Le vérapamil en inhibant la P-gp pourrait donc faciliter l'accès au dompéridone au site de liaison intracellulaire sur le canal  $I_{Kr}$  et médier certaines cardiotoxicités reliées à une repolarisation cardiaque déficiente.

## 4.2.6 Références

Bünger R, Haddy F, Querengässer A, and Gerlach E (1975) An isolated guinea pig heart preparation with *in vivo* like features. Pflugers Arch 353:317-326.

Drici MD, Knollmann BC, Wang WX, and Woosley RL (1998) Cardiac actions of erythromycin. Influence of female sex. JAMA 280:1774-1776.

Fridericia LS (1920) Die systolendauer in elektrokarogramm bei normalen menshen und bei herzfranken. Acta Med Scand 53:469-486.

Hamlin RL, Kijawornrat A, Keene BW, and Hamlin DM (2003) QT and RR intervals in conscious and anesthetized guinea pigs with highly varying RR intervals and given QTc-lengthening test articles. Toxicol Sci 76:437-442.

Makkar RR, Fromm BS, Steinman R, Meissner MD, and Lehmann MH (1993) Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. JAMA 270:2590-2597.

Medicines Control Council (2006) Interaction between ketoconazole and domperidone and the risk of QT prolongation – important safety information. S Afr Med J 96:596.

Roden DM, Bennett PB, Snyders DJ, Balser JR, and Hondeghem LM (1988) Quinidine delays  $I_k$  activation in guinea pigs ventricular myocytes. *Circ Res* 62:1055-1058.

Siegsmund MJ, Cardarelli C, Aksentijevich I, Sugimoto Y, Pastan I, and Gottesman MM (1994) Ketoconazole effectively reverses multidrug resistance in highly resistant KB cells. *J Urol* 151:485-491.

Wang EJ, Lew K, Casciano CN, Clement RP, and Johnson WW (2002) Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother* 46:160-165.

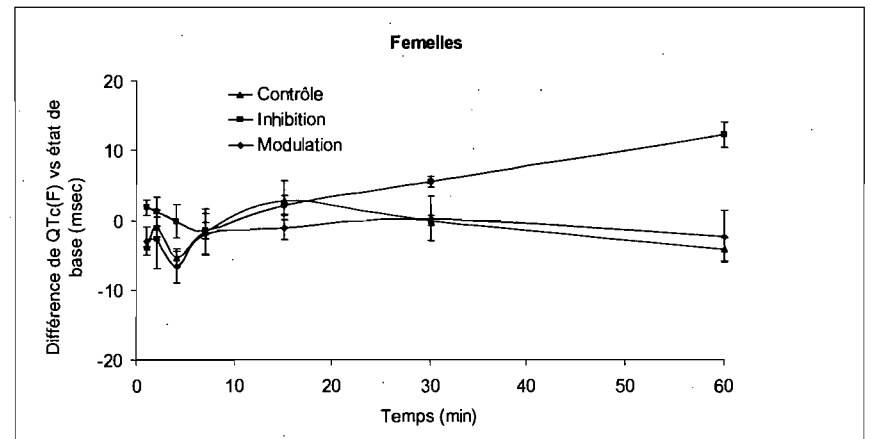
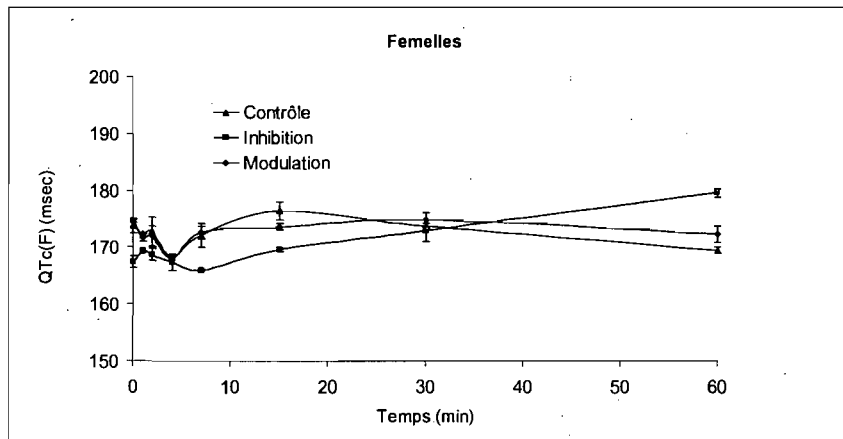
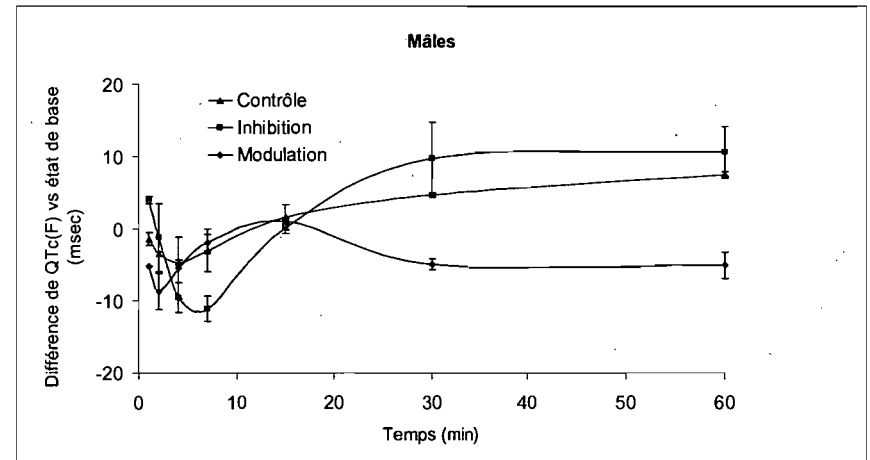
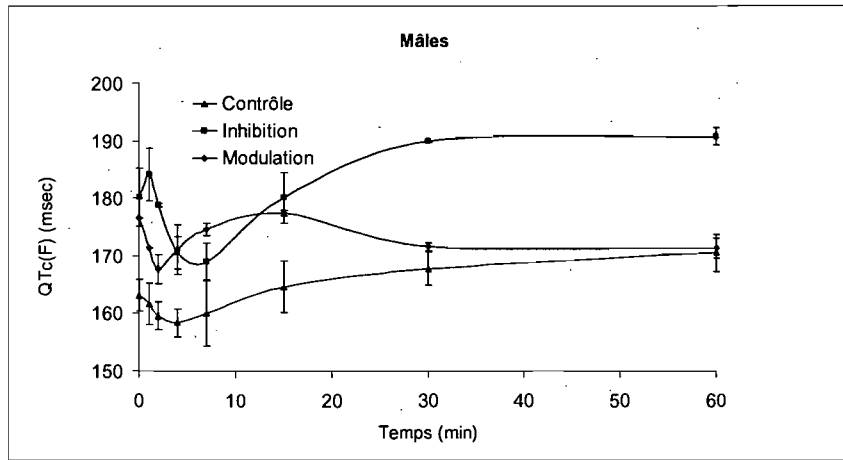
Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, and January CT (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* 84:989-998.

Zou A, Curran ME, Keating MT, and Sanguinetti MC (1997) Single HERG delayed rectifier  $K^+$  channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 272:H1309-1314.

#### 4.2.7 Légende de figures

Figure 1 : Moyennes des intervalles QTc(F) vs temps, et moyennes des différences entre les intervalles QTc(F) et l'état de base (avant l'administration de  $^3\text{H}$ -domperidone) vs temps pour les cobayes mâles et femelles suite à une administration intrapéritonéale de  $^3\text{H}$ -domperidone (n=2 par temps). Les données sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  SEM. La condition "Contrôle" représente une absence de pré-traitement. La condition "Inhibition" représente un pré-traitement au vérapamil 2 h avant l'administration de  $^3\text{H}$ -dompéridone. La condition "Modulation" représente un pré-traitement au vérapamil pour 5 jours avant l'administration de  $^3\text{H}$ -dompéridone.

Figure 1





## **CHAPITRE V**

### **Conclusion générale**

## 5.1 Conclusion

Il a été démontré que l'accumulation tissulaire de xénobiotiques ne dépendait non seulement de leur habileté à pénétrer dans les cellules mais également de leur habileté d'en sortir. En effet, des recherches dans les années 1970 ont révélé la présence d'un mécanisme actif d'extrusion de médicaments conféré par une large glycoprotéine de la membrane plasmique (Dano 1973; Juliano et Ling 1976). Le gène *MDR1* codant pour cette protéine appelée P-glycoprotéine (P-gp) a par la suite été identifié grâce à sa surexpression dans les cellules tumorales associées à une résistance acquise aux médicaments anticancer (Ueda et coll., 1987). Bien que l'on concevait que la P-gp était confinée qu'aux cellules tumorales, elle a par la suite été reconnue pour être exprimée dans les cellules de tissus normaux.

La P-gp est le transporteur le plus étudié de la grande famille des transporteurs ABC qui en compte une cinquantaine chez l'humain. Parmi ceux-ci, quatorze ont une activité connue dans le transport de xénobiotiques à ce jour. Le rôle physiologique des transporteurs ABC au niveau de la protection de l'organisme est maintenant bien établi pour plusieurs tissus tels que les intestins, le foie, le cerveau, les testicules ou le placenta. Jusqu'à tout récemment, très peu d'informations étaient

disponibles sur le rôle fonctionnel de la P-gp et des autres ABC transporteurs au niveau du cœur.

Dans cet ouvrage, dans un premier temps une revue de la littérature exhaustive a été présentée démontrant l'expression de certains transporteurs ABC au niveau du cœur. Les techniques de biologie moléculaire ont démontré que la P-gp était exprimée au niveau cardiaque et que d'autres transporteurs tels que MRP1 et les transporteurs de la sous-famille ABCA semblaient présenter des niveaux d'expression élevés. De plus, des recherches précédentes utilisant des souris déficientes pour le gène codant pour certains transporteurs ABC ont suggéré une importance de ces derniers dans le contrôle des concentrations cardiaques de xénobiotiques. La revue de la littérature a également présenté des évidences de cardiotoxicités suite à l'administration concomitante de substrats de la P-gp, tels que les agents qui renversent la résistance multidrogue, démontrant un rôle probable de ces transporteurs dans la régulation des concentrations intracardiaques de médicaments.

Certains médicaments sont reconnus pour posséder la capacité de prolonger l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme en inhibant le canal potassique rectifiant retardé  $I_{Kr}$  responsable de la repolarisation cardiaque. Une repolarisation déficiente

prolonge l'intervalle QT dans l'électrocardiogramme et peut engendrer un épisode de torsades de pointes pouvant mener à la mort subite. Le site de liaison au canal  $I_{Kr}$ , situé dans la membrane plasmique, semble être localisé au niveau intracellulaire (Zou et coll., 1997; Zhang et coll., 1999; Mitcheson et al., 2000). Par conséquent, la régulation des concentrations intracellulaires cardiaques par les transporteurs ABC devenait un facteur déterminant dans l'incidence de cardiotoxicités, tel que le syndrome du Long QT médicamenteux, pour des agents bloqueurs du canal  $I_{Kr}$ . Pour ces raisons, nous avons émis l'hypothèse que les transporteurs ABC, telle que la P-gp, par leur régulation des concentrations intracellulaires cardiaques, pourraient potentiellement contrôler l'accès d'un médicament bloqueur d' $I_{Kr}$  à leur site de liaison sur ce canal potassique. Ainsi, les transporteurs ABC constitueraient un facteur influençant l'apparition d'une repolarisation cardiaque déficiente.

Nous avons donc vérifié dans cet ouvrage l'implication de la P-gp dans la distribution cardiaque et tissulaire du dompéridone en utilisant des souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp. Le dompéridone qui est à la fois un substrat de la P-gp et un bloqueur d' $I_{Kr}$  fut administré à des souris simple mutées (*mdr1a* (-/-)), des souris double-mutées (*mdr1a/1b* (-/-)) ainsi qu'à des souris normales. Suite à l'administration intraveineuse de  $^3\text{H}$ -dompéridone, les souris furent euthanasiées à six différents temps jusqu'à 120 min post-administration. Les structures du cœur et environ vingt-cinq tissus furent prélevés et analysés pour les niveaux de

dompéridone. Des niveaux plus élevés de dompéridone ont été observés dans plusieurs tissus incluant le cœur pour les souris *mdr1a* (-/-) et *mdr1a/1b* (-/-) comparativement aux souris normales. Les différences obtenues dans la distribution cardiaque de dompéridone entre les souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp et les souris normales confirment la plausibilité de l'hypothèse avancée et démontrent un rôle de la P-gp dans la régulation des concentrations intracardiaques de dompéridone.

Plusieurs cas d'interactions médicamenteuses lors de la co-administration de deux médicaments substrats des transporteurs ABC ont été rapportés dans la littérature. De plus, tel que discuté dans les sections précédentes, certains médicaments auraient le potentiel de moduler les niveaux d'expression des transporteurs ABC. Par exemple, la cyclosporine A a semblé moduler de façon réversible l'expression de la P-gp dans les tissus normaux suite à un traitement de 5 jours de cyclosporine (Jetté et coll., 1996) et un traitement de 10 jours de rifampicine ou de vérapamil chez des souris augmentait les niveaux de la protéine P-gp (Granzotto et coll., 2004). Les répercussions que peuvent provoquer une modulation des transporteurs ABC par un traitement chronique d'un médicament substrats des transporteurs ABC peuvent donc être considérables au niveau de l'effet thérapeutique ou de l'incidence de toxicités d'un autre substrat. Pour ces raisons, nous avons tenté de déterminer si le vérapamil, un modulateur de la P-gp, pouvait altérer la distribution

cardiaque et tissulaire du dompéridone chez des cobayes mâles et femelles suite à deux types de pré-traitement; soit une administration de vérapamil 2 h avant l'administration du dompéridone pour évaluer une possible inhibition compétitive entre les deux substrats de la P-gp, et un pré-traitement de 5 jours au vérapamil avant l'administration de dompéridone à la sixième journée pour évaluer la modulation potentielle de l'expression de la P-gp ou de son activité. Les cobayes furent sacrifiés à 9 différents temps jusqu'à 7 h post-administration et les tissus prélevés et analysés pour leur niveau de dompéridone. La comparaison des résultats avec les animaux non pré-traités a démontré une augmentation de la distribution du dompéridone au cœur suite à une inhibition compétitive de la P-gp par le vérapamil, mais aucun effet n'a été observé suite au pré-traitement de 5 jours au vérapamil. L'effet des pré-traitements au vérapamil sur la réponse pharmacodynamique du dompéridone en mesurant l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme a montré une tendance pour un intervalle QTc(F) prolongé pour les cobayes pré-traités au vérapamil 2 h avant l'administration du dompéridone, avec un effet légèrement plus prononcé pour les femelles que pour les mâles. Aucun effet n'a par contre été observé pour les animaux pré-traités au vérapamil pour 5 jours et pour les animaux non pré-traités ce qui est en accord avec les données pharmacocinétiques. Les résultats ont montré qu'une inhibition de la P-gp par le vérapamil peut mener à une distribution cardiaque plus importante pour les médicaments substrats de ce transporteur et ainsi faciliter l'accès d'un bloqueur du canal  $I_{Kr}$  à son site de liaison sur ce canal potassique et

potentiellement altérer la repolarisation cardiaque. Cette situation au niveau clinique s'avère très réaliste compte tenu du nombre élevé de médicaments prescrits particulièrement aux personnes âgées. La prise concomitante de deux substrats de la P-gp, incluant un bloqueur d' $I_{Kr}$ , peut ainsi entraîner des toxicités cardiaques tel le Long QT médicamenteux causé par un prolongement de cet intervalle.

Les résultats impliquant les souris mutées ont démontré que la P-gp semblait jouer un rôle dans la régulation des concentrations intracardiaques de dompéridone puisque des niveaux jusqu'à 1.3 fois plus élevés ont été observés pour les souris déficientes pour le gène codant pour la P-gp comparativement aux souris normales. D'autres recherches utilisant de telles souris et d'autres substrats de la P-gp ont obtenu des différences beaucoup plus importantes entre les génotypes de souris. Par exemple, des concentrations cardiaques de 7 à 14 fois plus élevées ont été observées pour la vinblastine pour les souris *mdr1a* (-/-) comparativement aux souris normales suite à une injection intraveineuse (Schinkel et coll., 1994). D'autres études ont montré des valeurs deux fois plus élevées pour certains tissus incluant le cœur entre les souris *mdr1a* (-/-) ou *mdr1a/1b* (-/-) et les souris normales suite à une administration orale de lopéramide (Schinkel et coll., 1996) ou suite à une injection intraveineuse d'anticonvulsants énaminones (Cox et coll., 2002). Ceci laisse présager

que d'autres transporteurs, en concert avec la P-gp, puissent être impliqués dans l'efflux de dompéridone du cœur. En effet, tel que discuté dans l'introduction de cette thèse, d'autres transporteurs se sont avérés être exprimés au niveau cardiaque. Il y a des évidences devenant plus nombreuses sur l'implication des transporteurs MRP, une sous-famille des transporteurs ABC, dans la disposition de médicaments au niveau du cœur (Sasabe et coll., 2004). En fait, neuf transporteurs MRP (MRP1 à MRP9) ont des évidences rapportées dans la littérature de leur rôle dans la disposition des xénobiotiques et plusieurs d'entre eux ont été reconnus comme étant exprimés au niveau cardiaque (Flens et coll., 1996; Stride et coll., 1996; Hagen et coll., 2000; Kao et coll., 2002; Dazert et coll., 2003; Muramatsu et coll., 2004; Nishimura et coll., 2004). Des recherches futures sont requises pour évaluer le rôle possible de d'autres transporteurs ABC, tels que les MRP, dans l'efflux de médicaments, tel le dompéridone au niveau du cœur. De plus, les transporteurs ABC de la sous-famille des ABCA, relativement peu connus, pour lesquels l'expression au niveau cardiaque semble être très importante mériteraient également une attention particulière.

Il est connu que la réponse aux médicaments, d'un point de vue thérapeutique ou de toxicités, peut varier grandement d'un individu à l'autre. Ces variations peuvent être expliquées en partie par des différences alléliques au niveau des enzymes du CYP450 mais une grande portion de la variabilité inter-individuelle ne peut être expliquée à ce jour. Par exemple l'incidence de cardiotoxicités, tel que le



syndrome du Long QT médicamenteux, est dotée d'une grande variabilité inter-individuelle. Il est bien établi que les femmes sont plus à risque que les hommes à développer cette cardiotoxicité suite à la prise de médicaments ayant le potentiel de prolonger l'intervalle QT. Bien que des évidences suggèrent que les androgènes pourraient jouer un rôle dans cette différence entre genres (Bidoggia et coll., 2000; Brouillette et coll., 2003), les scientifiques s'entendent pour affirmer que les facteurs responsables de cette différence demeurent obscurs. Pour les deux études animales présentées dans cet ouvrage, la déficience de l'activité de la P-gp causé par une inhibition de la P-gp ou une altération de son gène a entraîné une élévation de la distribution cardiaque de la dompéridone, un bloqueur d' $I_{Kr}$ . Par conséquent, les variations génétiques pour ce transporteur pourraient contribuer à expliquer en partie les variations interindividuelles pour l'incidence de cardiotoxicités tel que le syndrome du Long QT médicamenteux.

Ainsi les polymorphismes associés au gène codant pour les transporteurs ABC combinés aux polymorphismes pour le canal  $I_{Kr}$  et/ou pour les enzymes des CYP450 sont tous des facteurs pouvant potentiellement contribuer à l'apparition de toxicités cardiaques. La présence possible de ces mutations chez un individu et de leurs interactions rend complexe la prédiction d'effets toxiques suite à la prise d'un bloqueur du canal  $I_{Kr}$ . S'ajoute à ceci, la prise de plusieurs médicaments qui accentue

la complexité dans la prédiction des effets cardiotoxiques. La prudence est donc de mise pour les cliniciens lors de la prescription de plusieurs médicaments incluant un bloqueur  $I_{Kr}$ .

Bien qu'il y ait eu émergence d'informations sur les enzymes du cytochrome P450 au cours des dernières décennies, les prochaines années promettent sûrement une explosion de connaissances sur les transporteurs ABC. À ce titre, ces protéines doivent être considérées comme un facteur d'importance, tout comme les enzymes du CYP450, contribuant à la disposition des médicaments.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont permis de démontrer que les transporteurs ABC, étant exprimés au niveau du cœur selon les évidences de la littérature, avaient le potentiel de réguler les concentrations intracellulaires cardiaques de dompéridone. L'activité des transporteurs ABC dans la régulation des concentrations intracardiaques de médicaments semble donc représenter un facteur d'influence dans l'incidence de cardiotoxicités médiées par un prolongement de l'intervalle QT pour des agents bloqueurs du canal  $I_{Kr}$ .

## 5.2 Références

Bidoggia H, Maciel JP, Capalozza N, Mosca S, Blacksley EJ, Valverde E, et al. (2000) Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization : possible role of testosterone. *Am Heart J* 140:678-683.

Brouillette J, Trépanier-Boulay V, and Fiset C (2003) Effect of androgen deficiency on mouse ventricular repolarization. *J Physiol* 546.2:403-413.

Cox DS, Scott KR, Gao H, and Eddington ND (2002) Effect of P-glycoprotein on the pharmacokinetics and tissue distribution of enaminone anticonvulsants: Analysis by population and physiological approaches. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1096-1104.

Dano K (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 323:466-483.

Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Bohm M, Warzok R, Kerb R, Brinkmann U, Schaeffeler E, Schwab M, Cascorbi I, Jedlitschky G, and Kroemer HK (2003) Expression and localization of the multidrug resistance protein 5

(MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol* 163:1567-1577.

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, and Scheper RJ (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 148:1237-1247.

Granzotto M, Drigo I, Candussio L, Rosati A, Bartoli F, Giraldi T, and Decorti G (2004) Rifampicin and verapamil induce the expression of P-glycoprotein in vivo in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Lett* 205:107-115.

Hagen SG, Monroe DG, Dean DM, and Sanders MM (2000) Repression of chick multidrug resistance-associated protein 1 (chMRP1) gene expression by estrogen. *Gene* 257:243-249.

Jetté L, Beaulieu E, Leclerc JM, and Beliveau R (1996) Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues. *Am J Physiol* 270:F756-65.

Juliano RL, and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162.

Kao HH, Huang JD, and Chang MS (2002) cDNA cloning and genomic organization of the murine MRP7, a new ATP-binding cassette transporter *Gene* 286:299-306.

Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, and Sanguinetti MC (2000) A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 97:12329-12333.

Muramatsu T, Johnson DR, Finch RA, Johnson LK, Leffert JJ, Lin ZP, Pizzorno G, and Sartorelli AC (2004) Age-related differences in vincristine toxicity and biodistribution in wild-type and transporter-deficient mice. *Oncol Res* 14:331-343.

Nishimura M, Naito S, and Yokoi T (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 19:135-149.

Sasabe H, Kato Y, Suzuki T, Itose M, Miyamoto G, and Sugiyama Y (2004) Differential involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and p-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 310:648-655.

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJ, and Borst P (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* 77:491-502.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, and van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524.

Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, Wilson GM, Cole SP, and Deeley RG (1996) Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol* 49:962-971.

Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, and Pastan I. (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3004-3008.

Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, and January CT (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* 84:989-998.

Zou A, Curran ME, Keating MT, and Sanguinetti MC (1997) Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 272:H1309-1314.

## **ANNEXE I**

**The ATP-Binding Cassette (ABC) transporters and  
their implication in drug disposition: A special look at  
the heart**

**Pharmacological Reviews 58 :244-258, 2006**



*Reprinted with permission of the American Society for pharmacology and Experimental Therapeutics. All right reserved.*

*Copyright © 2006 by the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Pharm Rev 58:244-258, 2006.*

Title page

The ATP-Binding Cassette Transporters and their Implication in Drug Disposition: A Special Look at the Heart

Lucie Couture<sup>1,2</sup>, John A. Nash<sup>2</sup> and Jacques Turgeon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Quebec, Canada, and <sup>2</sup>Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal Inc., Quebec, Canada

The laboratory of Dr. Jacques Turgeon is funded by the Canadian Institutes of Health Research, the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Quebec Heart and Stroke Foundation.

## Running title page

a) ABC Transporters and Distribution of Drugs to the Heart

b) Corresponding author: Jacques Turgeon, Ph.D.

Faculté de pharmacie, Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Phone: 514-343-7270

Fax: 514-343-2098

e-mail 

c) ABC, ATP-binding cassette

BCRP, breast cancer resistance protein

cMOAT, canalicular multispecific organic anion transporter

GSH, glutathione

HIV, human immunodeficiency virus

MDR, multidrug resistance

MRP, multidrug resistance-associated protein

NBD, nucleotide-binding domain

PCR, polymerase chain reaction

P-gp, P-glycoprotein

RT-PCR, real-time polymerase chain reaction

SNP, single nucleotide polymorphism

TMD, transmembrane domain

## 1.1 Résumé

Le passage des médicaments au travers les membranes cellulaires dicte leur absorption, distribution, métabolisme et excrétion. Ce processus est déterminé par plusieurs facteurs incluant le poids moléculaire du composé, sa forme, son degré d'ionisation et sa liaison aux protéines. L'accumulation tissulaire des xénobiotiques ne dépend pas seulement de leur habileté à pénétrer dans les cellules mais également de leur habileté à les quitter. Par exemple, les transporteurs d'efflux ABC (*ATP-binding cassette*) ont un rôle bien connu dans la disposition des médicaments. En fait, ces transporteurs agissent en synergie avec les enzymes de métabolisme pour protéger l'organisme de composés toxiques. Le transporteur le plus étudié de la grande famille des transporteurs ABC, la P-glycoprotéine, a été en premier lieu retrouvée comme étant surexprimée dans les cellules tumorales conférant ainsi une résistance à plusieurs médicaments anticancéreux. La P-glycoprotéine, présumée comme étant confinée qu'aux cellules tumorales a par la suite été reconnue pour être exprimée dans les tissus normaux tels que le foie, le rein, les intestins et le cœur. Bien que les informations demeurent limitées sur le rôle fonctionnel des transporteurs ABC au niveau du myocarde, il est suggéré qu'ils puissent moduler l'efficacité et la toxicité des agents actifs cardiovasculaires. Cet article de révision présente les informations et progrès récents sur le rôle des transporteurs ABC dans la disposition des médicaments et plus précisément leur rôle au niveau du cœur.

## 1.2 Abstract

The passage of drugs across cell membranes dictates their absorption, distribution, metabolism and excretion. This process is determined by several factors including the molecular weight of the compounds, their shape, degree of ionization and binding to proteins. Accumulation of xenobiotics into tissues does not depend only on their ability to enter cells, but also on their ability to leave them. For instance, the role of efflux transporters such as ATP-binding cassette (ABC) proteins in the disposition of drugs is now well recognised. Actually, ABC transporters act in synergy with drug metabolizing enzymes to protect the organism from toxic compounds. The most studied transporter from the ABC transporter superfamily, P-glycoprotein, was found to be overexpressed in tumor cells and associated with an acquired resistance to several anticancer drugs. P-glycoprotein thought at first to be confined to tumor cells, was subsequently recognized to be expressed in normal tissues such as the liver, kidney, intestine and heart. Even though information remains rather limited on the functional role of ABC transporters in the myocardium, it is hypothesized that they may modulate efficacy and toxicity of cardioactive agents. This review addresses recent progress on knowledge about the ABC transporters in drug disposition and more precisely their role in drug distribution to the heart.

### 1.3 Introduction

It was first demonstrated in 1973 that accumulation of xenobiotics into tissues does not depend only on their ability to enter cells, but also on their ability to leave them. Indeed, Dano (1973) demonstrated using Ehrlich ascite tumor cells that intracellular concentrations of daunorubicin could be lowered by an active drug extrusion mechanism. A few years later, Juliano and Ling (1976) isolated a large glycoprotein in the plasma membrane of colchicine-resistant Chinese hamster ovary cells: they named this protein the P-glycoprotein (P-gp). The gene coding for P-gp (*MDR1*) was then identified due to its overexpression in tumor cells associated with an acquired resistance to several anticancer drugs (Ueda et al. 1987). P-gp thought at first to be confined to tumor cells, was subsequently recognized to be expressed in normal tissues, suggesting a physiological function of this transporter.

There are approximately fifty ABC transporters discovered so far in human. Among them, fourteen have at least one published evidence of activity in the transport of xenobiotics. It is now evident that these transporters exhibit a protective role of the organism in the gut, the liver, the brain, the testis or the placenta. On the other hand, there is relatively limited information on the functional role of P-gp and other ABC transporters in the heart.

Expression of ABC transporters in the heart is likely associated with regulation of normal physiological functions of this organ. ABC transporters may control access to essential nutrients as well as protect against potential toxic substances. It can be conceived that pathological conditions may trigger changes in the overall expression of these transporters. It can also be hypothesized that polymorphisms in ABC transporters may predispose patients to various cardiac diseases. As well, ABC transporter activities may control intracellular access of drugs to their binding sites and then modulate drug efficacy or toxicity.

Therefore, the aim of this manuscript is to review literature evidence for the expression of ABC transporters in the heart and to shed light on the involvement of ABC transporters in the distribution of drugs to this organ. Modulation of cardiac ABC transporters activities, regulation of their expression and genetic polymorphisms will be discussed as potential mechanisms of drug activities or toxicities to the heart.

## **1.4 ATP-Binding Cassette Transporters**

The ATP-binding cassette proteins represent the largest family of transmembrane transporters. These proteins are expressed in a large variety of organisms and around fifty ABC transporters have been identified so far in human

(Tirona and Kim, 2002). The superfamily of ABC transporters is divided into seven different subfamilies (Dean et al., 2001; Müller, 2003). As they are ATP-dependent efflux proteins, ATP hydrolysis is required to translocate substrates against a concentration gradient from the intracellular toward the extracellular regions. A large range of endogene and exogene substrates are transported by ABC superfamily proteins, which include amino acids, sugars, ions, glycans, peptides, proteins, phospholipids (Tirona and Kim, 2002).

### **1.4.1 Classification**

Encoded proteins from the ABC transporter superfamily are classified based on the sequence and organization of their nucleotide-binding domain(s) and similarity in gene structure. An inventory of all ABC transporters is kept by Müller (2003) at the website <http://www.nutrigene.4t.com/humanabc.htm>. The members of the seven human ABC transporter subfamilies are listed in Table 1 where proteins with a known activity in the transport of xenobiotics are highlighted. Two subfamily proteins are particularly involved in the transport of xenobiotics. These are the MDR (multidrug resistance)/TAP (Subfamily B) and the MRP (multidrug resistance-associated proteins) /CFTR (Subfamily C). Table 2 summarizes some properties of ABC transporters having a recognised role in the transport of xenobiotics.



Some ABC transporters with no evidence of function in the transport of drugs were found to be expressed in the heart. These will not be discussed extensively in this manuscript but are discussed elsewhere (Solbach et al., 2006).

TABLE 1

Classification of human ATP-binding cassette (ABC) transporters into subfamilies<sup>a</sup>

ABC1 (Subfamily A)	MDR/TAP (Subfamily B)	MRP/CFTR (Subfamily C)	ALD (Subfamily D)	OABP (Subfamily E)	GCN20 (Subfamily F)	White (Subfamily G)
ABCA1	<b>ABCB1 (MDR1 or P-GP)</b>	<b>ABCC1 (MRP1)</b>	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2	ABCB2 (TAP1)	<b>ABCC2 (MRP2 or cMOAT)</b>	ABCD2 (ALDR)		ABCF2	<b>ABCG2 (BCRP)</b>
ABCA3	ABCB3 (TAP2)	<b>ABCC3 (MRP3)</b>	ABCD3		ABCF3	ABCG4
ABCA4	<b>ABCB4 (MDR3)</b>	<b>ABCC4 (MRP4)</b>	ABCD4			ABCG5
ABCA5	ABCB5	<b>ABCC5 (MRP5)</b>				ABCG8
ABCA6	ABCB6	<b>ABCC6 (MRP6)</b>				
ABCA7	ABCB7	ABCC7 (CFTR)				
<b>ABCA8</b>	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
ABCA10	ABCB10	<b>ABCC10 (MRP7)</b>				
ABCA12	<b>ABCB11 (BSEP or SPGP)</b>	<b>ABCC11 (MRP8)</b>				
ABCA13		<b>ABCC12 (MRP9)</b>				
		ABCC13				

<sup>a</sup> Cells in boldface type represent ABC transporters having recognised activities in the transport of drugs.

TABLE 2 Properties of ABC Transporters Involved in Transport of Drugs

ABC Transporter	Number of transmembrane domains	Main Tissue Expression	Apical or basolateral localisation	Substrates <sup>a</sup>	Publications
ABCB1 (MDR1 or P-gp)	2	liver, kidney, intestine, brain, testis, adrenal gland, uterus, ovary	apical	quinidine, verapamil, celiprolol, talinolol, digoxin, daunorubicin, doxorubicin, vinblastine, etoposide, methotrexate, mitoxanthrone, paclitaxel, topotecan, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir	Ueda et al., 1987; Pastan et al., 1988; de Lannoy and Silverman, 1992; Hendricks et al., 1992; Peters and Roelofs, 1992; Karlsson et al., 1993; Kartner et al., 1983; de Graaf et al., 1996; Sparreboom et al., 1997; Kim et al., 1998; Gramatte and Oertel, 1999; Verschraagen et al., 1999; Jones et al., 2001
ABCB4 (MDR3)	2	liver	apical	vinblastine, paclitaxel, digoxin	Smith et al., 2000
ABCB11 (BSEP or SPGP)	2	liver, intestine	apical	vinblastine, cyclosporin, rifampicin	Török et al., 1999; Lecureur et al., 2000; Stieger et al., 2000
ABCC1 (MRP1)	3	intestine, brain, kidney, lung, testis	basolateral	doxorubicin, daunorubicin, vinblastine, vincristine, etoposide, methotrexate, paclitaxel, grepafloxacin	Cole et al., 1992; Cole et al., 1994; Flens et al., 1996; Sharp et al., 1998; Hooijer et al., 1999; Evers et al., 2000; Tamai et al., 2000; Cherrington et al., 2002
ABCC2 (MRP2 or MOAT)	3	liver, intestine, kidney	apical	cisplatin, doxorubicin, etoposide, vincristine, methotrexate, indinavir, ritonavir, saquinavir, adefovir, cidofovir	Schaub et al., 1997; Cui et al., 1999; Hooijberg et al., 1999; Kawabe et al., 1999; Fromm et al., 2000; Miller, 2001; Huisman et al., 2002
ABCC3 (MRP3)	3	intestine, kidney, liver, pancreas, placenta, colon	basolateral	daunorubicin, doxorubicin, vincristine, etoposide, teniposide, methotrexate	Kool et al., 1997; Belinsky et al., 1998; Kool et al., 1999; Zeng et al., 1999; St-Pierre et al., 2000; Zelcer et al., 2001
ABCC4 (MRP4)	2	prostate, lung, adrenal gland, ovary, testis	basolateral and apical (depending of cell type)	methotrexate, adefovir	Lee et al., 1998; Schuetz et al., 1999; Lee et al., 2000; Chen et al., 2002
ABCC5 (MRP5)	2	skeletal muscle, heart, brain	basolateral	Adefovir	Kool et al., 1997; Belinsky et al., 1998; Wijnholds et al., 2000; Haimneur et al., 2004
ABCC6 (MRP6)	3	kidney, liver	basolateral	cisplatin, doxorubicin, etoposide, daunorubicin,	Belinsky and Kruh, 1999; Bergen et al., 2000; Belinsky et al., 2002
ABCC10 (MRP7)	3	heart, skeletal, muscle, spleen, liver	Not determined	doxorubicin, vinblastine, vincristine, paclitaxel, docetaxel	Kao et al., 2002; Orr et al., 2003; Hopper-Borge et al., 2004
ABCC11 (MRP8)	2	breast, testis	Not determined	purine and pyrimidine nucleotide analogues	Bera et al., 2001
ABCC12 (MRP9)	2	breast, testis, brain, ovary, skeletal muscle	Not determined	Not determined	Bera et al., 2002
ABCG2 (BCRP)	1	placenta, brain	apical	daunorubicin, doxorubicin, etoposide, teniposide, methotrexate, mitoxanthrone, topotecan	Doyle et al., 1998; Maliepaard et al., 1999; Maliepaard et al., 2001; Volk et al., 2002; Allen et al., 2003; Volk and Schneider, 2003; Wang et al., 2003; Aronica et al., 2005
ABCA8	Not determined	heart, skeletal muscle, liver	Not determined	doxorubicin, digoxin	Tsuruoka et al., 2002

<sup>a</sup>Not an exhaustive list

## 1.4.2 Structure and Mechanisms of Action

ABC proteins typically contain 12 hydrophobic transmembrane regions that span the cell membrane. These regions are split into two halves forming two distinct transmembrane domains (TMD), each with a nucleotide-binding domain (NBD) (Figure 1A). P-gp, BSEP, MRP4, MRP5, MRP8, MRP9 are transporters having this structure. However, other multidrug resistance-associated proteins or MRP transporters (MRP1, MRP2, MRP3 and MRP6, MRP7) have an extra TMD towards the N-terminus comprising five extra transmembrane regions (Figure 1B). Finally, other ABC proteins such as BCRP are half transporters and contain only six transmembrane regions and one NBD (Hyde et al., 1990) (Figure 1C). ABC family members share 30-50% (200-250 amino acids) sequence homologies among them. The regions of high homology include the two NBDs that are located towards the cytoplasmic side of the membrane (Higgins et al., 1986; Hyde et al., 1990).

TMDs are thought to contain the substrate-binding site and it is suggested that differences in substrate specificities are a consequence of structurally divergent TMDs (Locher et al., 2002; Chang et al., 2003). NBDs are the sites of binding and hydrolysis of cytoplasmic ATP. Hydrolysis of ATP ensures availability of the energy required for the uphill transport of substrates (Schneider and Hunke, 1998). All ABC transporters contain within each NBD at least three highly conserved sequence motifs; the signature sequence, the Walker A and the Walker B (Figure 1). The signature sequence has been suggested to be involved in the transduction of ATP hydrolysis energy to the

conformational changes in the TMD responsible for the translocation of substrates (Hyde et al., 1990). Specific amino acids are important in Walker A and Walker B motifs. Indeed, an amino acid change of the lysine and aspartate residues in the Walker A and the Walker B motif, respectively, in either NBD, resulted in a loss of the ATP hydrolysis activity of the P-gp (Takada et al., 1998; Urbatsch et al., 1998; Hrycyna et al., 1999).

Visualisation of the structure is necessary to understand how ABC transporters translocate their substrates across cell membranes. The crystal structure of *E. Coli* vitamin B<sub>12</sub> transporter BtuCD and the x-ray structure of the MsbA, both bacterial ABC transporters, brought additional information (Locher et al., 2002; Reyes and Chang, 2005). For instance, it is now believed that nucleotide binding and hydrolysis is a property of dimeric NBD and not of an individual domain. The BtuCD structure demonstrated that no continuous channel is present through the membrane. It is suggested that a set of at least two gates is required in ABC transporters to alternatively block access to one side of the membrane or the other (Locher and Borths, 2004).

Crystal structures at higher resolution are required to elucidate additional fundamental questions such as the signal routes by which TMDs control ATPase activity in the NBD in response to substrate binding. Also, further information is required to

understand how NBDs use ATP hydrolysis energy to lead to conformational changes in the TMDs that are responsible for substrate translocation.

## **1.5 ATP-Binding Cassette Transporters and the Disposition of Drugs in Cardiac tissues**

### **1.5.1 Evidence for the Presence of ATP-Binding Cassette Transporters in the Heart**

#### **1.5.1.1 Use of Different Molecular Biology Techniques**

As mentioned earlier, ABC transporters first identified in tumor cells were later recognized to be expressed in normal tissues such as the heart. Table 3 summarizes evidence of the expression of ABC transporters in the heart using different molecular biology techniques.

It was demonstrated that P-glycoprotein (P-gp) is encoded by the *ABCB1* (also called *MDR1*) gene in human and by the *mdr1a* (also called *mdr3*) and *mdr1b* (also called *mdr1*) in rodents (Schinkel et al., 1997) (Table 4). The two P-gp isoforms in mice appeared to fulfill the same function as the single MDR1 in humans (Schinkel et al.,

1997). At the end of the 1980's and in the 1990's, the expression of P-gp in tissues was extensively studied. Studies using human heart tissues showed P-gp (MDR1) to be expressed in the heart, although generally at relatively low levels. The first study with such evidence was performed by Fojo et al. (1987) by slot blot hybridization. Subsequently, in the early 1990's, the immunohistochemistry technique was used to measure P-gp expression in human tissues including the heart. In 1990, van der Valk et al. colleagues obtained a strong staining in human cardiac muscle with C-219 antibody (that can also recognize MDR3/P-gp), a weak staining with a second antibody JSB-1 and an absence of staining with a third antibody MRK-16. Two years later, a strong staining was obtained in fetal heart specimens with the antibody C-219 but not with the MDR1 specific antibodies, MRK-16 and JSB-1. Therefore van Kalken et al. (1992) concluded that *MDR1* expression in the fetal heart was unlikely considering the lack of staining with MDR1 specific antibodies and the absence of mRNA expression by RNase protection assay. A similar study used four antibodies directed against MDR1 in endocardium, mid-myocardium and epicardium (Pavelic et al., 1993). Only mid-myocardium revealed weak immunostaining for three of the antibodies suggesting nevertheless the presence of P-gp in heart muscle. A few years later, a positive staining was also obtained with JSB-1 in human heart tissue indicating one more time the presence of P-gp in heart muscle (Sugawara et al., 1997). More recently, P-gp was detected by immunohistochemistry, using the antibody JSB-1, in fifteen human left ventricular and fifty-one excised auricular heart samples. Confirmation was obtained by

real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), which detected the expression of *MDR1* specific mRNA in all heart samples studied. Subsequently, immunohistochemistry and *in situ* hybridization techniques localised P-gp predominantly in endothelial cells of capillaries and arterioles. Since the expression of P-gp in cells of human heart vessels is similar to that of P-gp in brain, it was proposed that P-gp serve as a functional barrier between blood and cardiac myocytes (Meissner et al., 2002; Meissner et al., 2004). Another recent study revealed the presence of P-gp mRNA, although at very low levels, in the heart of an Asian male by RT-PCR (Nishimura et al., 2004).

Studies using RNase protection assay in rodents provided evidence of P-gp expression in the heart. Indeed, P-gp mRNA was detected, although at very low levels, in the heart of Chinese hamsters (Baas and Borst, 1988). Significant levels of both *mdr1a* and *mdr1b* mRNA were also found in BALB/c and C57Bl/6J mice using two different techniques (Croop et al., 1989; Teeter et al., 1990). In Wistar rats, *mdr1a* gene expression was observed using RT-PCR where the signal appeared stronger in cultured myocytes than in cardiac tissue from adult and newborn rats suggesting an *mdr1a* cardiac expression more specifically localised into myocytes (Cayre et al., 1996). This was confirmed a few years later by the study of Estevez et al., (2000) who demonstrated for the first time by immunohistochemistry (JSB-1 antibody) the expression of the P-gp protein in cardiomyocytes. The P-gp transporter was also found to be present in endothelial luminal membranes in rat heart although not restricted to this site (Beaulieu



et al., 1997). These results were in agreement with the results of Meissner et al., (2002) who demonstrated P-gp in endothelial cells of human heart small vessels.

The presence of the second isoform of P-gp, MDR3 in human and *mdr2* in rodents was as well studied. In human, RNase protection results demonstrated low levels of MDR3 mRNA in several tissues including the heart (Smit et al., 1994). In mice and rats, low to high levels of *mdr2* mRNA were obtained by different molecular biology techniques (Teeter et al., 1990; Brown et al., 1993; Croop et al., 1989; Furuya et al., 1994).

Expression of multidrug resistance proteins (MRPs) has been studied most extensively since the mid 90's. MRP1 was detected at high levels in the heart of several species including human (Flen et al., 1996; Wijnholds et al., 1997). Only one report did not detect MRP in human heart (Sugawara et al., 1997). *MRP1* mRNA was found to be abundant in the heart of CD1 mice and chickens by Northern blot analysis, and in rats by RT-PCR (Stride et al., 1996; Hagen et al., 2000; Rosati et al., 2003). Moreover, Ghosh et al. (2004) observed a cardiac *mrp1* gene expression by PCR in heart of Wistar rats which was increased in diabetic cardiomyocytes. Recently, the presence of *MRP1*, *MRP3* and *MRP2* mRNA at intermediate, low and very low levels, respectively, was demonstrated in human heart (Nishimura et al., 2004).

Immunohistochemistry revealed localization of another multidrug resistance protein, MRP5, in human heart. MRP5 mRNA was detectable by RT-PCR in twenty-one auricular and fifteen left ventricular human heart samples with auricular samples showing less MRP5 mRNA than ventricular samples (Dazert et al., 2003). MRP5 was found to be present in three different cell types in the heart: in vascular smooth muscle cells, in myocytes, and in vascular endothelial cells (Dazert et al., 2003). Kao and colleagues (2002) described that another member of the MRP subfamily, *mrp7*, was also present in the mouse heart. Using immunohistochemistry and Northern blot analysis they demonstrated that the mouse *mrp7* has two spliced transcripts, *mrp7A* and *mrp7B*, which both appeared to be expressed at similar levels.

Muramatsu et al. (2004) studied by RT-PCR mRNA expression of *mdr1a* and *mrp1* to *mrp7* in wild-type and combined *mdr1a/1b* (-/-), *mrp1* (-/-) weanling and adult mice in several tissues by RT-PCR. Notably, both *mdr1a* and *mrp1* were highly expressed in the heart and lung of wild-type weanling and adult mice. Moreover, *mrp3*, *mrp4* and *mrp5* showed relatively high levels of expression in the heart of both wild-type and knockout mice. For most transporters, levels of expression were more important in adult than in weanling mice.

The ABC transporter ABCG2 (also named BCRP) plays a major role in multidrug resistance. A recent study demonstrated the expression of ABCG2 in the

developing and adult mouse heart. This supports the presence of an ABCG2-expressing side population cells in the heart likely responsible for the development, maintenance, and repair of this organ (Martin et al., 2004). Moreover, Meissner et al., 2006 showed recently the presence of ABCG2 in endothelial cells in human heart.

One transporter from the ABCD subfamily, ABCD2, and some transporters from the ABCA subfamily were observed to be highly expressed in the human heart. The ABCA1, ABCA6, ABCA9 and ABCA10 genes were revealed to be ubiquitously expressed with highest mRNA levels in a few tissues including the heart (Kaminski et al., 2001; Piehler et al., 2002; Wenzel et al., 2003, Nashimura et al., 2004). ABCA5 was also found to be expressed in cardiomyocytes (Kubo et al., 2005). Moreover, the use of *abca5* (-/-) mice revealed an important physiological role of this transporter for the heart. ABCA8 mRNA expression was demonstrated to be widely distributed in various organs and especially well expressed in some tissues such as the heart (Tsuruoka et al., 2002). The ABCA8 protein is the only one from the ABCA subfamily that showed an activity in the transport of drugs. Moreover, the presence of ABCD2 (ALDR) mRNA in a variety of human tissues was revealed predominantly in heart and brain (Holzinger et al., 1997). Further work is required to elucidate the precise biological functions of ABCD2 and ABCA transporters.

Rosati et al., (2003) studied the physiological modulation of *mdr1a*, *mdr1b*, *mrp1* and *mrp2* in some tissues including the heart during rat ontogeny. In this research where hearts were collected at different developmental stages, both *mdr1a* and *mdr1b* levels of transcript were detected by RT-PCR and increased during rat ontogeny to obtain the highest levels at 30 and/or 60 days of age. These results suggest that ABC transporters play an important physiological role in the protection of the cardiac organ against xenobiotics and toxins, when for example the rat becomes independent from breast feeding (Rosati et al., 2003). In contrast, no variation with age was observed for *mrp1*, and the presence of *mrp2* was not detected in these hearts (Rosati et al., 2003).

Some contradictory results are still obtained relative to the presence of ABC transporters in the heart (Table 3). This may be due, at least in part, to the use of different techniques. For instance, with the immunohistochemistry technique, it is recommended for P-gp identification that C-219 antibody be used with caution due to its cross-reactivity with unrelated proteins. More than one antibody should be used to assess P-gp and ABC transporter expression in tissues (Pavelic et al., 1993; Jetté et al. 1995). Controversial results on expression levels may be due not only to a lack of correlation between mRNA and protein expression but also to cardiac cell type specific expression of the protein (i.e. myocytes, endothelial cells, smooth muscle).

**TABLE 3**  
**Presence of ABC transporters in the heart detected by different molecular biology techniques**

ABC Transporter	Heart Species	Technique	Expresion Level <sup>a</sup>	Publication
ABCB1 (MDR1 or P-gp)	Human	Slot blot hybridization	Low	Fojo et al., 1987
	Human	Immunohistochemistry	Very low	van der Valk et al., 1990
	Human fetus	Immunohistochemistry and RNase protection	Unlikely or very low	van Kalken et al., 1992
	Human	Immunohistochemistry	Low	Pavelic et al., 1993
	Human	Immunohistochemistry	Intermediate	Sugawara et al., 1997
	Human	RT-PCR and immunohistochemistry	Present <sup>b</sup>	Meissner et al., 2002
	Human	RT-PCR and immunohistochemistry	Present <sup>b</sup>	Meissner et al., 2004
ABCB1 (MDR1 or P-gp)	Chinese hamster	RNase protection	Very low	Baas and Borst, 1988
	C57Bl/6J mouse	Hybridization/ Northern blot	Intermediate	Croop et al., 1989
	BALB/c mouse	RNase protection	Low	Teeter et al., 1990
	Wistar newborn and adult rat	RT-PCR	Low/intermediate	Cayre et al., 1996
	Wistar newborn rat cultured ventricular myocytes	RT-PCR	High	Cayre et al., 1996
	Sprague-Dawley rat	Western blot and immunodetection	Intermediate	Beaulieu et al., 1997
	Wistar rat	Immunohistochemistry	Present <sup>b</sup>	Estevez et al., 2000
	Wistar rat	RT-PCR	Present <sup>b</sup>	Rosati et al., 2003
	FVB mouse	RT-PCR	High <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
ABCB4 (MDR3)	Human	RNase protection	Low	Smit et al., 1994
	Human	Immunohistochemistry	Not detected probably due to a too low level	Smit et al., 1994
ABCB4 (MDR2)	C57Bl/6J mouse	Hybridization/ Northern blot	Intermediate	Croop et al., 1989
	BALB/c mouse	RNase protection	Intermediate	Teeter et al., 1990
	Fisher rat	RNase protection	High	Brown et al., 1993
	Sprague-Dawley rat	Northern blot and PCR	Low	Furuya et al., 1994

(Table 3 continued)

ABCC1 (MRP1)	Human	Immunohistochemistry	High	<sup>c</sup> Flens et al., 1996
	CD1 mouse	Northern blot	High	<sup>c</sup> Stride et al., 1996
	Human	Immunohistochemistry	Not detected	<sup>c</sup> Sugawara et al., 1997
	FVB mouse	Western blot	Present <sup>b</sup>	Wijnholds et al., 1997
	Chicken	Northern blot	High	Hagen et al., 2000
	Wistar rat	RT-PCR	Present <sup>b</sup>	Rosati et al., 2003
	Wistar rat	PCR	Present <sup>b</sup>	Ghosh et al., 2004
	FVB mouse	RT-PCR	High <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
Human	RT-PCR	Intermediate <sup>e</sup>	Nishimura et al., 2004	
ABCC2 (MRP2 cMOAT)	or			
	Wistar rat	RT-PCR	Not detected	Rosati et al., 2003
	FVB mouse	RT-PCR	Low <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
	Human	RT-PCR	Very low <sup>e</sup>	Nishimura et al., 2004
ABCC3 (MRP3)	FVB mouse	RT-PCR	Intermediate <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
	Human	RT-PCR	Low <sup>e</sup>	Nishimura et al., 2004
ABCC4 (MRP4)	FVB mouse	RT-PCR	Intermediate <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
ABCC5 (MRP5)	Human	RT-PCR and immunohistochemistry	Present <sup>b</sup>	Dazert et al., 2003
	FVB mouse	RT-PCR	Intermediate <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
ABCC6 (MRP6)	FVB mouse	RT-PCR	Very low <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
ABCC10 (MRP7)	Mouse	RT-PCR and Northern blot	Present <sup>b</sup>	Kao et al., 2002
	FVB mouse	RT-PCR	Intermediate <sup>e</sup>	Muramatsu et al., 2004
ABCG2 (BCRP)	C57Bl/6 mouse	RT-PCR and immunohistochemistry	Present <sup>b</sup>	Martin et al., 2004
	Human	RT-PCR and immunohistochemistry	Present <sup>b</sup>	Meissner et al., 2006

(Table 3 Continued)

ABCA1 <sup>d</sup>	Human	RT-PCR	High <sup>e</sup>	Nishimura et al., 2004
ABCA5 <sup>d</sup>	Mouse	Immunohistochemistry	Present <sup>b</sup>	Kubo et al., 2005
ABCA6 <sup>d</sup>	Human	RT-PCR and dot blot analysis	High	Kaminski et al., 2001
ABCA9 <sup>d</sup>	Human	RT-PCR and dot blot analysis	High	Piebler et al., 2002
ABCA8	Human	Northern blot	High	Tsuruoka et al., 2002
ABCA10 <sup>d</sup>	Human	RT-PCR and dot blot analysis	High	Wenzel et al., 2003
ABCD2 (ALDR) <sup>d</sup>	Human	Northern blot	High	Holzinger et al., 1997

<sup>a</sup> Relative since assessed by different authors.

<sup>b</sup> Present means that the level can not be compared to other tissues as only heart was studied or a very few tissues including the heart.

<sup>c</sup> Not specified in the publication but likely corresponds to MRP1.

<sup>d</sup> No evidence in the literature of the role of this ABC transporter in drug disposition.

<sup>e</sup> Assessed by authors of this review based on comparison with other tissues analysed.

TABLE 4  
Classification of mammalian P-glycoprotein isoforms

P-gp Class	I	II	III <sup>a</sup>
Human	MDR1 <sup>b</sup>		MDR3 <sup>c</sup> (MDR2) <sup>h</sup>
Mouse	<i>mdr3<sup>d</sup> (mdr1a)<sup>i</sup></i>	<i>mdr1<sup>e</sup> (mdr1b)<sup>i</sup></i>	<i>mdr2<sup>f</sup></i>
Hamster	P-gp1 <sup>g</sup>	P-gp2 <sup>g</sup>	P-gp3 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Rather involved in phospholipids transport (Smit et al., 1993).

The nomenclature of the human, mouse, and hamster P-gp genes is according to <sup>b</sup>Chen et al., 1986; <sup>c</sup>Van der Blik et al., 1987; <sup>d</sup>Devault and Gros, 1990; <sup>e</sup>Gros et al., 1986; <sup>f</sup>Gros et al., 1988; and <sup>g</sup>Ng et al., 1989. Alternative designations are given in parentheses; <sup>h</sup>Roninson et al., 1986 and <sup>i</sup>Hsu et al., 1989. Table adapted from Smit et al., 1994.

### 1.5.1.2 Use of Knockout Mice

The generation of mice genetically disrupted for ABC transporter genes has been very useful in the investigation of the assessment of the role of these transporters in the metabolism of specific drugs. The use of these knockout mice is especially relevant to assess the safety of an anti-cancer drug when it is expected to be co-administered with a multidrug resistance-reversing agent that block P-gp, or to predict drug-drug interaction toxicities. For instance, toxicities observed following the administration of a compound in *mdr1a* (-/-) or *mdr1a/1b* (-/-) mice, compared to wild-type animals, would predict toxicities following the co-administration of this compound and P-gp substrates, as these mice are deficient in P-gp. We reviewed, in Table 5, literature evidence of increased



cardiac concentrations of drugs in mice deficient in ABC transporters. This indirectly suggests the presence and role of ABC transporter proteins in the heart.

Schinkel et al. (1994) demonstrated the importance of P-gp using *mdr1a* (-/-) in the metabolism of vinblastine in several tissues including the heart. The absence of *mdr1a* gene had a clear effect on vinblastine concentrations. The most striking effect was observed in heart, which had 7- to 14-fold higher concentration of vinblastine in *mdr1a* (-/-) mice between 8 and 24 hours after injection of 6 mg/kg. This indicated that the absence of *mdr1a* P-gp had an important effect on the pharmacokinetics and tissue distribution of vinblastine (Schinkel et al., 1994; van Asperen et al., 1996). Another study showed that following a 96-hour infusion, vinblastine levels in the heart of *mdr1a* (-/-) mice were 1.7-fold higher than in control animals, suggesting again a likely important role of P-gp in the protection of the heart (van Asperen et al., 1999).

RNase protection assays demonstrated an increased expression of *mdr1b* in kidney and liver in *mdr1a* (-/-) or *mdr1a* (+/-) mice compared to wild-type mice. This overexpression was attributed to a possible compensatory response of the organs to the decrease of functional *mdr1a* P-gp, intended to limit effects of *mdr1a* absence in drug disposition (Schinkel et al., 1994). This compensatory mechanism of *mdr1b* does not seem to be present in the heart since as mentioned above, the elimination of vinblastine was much more longer in *mdr1a* (-/-) mice than in wild-type, although it is known that

the heart contains significant and similar levels of both *mdr1a* and *mdr1b* mRNA (Croop et al., 1989; Teeter et al., 1990; Schinkel et al., 1994). Another study suggested an absence of a compensatory response in the heart from the *mrp2* to *mrp7* transporters in combined *mdr1a/1b* (-/-), *mrp1* (-/-) weanling and adult mice. Indeed, RT-PCR analysis showed that expression of *mrp2* to *mrp7* was not higher in combined *mdr1a/1b* (-/-), *mrp1* (-/-) mice compared to wild-type mice (Muramatsu et al., 2004).

Experiments have been performed with drugs that are not anti-cancer agents to determine affinity of drugs for ABC transporters. Higher levels, approximately 2-fold, of <sup>3</sup>H-loperamide (Schinkel et al., 1996) and enaminone anticonvulsants (Cox et al., 2002) were found in some tissues such as the heart following administration of the drugs in *mdr1a* (-/-) or *mdr1a/1b* (-/-) mice compared to wild-type mice.

The role of the ABC transporter *mrp1* in the pharmacokinetics and drug distribution of etoposide, an anti-cancer drug, was studied using triple-knockout (*mrp1* (-/-)/*mdr1a/1b* (-/-)) and double-knockout (*mdr1a/1b* (-/-)) mice. In the triple-knockout mice lacking *mrp1* protein, an increase in etoposide accumulation in some tissues including the heart (1.3-fold at 4 hours post-administration) was observed compared to double-knockout mice. This observation indicated that the ABC transporter *mrp1* contributes to the protection of the heart against drugs like etoposide (Wijnholds et al., 2000).

The transporter *mrp1* has been studied recently using a fluoroquinolone antibiotic, grepafloxacin. The latter drug was administered intravenously to *mrp1* (-/-), *mdr1a* (-/-), *mdr1a/1b* (-/-) and wild-type mice. The tissue-to-plasma concentration ratio was significantly higher in several tissues of *mrp1* (-/-) mice such as the heart compared to wild-type animals, which was not the case for *mdr1a* (-/-) and *mdr1a/1b* (-/-) mice. This latter finding is surprising considering that grepafloxacin is a well recognised substrate of P-gp (Tamai et al., 2000; Naruhashi et al., 2001; Lowes and Simmons, 2002). This interesting observation suggested that *mrp1* makes a significant contribution to the distribution of its substrates in several tissues including the heart (Sasabe et al., 2004).

Another study confirmed the importance of P-gp and/or *mrp1* in the tissue distribution of vincristine by the use of combined *mdr1a/1b* (-/-), *mrp1* (-/-) mice and wild-type mice. Indeed, the knockout mice showed significantly higher tissue-to-plasma concentration ratio compared to wild-type mice in several tissues, especially in cardiopulmonary structures (Muramatsu et al., 2004).

TABLE 5

*In-vivo* evidence of the presence of ABC transporters in the heart by the use of knockout mice

ABC Transporter Studied	Mice Type	Publication
<b>mdr1a/1b (P-gp or ABCB1)</b>		
Vinblastine levels were about 3 fold higher in heart of <i>mdr1a</i> (-/-) mice which had a longer elimination vs. wild-type mice.	<i>mdr1a</i> (-/-) and wild-type	Schinkel et al., 1994
In <i>mdr1a</i> (-/-) mice, heart accumulated increased amount of vinblastine vs. wild-type mice.	<i>mdr1a</i> (-/-) and wild-type	van Asperen et al., 1996
Tissue levels of radioactivity in some tissues including the heart of <i>mdr1a</i> (-/-) mice is 2-fold higher following administration of <sup>3</sup> H-loperamide vs. wild-type mice.	<i>mdr1a</i> (-/-) and wild-type	Schinkel et al., 1996
A 1.7-fold increase in accumulation of vinblastine was observed in heart of <i>mdr1a</i> (-/-) mice vs. wild-type mice.	<i>mdr1a</i> (-/-) and wild-type	van Asperen et al., 1999
Tissues such as the heart displayed at least 2-fold higher tissue levels in <i>mdr1a/1b</i> (-/-) following administration of enaminone anticonvulsants vs. wild-type mice.	<i>mdr1a/1b</i> (-/-) and wild-type	Cox et al., 2002
<b>mrp1 (ABCC1)</b>		
There was increased toxicity in the <sup>b</sup> TKO mice that accumulated etoposide in some tissues like the heart vs. <sup>a</sup> DKO mice.	<sup>a</sup> DKO, <sup>b</sup> TKO and wild-type	Wijnholds et al., 2000
A higher tissue-to-plasma ratio was observed in some tissues such as the heart in <i>mrp1</i> (-/-) following administration of grepafloxacin vs. wild-type mice.	<i>mdr1a/1b</i> (-/-), <i>mdr1a</i> (-/-), <i>mrp1</i> (-/-) and wild-type	Sasabe et al., 2004
<b>mdr1a/1b (P-gp or ABCB1) and mrp1 (ABCC1)</b>		
Vincristine tissue/plasma ratio comparisons showed higher values in the heart of both weanling and adult combined <i>mdr1a/1b</i> (-/-), <i>mrp1</i> (-/-) mice than in wild-type mice.	<sup>b</sup> TKO and wild-type	Muramatsu et al., 2004

<sup>a</sup>DKO means *mdr1a* and *mdr1b* double-knockout mice (or *mdr1a/1b* (-/-))<sup>b</sup>TKO means *mrp1*, *mdr1a* and *mdr1b* triple-knockout mice (or *mrp1* (-/-)/*mdr1a/1b* (-/-))

## 1.5.2 Cardiotoxicity Related to ATP-Binding-Cassette Transporters

A wide range of drugs has been identified as highly effective modulators of P-gp and able to restore drug sensitivity of resistant tumor cells. These are called multidrug resistance-reversing agents. Blockade of ABC transporters *in-vivo* by multidrug resistance-reversing agents inevitably changes drug distribution and metabolism of anticancer agents because of the inhibition of the normal protective function of P-gp in normal tissues. As a result, plasma and tissue concentrations of drugs increase and may result in toxicity.

Cardiotoxicities linked to increased heart drug concentrations following co-administration of antineoplastic agents and agents that reverse multidrug resistance have been reported. Table 6 summarizes these evidences. For instance, it was found that calcium channel blockers like nifedipine, flunarizine, verapamil or other agents that reverse MDR, increased intracellular concentrations of anthracycline drugs like doxorubicin, daunorubicin and idarubicin in cardiomyocytes (Santostasi et al., 1991; Cayre et al., 1996) and *ex-vivo* (Kang and Weiss, 2001) potentiating cardiotoxicities. A study performed approximately at the same period showed that the co-administration of verapamil and doxorubicin in mice increased the peak concentration of doxorubicin in the heart by 40%, augmented the incidence and severity of degenerative changes in cardiac tissue, and decreased the survival rate compared to

doxorubicin alone (Sridhar et al., 1992). Other studies in rodents demonstrated that cyclosporine A or its analogue PSC 833 could increase doxorubicin (Colombo et al., 1994; Bellamy et al., 1995; Gonzalez et al., 1995; Colombo et al., 1996a) and etoposide concentrations (Cárcel-Trullols et al., 2004) in several tissues including the heart. This may be correlated with a higher incidence and severity of myocardial damage when cyclosporine A and doxorubicin were administered in combination (Bellamy et al., 1995). The mechanism responsible for the enhanced cardiotoxicities is likely related to an accumulation of drugs in the heart due to the inhibition of P-gp, or other ABC transporters, by agents like verapamil, cyclosporine A or PSC 833. These findings suggested that caution is advisable when prescribing a combination of one of these drugs to reverse the multidrug resistance to cancer patients.

It was shown that heart distribution of the anthracycline drug, epidoxorubicin, was significantly increased by a 30-minute pre-treatment with paclitaxel or cremophor in CDF1 mice. Indeed, heart epidoxorubicin levels were two times higher in mice pre-treated with paclitaxel and markedly higher in mice pre-treated with cremophor compared with those treated with epidoxorubicin alone. This suggested that the cardiotoxicity induced by anthracycline drugs could be increased when co-administered with paclitaxel (Colombo et al., 1996b). In line with this previous finding, a reduction in heart contractility and the development of congestive heart failure was obtained with a co-administration of doxorubicin and paclitaxel in human

(Gianni et al., 1995). Again, ABC transporters are thought to influence the distribution of epidoxorubicin to the heart and toxicities induced by paclitaxel.

Cardiotoxicities in patients were also observed with the concomitant administration of verapamil and erythromycin or clarithromycin. The bradychardia and hypotension symptoms developed following verapamil and clarithromycin intake disappeared with the withdrawal of verapamil (Kaeser et al., 1998; Steenbergen, 1998). Similarly, Goldschmidt et al. (2001) reported a case where a patient had an AV block and a QT interval prolongation following co-administration of erythromycin and verapamil. Although it was not possible in these human studies to know whether there is an increase in the heart concentration of the drug responsible for cardiotoxicities, it is likely that ABC transporters, like P-gp, would be involved in these observed cardiotoxicities. Indeed, verapamil (Kim, 2002), clarithromycin (Wakasugi et al., 1998) and erythromycin (Schuetz et al., 1998; Takano et al., 1998; Kim et al., 1999) are well known substrates of P-gp. Therefore a possible mechanism of action would be the increase of drug concentrations in cardiac tissues producing cardiotoxicities due to an inhibition of heart P-gp.

Recently, investigation of the effects of the anti-histamine agent ketotifen on multidrug resistance in human breast cancer cells and doxorubicin toxicity in mice demonstrated that ketotifen increased accumulation of doxorubicin in cardiac tissues, likely due to a block of P-gp. However, ketotifen pre-treatment did not enhance

doxorubicin cardiotoxicities, but in fact provided protection both at the level of cardiac tissue damage and in terms of survival (Zhang and Berger, 2003).

Moreover, because of the toxic irreversible cardiac toxicity produced by doxorubicin therapy, which includes mitochondrial damage, myofibril degeneration and vacuolar changes, a team of investigators generated transgenic mice that overexpressed the human multidrug resistance cDNA (MDR1) specifically in the cardiac muscle. The administration of a single or repeated doses of doxorubicin intravenously led to degenerative changes in the heart of control mice that were absent in transgenic animals (Dell'Acqua et al., 1999). This interesting experiment provided strong evidence that *MDR1* gene therapy in the heart could provide protection against doxorubicin heart toxicity, which confirms again the important role of P-gp in detoxification processes of the heart.



TABLE 6

## Drug-drug interactions and increased concentrations in the heart

Drugs and Effects	Study Type	Species	Publication
Calcium channel blockers that reverse MDR increased levels of anthracyclines and potentiated cardiotoxicity.	<i>In-Vitro</i>	Sprague-Dawley Rat	Santostasi et al., 1991
Mice treated with verapamil and doxorubicin had a lower survival rate, higher incidence and severity of degenerative changes in cardiac tissue, and a higher peak concentration of doxorubicin in the heart compared with mice treated with doxorubicin alone.	<i>In-Vivo</i>	(BALB/c x DBA/2)F1 Mouse	Sridhar et al., 1992
Cyclosporine A increased doxorubicin concentration in heart.	<i>In-Vivo</i>	CrI/CD BR Rat and CD <sub>2</sub> F <sub>1</sub> /CrI BR Mouse	Colombo et al., 1994
Increase of cardiac levels of doxorubicin when cyclosporine A administered and higher incidence and severity of myocardial damage.	<i>In-Vivo</i>	SCID Mouse	Bellamy et al., 1995
Greater AUC of doxorubicin in the heart when combined with PSC 833 (cyclosporine A analogue).	<i>In-Vivo</i>	CDF1 Mouse	Gonzalez et al., 1995
When myocardial cells incubated with daunorubicin and MDR reversing agent (verapamil, PSC 833 or S9788), a moderate but significant intracellular increase of 3H-daunorubicin was obtained.	<i>In-Vitro</i>	Wistar newborn rat ventricular myocytes	Cayre et al., 1996
Doxorubicin concentration increased in heart of mice pre-treated with PSC 833.	<i>In-Vivo</i>	BDF1 Mouse	Colombo et al., 1996a
There is an increased cardiotoxicity of doxorubicin in the presence of amiodarone.	<i>In-Vitro</i>	Neonatal Wistar rat	Estevez et al., 2000
Myocardial uptake of idarubicin (anticancer) was increased by verapamil.	<i>Ex-Vivo</i>	Sprague-Dawley Rat	Kang and Weiss, 2001
Higher tissue concentration of etoposide in heart following cyclosporine A administration.	<i>In-Vivo</i>	Wistar Rat	Cárcel-Trullols et al., 2004
Pre-treatment with paclitaxel induced a significant increase in epidoxorubicin in the heart.	<i>In-Vivo</i>	CDF1 Mouse	Colombo et al., 1996b
The reduction of heart contractility and the development of congestive heart failure were obtained with doxorubicin and paclitaxel combination.	<i>In-Vivo</i>	Human	Gianni et al., 1995
Patient received verapamil and clarithromycin and developed bradycardia and hypotension. Withdrawal of verapamil resulted in resolution of symptoms.	<i>In-Vivo</i>	Human	Kaeser et al., 1998
Patient was taking verapamil and developed bradycardia while receiving erythromycin and clarithromycin.	<i>In-Vivo</i>	Human	Steenbergen, 1998
Following co-administration of erythromycin and verapamil, the patient had AV block and QT interval prolongation.	<i>In-Vivo</i>	Human	Goldschmidt et al., 2001

### 1.5.3 ATP-Binding-Cassette Transporters and Drug-

#### Induced Long QT Syndrome

Drug-induced prolongation of cardiac repolarization (drug-induced Long QT syndrome) is currently a major concern for drug industry and regulatory agencies. But more importantly, it remains a major concern for patient's safety. It is now well accepted that a block of the specific cardiac potassium current, the rapid component of the delayed rectifier channel ( $I_{Kr}$ ) encoded by the *human ether-a-go-go related gene (hERG)*, is the underlying mechanism of prolonged repolarization observed in patients undergoing treatment with some QT-prolonging drugs.

Excessive prolongation of cardiac repolarization (QT) increases the risk of early afterdepolarisation that could trigger, in the context of increased dispersed repolarization, a polymorphic ventricular tachycardia termed *torsades de pointes*. The  $I_{Kr}$  binding site for currently used drugs is believed to be on the intracellular site of the channel embedded in the plasma membrane (Zou et al., 1997; Zhang et al., 1999). Consequently, factors such as ABC transporters that regulate intracellular concentrations of  $I_{Kr}$  binding drugs could modulate risk of cardiac toxicity.

## **1.6 Expression of ATP-Binding Cassette**

### **Transporters**

#### **1.6.1 Regulation of Expression of ATP-Binding Cassette**

##### **Transporters**

###### **1.6.1.1 Regulation by Drugs**

Drugs have been shown to contribute to an increase in the expression of ABC transporters in tissues. Jetté and co-workers (1996) showed that following daily administration for 5 days of cyclosporine A (10 mg/kg) to rats, an increase in P-gp expression of 82% in the heart, compared with control groups, was obtained. After the interruption of cyclosporine A administration, values returned to control levels after 9 days. Therefore, cyclosporine A seemed to modulate the expression of P-gp in normal tissues *in-vivo* in a reversible way. However, these results should be taken with caution as only C219 antibody was used (Thiebaut et al., 1989; Liu et al., 1997).

More recently, a study demonstrated that a 10-day treatment in Ehrlich ascites carcinoma cell-inoculated mice with rifampicin or verapamil increased levels of P-gp proteins. On the other hand, no increase in the transcripts of *mdr1a* was detected (Granzotto et al., 2004). The increase in protein expression without an increase in mRNA was observed by other investigators who attributed this observation to an

increased half-life of the ABC transporter protein or a post translational effect of drugs (Hill et al., 1990; Westphal et al., 2000). However, another recent study demonstrated that in tubular renal cell line, a 15-day treatment with rifampicin significantly increased the mRNA levels of P-gp, MRP1, MRP2, LRP and cytochrome P450 3A4 but an increase in protein was observed only for P-gp and MRP2 transporters (Magnarin et al., 2004).

Little attention has been paid to the possibility that the expression of ABC transporters may be affected by administration of compounds given to cancer patients for other pathologies. For example, it is not rare that cardiovascular diseases affect cancer patients. Many drugs commonly administered in patients with heart failure are P-gp substrates such as amiodarone, losartan and digoxin (Schinkel et al., 1995; Soldner et al., 2000). A chronic treatment with ABC transporter substrates could therefore potentially increase the expression level of these proteins, thereby conferring drug resistance to cancer cells in these situations, and promoting therapeutic failure.

Greiner et al., (1999) have suggested that P-gp induction may be restricted to some cell types; however, few data exist about the induction of P-gp in tissues. Therefore, further studies are required to assess the implication of ABC transporter induction in tissues such as the heart, which could lead to important consequences in therapeutic effects and cardiotoxicities.

### **1.6.1.2 Regulation by Pathological Conditions**

Quantitative analysis of MRP5 in ventricular heart samples from patients suffering from ischemic cardiomyopathy compared to patients having dilated cardiomyopathy or a normal heart suggested an up-regulation of MRP5 under ischemic conditions (Dazert et al., 2003). Another investigation pointed to reduced expression of P-gp in patients with dilated cardiomyopathy compared to patients with ischemic cardiomyopathy or healthy heart. This latter result was consistent both at the protein and mRNA levels (Meissner et al., 2002). Recently, the same team of investigators demonstrated that cardiac expression of BCRP was up-regulated in patients with both dilative and ischemic cardiomyopathy (Meissner et al., 2006). Sims and colleagues (2004) could not demonstrate a change in myocardial expression of P-gp associated with heart failure.

Further observations on the effect of pathological conditions on ABC transporter expression remain to be demonstrated.

### **1.6.2 Polymorphisms**

Therapeutic effects following the administration of a drug show a wide inter-individual variability, which may in part be explained by expression of drug

transporters in human tissues. This variability can be partly explained by polymorphisms of ABC transporter genes.

The silent mutation at position 3435 in exon 26 (C3435) is the only polymorphism identified so far that affects P-glycoprotein expression in human tissues (Hoffmeyer et al., 2000). For instance, in the human kidney, subjects with TT genotype had 1.5-fold lower P-glycoprotein expression compared to the CC genotype (Siegmund et al., 2002). Similarly, in small intestine two-fold lower intestinal *MDRI* expression or P-gp levels were observed in the carriers homozygous for the T-allele compared to the CC genotype (Hoffmeyer et al., 2000; Schwab et al., 2003). In line with the latter finding, higher digoxin plasma concentrations were found in patients with the 3435TT genotype compared with individuals with the 3435CC genotype (Hoffmeyer et al., 2000). This relationship between *MDRI* polymorphism/P-gp expression and drug disposition was not observed for other drugs such as, cyclosporine, talinolol and loperamide (von Ahsen et al., 2001; Siegmund et al., 2002; Pauli-Magnus et al., 2003). Moreover, the opposite trend was observed in some investigations. For instance, Fellay and colleagues (2002) obtained higher plasma concentrations of nelfinavir with the CC genotype compared with the TT and CT genotypes. Several studies were performed attempting to correlate *MDRI* polymorphisms, particularly C3435T, to changes in P-gp expression and function which led to contradictions. A possible explanation for these discrepancies is that most studies have focused on individual polymorphism, like C3435T alone, instead

of accounting for combinations of single nucleotide polymorphisms (SNPs) potentially linked, called haplotypes (Woodahl and Ho, 2004). Environmental factors and interethnic differences could have been influencing factors.

Up until recently, there was no evidence in the literature discussing the impact of ABC transporter polymorphisms at the cardiac level. It could be predicted that low or high cardiac expression of P-gp would increase or reduce, respectively, uptake of P-gp substrate drugs leading to important therapeutic or toxic implications. Meissner and co-workers (2004) investigated the significance of the *MDR1* gene polymorphism for cardiac P-gp expression levels. They observed no significant influence of the exon 26 C3435T genotype on *MDR1* mRNA expression in human heart samples from the auricles. Further studies are required to assess the clinical relevance of *MDR1* as well as other ABC transporter gene polymorphisms, especially at the ventricular level.

## **1.7 Summary and Future Perspectives**

There are approximately fifty ABC transporters discovered so far in human and among them, we reported that fourteen transporters have at least one published evidence of activity in the transport of xenobiotics. In this review, we summarized literature evidence of the presence of these ABC transporters in the cardiac tissues by the use of molecular biology techniques. Indirect evidence of the expression of these

transporters in the heart were as well obtained by the use of knockout mice devoid of ABC transporter genes. Indeed, an increase in the cardiac uptake of ABC transporter substrates in these animals led to convincing proof of the involvement of these proteins in the distribution of drugs to cardiac tissues. Moreover, cases of increased concentrations of drugs in the heart and cardiotoxicities occurring following the administration of concomitant ABC transporter substrates appear to confirm the important role of these proteins in the transport of drugs to the heart.

Underlying mechanisms of cardiac toxicities following administration of ABC transporters substrates are probably complex. Ion channels involved in the generation of cardiac action potential are likely one of the key factors indirectly affected by the modulation of ABC transporters in the production of cardiac adverse effects, just as the inhibition of the  $I_{Kr}$  channel in the etiology of the drug-induced long QT syndrome.

Regulation of expression of ABC transporters remains an obscure subject considering contradictions reported in the literature in regards to drug induction. Interestingly, it was reported that the expression of ABC transporters in the heart could be modulated by cardiac pathologies. Polymorphisms in ABC transporter genes have been shown to modulate drug disposition although their impact on cardiac drug levels remains to be demonstrated. Also, there is some evidence for the



involvement of polymorphisms in drug disposition although none so far with an impact at the cardiac level.

Although P-gp remains the most studied ABC transporter, the expression of MRP transporters in the heart and *in-vivo* observations with knockout mice strongly demonstrated the high involvement of MRPs in the distribution of drugs to cardiac tissues. Over the next years, increasing observations promoting the involvement of MRPs in the distribution of drugs to the heart might emerge.

In brief, we are still at an early stage in the discovery of ABC transporters and their involvement in the distribution of drugs to the heart. Nevertheless, several pieces of information already indicate a major role of ABC transporters for drug efficacy or toxicity in the heart.

## **1.8 Acknowledgments**

We would like to thank Rx&D's Health Research Foundation and the Faculté de pharmacie of the Université de Montréal for the Robert-Dugal grant awarded to Lucie Couture.

## 1.9 References

Allen JD, Van Dort SC, Buitelaar M, van Tellingen O, and Schinkel AH (2003) Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res* **63**:1339-1344.

Aronica A, Gorter JA, Redeker S, van Vliet EA, Ramkema, M, Scheffer GL, Scheper RJ, van der Valk P, Leenstra, S, Baayen JC, WGM Spliet, and Troost D (2005) Localization of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Microvessel Endothelium of Human Control and Epileptic Brain. *Epilepsia* **46**:849-857.

Baas F, and Borst P (1988) The tissue dependent expression of hamster P-glycoprotein genes. *FEBS Lett* **229**:329-332.

Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, and Béliveau R (1997) P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J* **326**:539-544.

Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR, and Kruh GD (1998) Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J Natl Cancer Inst* **90**:1735-1741.

Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, and Kruh GD (2002) Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* **62**:6172-6177.

Belinsky MG, and Kruh GD (1999) MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br J Cancer* **80**:1342-1349.

Bellamy WT, Peng YM, Odeleye A, Ellsworth L, Xu MJ, Grogan TM, and Weinstein RS (1995) Cardiotoxicity in the SCID mouse following administration of doxorubicin and cyclosporin A. *Anticancer Drugs* **6**:736-743.

Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, and Pastan I (2002) MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:6997-7002.

Bera TK, Lee S, Salvatore G, Lee B, and Pastan I. (2001) MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol Med.* **7**:509-516.

Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, and de Jong PT (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* **25**:228-231.

Brown PC, Thorgeirsson SS, and Silverman JA (1993) Cloning and regulation of the rat *mdr2* gene. *Nucleic Acids Res* **21**:3885-3891.

Cárcel-Trullols J, Torres-Molina F, Araico A, Saadeddin A, and Peris JE (2004) Effect of cyclosporine A on the tissue distribution and pharmacokinetics of etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol* **54**:153-160.

Cayre A, Moins N, Finat-Duclos F, Maublant J, Albuisson E, and Verrelle P (1996) In vitro detection of the MDR phenotype in rat myocardium: use of PCR, [<sup>3</sup>H]daunomycin and MDR reversing agents. *Anticancer Drugs* **7**:833-837.

Chang G (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* **330**:419-430.

Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, and Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**:381-389.

Chen ZS, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, and Kruh GD (2002) Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res* **62**:3144-3150.

Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, and Klaassen CD (2002) Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:97-104.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, and Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**:1650-1654.

Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, and Deeley RG (1994) Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* **54**:5902-5910.

Colombo T, Gonzalez Paz O, and D'Incalci M (1996a) Distribution and activity of doxorubicin combined with SDZ PSC 833 in mice with P388 and P388/DOX leukaemia. *Br J Cancer* **73**:866-871.

Colombo T, Gonzalez Paz O, Zucchetti M, Maneo A, Sessa C, Goldhirsch A, and D'Incalci M (1996b) Paclitaxel induces significant changes in epidoxorubicin distribution in mice. *Ann Oncol* **7**:801-5.

Colombo T, Zucchetti M, and D'Incalci M (1994) Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther* **269**:22-27.

Cox DS, Scott KR, Gao H, and Eddington ND (2002) Effect of P-glycoprotein on the pharmacokinetics and tissue distribution of enaminone anticonvulsants: Analysis by population and physiological approaches. *J Pharmacol Exp Ther* **302**:1096-1104.

Croop JM, Raymond M, Haber D, Devault A, Arceci RJ, Gros P, and Housman DE (1989) The three mouse multidrug resistance (mdr) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol* **9**:1346-1350.

Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, and Keppler D (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* **55**:929-937.

Dano K (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* **323**:466-483.

Dazert P, Meissner K, Vogelgesang S, Heydrich B, Eckel L, Bohm M, Warzok R, Kerb R, Brinkmann U, Schaeffeler E, Schwab M, Cascorbi I, Jedlitschky G, and Kroemer HK (2003) Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am J Pathol* **163**:1567-1577.

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

de Graaf D, Sharma RC, Mechetner EB, Schimke RT, and Roninson IB (1996) P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:1238-1242.

de Lannoy IA, and Silverman M (1992) The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **189**:551-557.

Dell'Acqua G, Polishchuck R, Fallon JT, and Gordon JW (1999) Cardiac resistance to adriamycin in transgenic mice expressing a rat alpha-cardiac myosin heavy chain/human multiple drug resistance 1 fusion gene. *Hum Gene Ther* **10**:1269-1279.



Devault A, and Gros P (1990) Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol* **10**:1652-1663.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, and Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:15665-15670.

Estevez MD, Wolf A, and Schramm U (2000) Effect of PSC 833, verapamil and amiodarone on adriamycin toxicity in cultured rat cardiomyocytes. *Toxicol In Vitro* **14**:17-23.

Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J, and Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer* **83**:375-383.

Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, and Telenti A; Swiss HIV Cohort Study (2002) Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* **359**:30-36.

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, and Scheper RJ (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* **148**:1237-1247.

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, and Pastan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:265-269.

Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, and Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol* **157**:1575-1580.

Furuya KN, Gebhardt R, Schuetz EG, and Schuetz JD (1994) Isolation of rat pgp3 cDNA: evidence for gender and zonal regulation of expression in the liver. *Biochim Biophys Acta* **1219**:636-644.

Ghosh S, Ting S, Lau H, Pulinilkunnil T, An D, Qi D, Abrahani MA, and Rodrigues B (2004) Increased efflux of glutathione conjugate in acutely diabetic cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* **82**:879-887.

Gianni L, Munzone E, Capri G, Fulfaro F, Tarenzi E, Villani F, Spreafico C, Laffranchi A, Caraceni A, Martini C, Stefanelli M, Valagussa P, and Bonadonna G

(1995) Paclitaxel by 3-hour infusion in combination with bolus doxorubicin in women with untreated metastatic breast cancer: high antitumor efficacy and cardiac effects in a dose-finding and sequence-finding study. *J Clin Oncol* **13**:2688-2699.

Goldschmidt N, Azaz-Livshits T, Gotsman, Nir-Paz R, Ben-Yehuda A, and Muszkat M (2001) Compound cardiac toxicity of oral erythromycin and verapamil. *Ann Pharmacother* **35**:1396-1399.

Gonzalez O, Colombo T, De Fusco M, Imperatori L, Zucchetti M, and D'Incalci M (1995) Changes in doxorubicin distribution and toxicity in mice pretreated with the cyclosporin analogue SDZ PSC 833. *Cancer Chemother Pharmacol* **36**:335-340.

Gramatte T, and Oertel R (1999) Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R-verapamil. *Clin Pharmacol Ther* **66**:239-245.

Granzotto M, Drigo I, Candussio L, Rosati A, Bartoli F, Giraldi T, and Decorti G (2004) Rifampicin and verapamil induce the expression of P-glycoprotein in vivo in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Lett* **205**:107-115.

Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, and Kroemer HK (1999) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* **104**:147-153.

Gros P, Croop J, and Housman D (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* **47**:371-380.

Gros P, Raymond M, Bell J, and Housman D (1988) Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol* **8**:2770-2778.

Hagen SG, Monroe DG, Dean DM, and Sanders MM (2000) Repression of chick multidrug resistance-associated protein 1 (chMRP1) gene expression by estrogen. *Gene* **257**:243-249.

Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, and Cole SP (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* **5**:21-53.

Hendricks CB, Rowinsky EK, Grochow LB, Donehower RC, and Kaufmann SH (1992) Effect of P-glycoprotein expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK&F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res* **52**:2268-2278.

Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, and Hermodson MA (1986) A family of related ATP-

binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**:448-450.

Hill BT, Deuchars K, Hosking LK, Ling V, Whelan RD (1990) Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X irradiation in vitro. *J Natl Cancer Inst* **82**:607-612.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, and Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3473-3478.

Holzinger A, Kammerer S, Berger J, and Roscher AA (1997) cDNA cloning and mRNA expression of the human adrenoleukodystrophy related protein (ALDRP), a peroxisomal ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **239**:261-264.

Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ, Borst P, Pinedo HM, and Jansen G (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* **59**:2532-2535.

Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, Belinsky MG, and Kruh GD (2004) Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): Resistance to docetaxel. *Cancer Res* **64**:4927-4930.

Hrycyna CA, Ramachandra M, Germann UA, Cheng PW, Pastan I, and Gottesman MM (1999) Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry* **38**:13887-13899.

Hsu SI, Lothstein L, and Horwitz SB (1989) Differential overexpression of three mdr gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique mdr genes. *J Biol Chem* **264**:12053-12062.

Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM, Zelcer N, Wiltshire HR, Beijnen JH, and Schinkel AH (2002) Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS* **16**:2295-2301.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, and Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**:362-365.

Jetté L, Beaulieu E, Leclerc JM, and Beliveau R (1996) Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues. *Am J Physiol* **270**:F756-65.

Jetté L, Pouliot JF, Murphy GF, and Beliveau R (1995) Isoform I (mdr3) is the major form of P-glycoprotein expressed in mouse brain capillaries. Evidence for cross-reactivity of antibody C219 with an unrelated protein. *Biochem J* **305**:761-766.

Jones K, Hoggard PG, Sales SD, Khoo S, Davey R, and Back DJ. (2001) Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport. *AIDS* **15**:675-681.

Juliano RL, and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**:152-162.

Kaeser YA, Brunner F, Drewe J, and Haefeli WE (1998) Severe hypotension and bradycardia associated with verapamil and clarithromycin. *Am J Health Syst Pharm* **55**:2417-2418.

Kaminski WE, Wenzel JJ, Piehler A, Langmann T, and Schmitz G (2001) ABCA6, a novel a subclass ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **285**:1295-1301.

Kang W, and Weiss M (2001) Influence of P-glycoprotein modulators on cardiac uptake, metabolism, and effects of idarubicin. *Pharm Res* **18**:1535-1541.

Kao HH, Huang JD, and Chang MS (2002) cDNA cloning and genomic organization of the murine MRP7, a new ATP-binding cassette transporter *Gene* **286**:299-306.

Karlsson J, Kuo SM, Ziemniak J, and Artursson P (1993) Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: Mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* **110**:1009-1016.

Kartner N, Shales M, Riordan JR, and Ling V (1983) Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res* **43**:4413-4419.

Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, and Kuwano M (1999) Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett* **456**:327-331.

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, Roden DM, and Wilkinson GR (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* **101**:289-294.



Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ, and Wilkinson GR (1999) Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* **16**:408-414.

Kim RB (2002) Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev* **34**:47-54.

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F and Borst P (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* **57**: 3537-3547.

Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, Jansen G, Peters GJ, Ponne N, Scheper RJ, Elferink RP, Baas F, and Borst P (1999) MRP3 an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:6914-6919.

Kubo Y, Sekiya S, Ohigashi M, Takenaka C, Tamura K, Nada S, Nishi T, Yamamoto A, and Yamaguchi A (2005) ABCA5 resides in lysosomes, and ABCA5 knockout mice develop lysosomal disease-like symptoms. *Mol Cell Biol* **25**: 4138-4149.

Lecureur V, Sun D, Hargrove P, Schuetz EG, Kim RB, Lan LB, and Schuetz JD (2000) Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **57**:24-35.

Lee K, Belinsky MG, Bell DW, Testa JR, and Kruh GD (1998) Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canalicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res* **58**:2741-2747.

Lee K, Klein-Szanto AJ, and Kruh GD (2000) Analysis of the MRP4 drug resistance profile in transfected NIH3T3 cells. *J Natl Cancer Inst* **92**:1934-1940.

Liu B, Sun D, Xia W, Hung MC, and Yu D (1997) Cross-reactivity of C219 anti-p170(mdr-1) antibody with p185(c-erbB2) in breast cancer cells: Cautions on evaluating p170(mdr-1). *J Natl Cancer Inst* **89**:1524-1529.

Locher KP, and Borths E (2004) ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS Lett* **564**:264-268.

Locher KP, Lee AT, and Rees DC (2002) The E. coli BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**:1091-1098.

Lowes S, and Simmons NL (2002) Multiple pathways for fluoroquinolone secretion by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol* **135**:1263-1275.

Magnarin M, Morelli M, Rosati A, Bartoli F, Candussio L, Giraldi T, and Decorti G (2004) Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol* **483**:19-28.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, and Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **61**:3458-3464.

Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Floot BG, and Schellens JH (1999) Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* **59**:4559-4563.

Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD, and Garry DJ (2004) Persistent expression of the ATP-binding

cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* **265**:262-275.

Meissner K, Heydrich B, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Mosyagin I, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, and Kroemer HK (2006) The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J Histochem Cytochem* **54**:215-221.

Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, and Kroemer HK (2004) Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* **14**:381-385.

Meissner K, Sperker B, Karsten C, Zu Schwabedissen HM, Seeland U, Bohm M, Bien S, Dazert P, Kunert-Keil C, Vogelgesang S, Warzok R, Siegmund W, Cascorbi I, Wendt M, and Kroemer HK (2002) Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem* **50**:1351-1356.

Miller DS (2001) Nucleoside phosphonate interactions with multiple organic anion transporters in renal proximal tubule. *J Pharmacol Exp Ther* **299**:567-574.

Müller M (2003) 49 human ATP-binding cassette transporters. <http://www.nutrigene.4t.com/humanabc.htm>.

Muramatsu T, Johnson DR, Finch RA, Johnson LK, Leffert JJ, Lin ZP, Pizzorno G, and Sartorelli AC (2004) Age-related differences in vincristine toxicity and biodistribution in wild-type and transporter-deficient mice. *Oncol Res* **14**:331-343.

Naruhashi K, Tamai I, Inoue N, Muraoka H, Sai Y, Suzuki N, and Tsuji A (2001) Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. *J Pharm Pharmacol* **53**:699-709.

Ng WF, Sarangi F, Zastawny RL, Veinot-Drebot L, and Ling V (1989) Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol Cell Biol* **9**:1224-1232.

Nishimura M, Naito S, and Yokoi T (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* **19**:135-149.

Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, and Horwitz SB (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* **22**:7280-7295.

Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, Lovelace E, Rutherford AV, and Willingham MC (1988) A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:4486-4490.

Pauli-Magnus C, Feiner J, Brett C, Lin E, and Kroetz DL (2003) No effect of MDR1 C3435T variant on loperamide disposition and central nervous system effects. *Clin Pharmacol Ther* **74**:487-498.

Pavelic ZP, Reising J, Pavelic L, Kelley DJ, Stambrook PJ, and Gluckman JL (1993) Detection of P-glycoprotein with four monoclonal antibodies in normal and tumor tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **119**:753-757.

Peters WH, and Roelofs HM (1992) Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Res* **52**:1886-1890.

Piebler A, Kaminski WE, Wenzel JJ, Langmann T, and Schmitz G (2002) Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem Biophys Res Commun* **295**:408-416.

Reyes CL and Chang G (2005) Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP-vanadate and lipopolysaccharide. *Science* **308**:1028-1031.

Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, and Pastan I (1986) Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:4538-4542.

Rosati A, Maniori S, Decorti G, Candussio L, Giraldi T, and Bartoli F (2003) Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny. *Dev Growth Differ* **45**:377-387.

Santostasi G, Kutty RK, and Krishna G (1991) Increased toxicity of anthracycline antibiotics induced by calcium entry blockers in cultured cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **108**:140-149.

Sasabe H, Kato Y, Suzuki T, Itose M, Miyamoto G, and Sugiyama Y (2004) Differential involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and p-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **310**:648-655.

Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, and Keppler D (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* **8**:1213-1221.

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, Berns AJ, and Borst P (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**:491-502.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, and van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* **97**:2517-2524.

Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, and Borst P (1995) Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* **96**:1698-1705.

Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* **8**:161-170.



Schneider E, and Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**:1-20.

Schuetz EG, Yasuda K, Arimori K, and Schuetz JD (1998) Human MDR1 and mouse *mdr1a* P-glycoprotein alter the cellular retention and disposition of erythromycin, but not of retinoic acid or benzo(a)pyrene. *Arch Biochem Biophys* **350**:340-347.

Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A, and Fridland A (1999) MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med* **5**:1048-1051.

Schwab M, Eichelbaum M, and Fromm MF (2003) Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**:285-307.

Sharp SY, Smith V, Hobbs S, and Kelland LR (1998) Lack of a role for MRP1 in platinum drug resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer* **78**:175-80.

Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK, and Cascorbi I (2002) The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* **72**:572-583.

Siegmund M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, and Brauch H (2002) Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* **13**:1847-1854.

Sims JJ, Neudeck BL, Loeb JM, and Wiegert NA (2004) Tachycardia-induced heart failure does not alter myocardial P-glycoprotein expression. *Pharmacotherapy* **24**:1-7.

Smit JJ, Schinkel AH, Mol CA, Majoor D, Mooi WJ, Jongsma AP, Lincke CR, and Borst P (1994) Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest* **71**:638-649.

Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJ, Berns AJ, and Borst P (1993) Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**:451-462.

Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G, Szabo K, Welker E, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B, and Borst P (2000) MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* **275**:23530-23539.

Solbach TF, Konig J, Fromm MF, and Zolk O (2006) ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med* **16**:7-15.

Soldner A, Benet LZ, Mutschler E, and Christians U (2000) Active transport of the angiotensin-II antagonist losartan and its main metabolite EXP 3174 across MDCK-MDR1 and caco-2 cell monolayers. *Br J Pharmacol* **129**:1235-1243.

Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, and van Tellingen O (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:2031-2035.

Sridhar R, Dwivedi C, Anderson J, Baker PB, Sharma HM, Desai P, and Engineer FN (1992) Effects of verapamil on the acute toxicity of doxorubicin in vivo. *J Natl Cancer Inst* **84**:1653-1660.

Steenbergen JA, and Stauffer VL (1998) Potential macrolide interaction with verapamil. *Ann Pharmacother* **32**:387-388.

Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, and Meier PJ (2000) Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* **118**:422-430.

St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, Meier PJ, and Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physio.* **279**:R1495-1503.

Stride BD, Valdimarsson G, Gerlach JH, Wilson GM, Cole SP, and Deeley RG (1996) Structure and expression of the messenger RNA encoding the murine multidrug resistance protein, an ATP-binding cassette transporter. *Mol Pharmacol* **49**:962-971.

Sugawara I, Akiyama S, Scheper RJ, and Itoyama S (1997) Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett* **112**:23-31.

Takada Y, Yamada K, Taguchi Y, Kino K, Matsuo M, Tucker SJ, Komano T, Amachi T, and Ueda K (1998) Non-equivalent cooperation between the two nucleotide-binding folds of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1373**:131-136.

Takano M, Hasegawa R, Fukuda T, Yumoto R, Nagai J, and Murakami T (1998) Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam and ketoconazole in Caco-2 cells. *Eur J Pharmacol* **358**:289-294.

Tamai I, Yamashita J, Kido Y, Ohnari A, Sai Y, Shima Y, Naruhashi K, Koizumi S, and Tsuji A (2000) Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain caused by multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **295**:146-152.

Teeter LD, Becker FF, Chisari FV, Li DJ, and Kuo MT (1990) Overexpression of the multidrug resistance gene *mdr3* in spontaneous and chemically induced mouse hepatocellular carcinomas. *Mol Cell Biol* **10**:5728-5735.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, and Willingham MC (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* **37**:159-164.

Tirona RG, and Kim RB (2002) Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deliv Rev* **54**:1343-1352.

Török M, Gutmann H, Fricker G, and Drewe J (1999) Sister of P-glycoprotein expression in different tissues. *Biochem Pharmacol* **57**:833-835.

Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, Wakaumi M, Suzuki M, Schwartz GJ, Imai M, and Fujimura A (2002) Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **298**:41-45.

Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, and Pastan I. (1987) Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:3004-3008.

Urbatsch IL, Beaudet L, Carrier I, and Gros P (1998) Mutations in either nucleotide-binding site of P-glycoprotein (Mdr3) prevent vanadate trapping of nucleotide at both sites. *Biochemistry* **37**:4592-4602.

van Asperen J, van Tellingen O, Schinkel AH, and Beijnen JH (1999) Comparative pharmacokinetics of vinblastine after a 96-hour continuous infusion in wild-type mice and mice lacking mdr1a P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* **289**:329-333.

van Asperen J, Schinkel AH, Beijnen JH, Nooijen WJ, Borst P, and van Tellingen O (1996) Altered pharmacokinetics of vinblastine in Mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Natl Cancer Inst* **88**:994-999.

Van der Blik AM, Baas F, Ten Houte de Lange T, Kooiman PM, Van der Velde-Koerts T, and Borst P (1987) The human mdr3 gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J* **6**:3325-3331.

van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Kuiper CM, Tsuruo T, Lankelma J, Meijer CJ, Pinedo HM, and Scheper RJ (1990) Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule. *Ann Oncol.* **1**:56-64.

van Kalken C, Giaccone G, van der Valk P, Kuiper CM, Hadisaputro MM, Bosma SA, Scheper RJ, Meijer CJ, and Pinedo HM (1992) Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus. *Am J Pathol* **141**:1063-1072.

Verschraagen M, Koks CH, Schellens JH, and Beijnen JH (1999) P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: The case of digoxin-verapamil. *Pharmacol Res* **40**:301-306.

Volk EL, Farley KM, Wu Y, Li F, Robey RW, and Schneider E (2002) Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res* **62**:5035-5040.

Volk EL, Schneider E (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* **63**:5538-5543.

von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, and Armstrong VW (2001) No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* **47**:1048-1052.

Wakasugi H, Yano I, Ito T, Hashida T, Futami T, Nohara R, Sasayama S, and Inui K (1998) Effect of clarithromycin on renal excretion of digoxin: interaction with P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* **64**:123-8.



Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, and Baba M (2003) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol* **63**:65-72.

Wenzel JJ, Kaminski WE, Piehler A, Heimerl S, Langmann T, and Schmitz G (2003) ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **306**:1089-1098.

Westphal K, Weinbrenner A, Zschiesche M, Franke G, Knoke M, Oertel R, Fritz P, von Richter O, Warzok R, Hachenberg T, Kauffmann HM, Schrenk D, Terhaag B, Kroemer HK, and Siegmund W (2000) Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction. *Clin Pharmacol Ther* **68**:345-355.

Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, and Borst P (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* **3**:1275-1279.

Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, de Haas M, Scheffer GL, Baas F, Beijnen JH, Scheper RJ, Hatse S, De Clercq E, Balzarini J, and Borst P (2000) Multidrug-

resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:7476-7481.

Woodahl EL, and Ho RJ (2004) The role of MDR1 genetic polymorphisms in interindividual variability in P-glycoprotein expression and function. *Curr Drug Metab* **5**:11-19.

Zelcer N, Saeki T, Reid G, Beijnen JH, and Borst P (2001) Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J Biol Chem* **276**:46400-46407.

Zeng H, Bain LJ, Belinsky MG, and Kruh GD (1999) Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res* **59**:5964-5967.

Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, and January CT (1999) Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res* **84**:989-998.

Zhang Y, and Berger SA (2003) Ketotifen reverses MDR1-mediated multidrug resistance in human breast cancer cells in vitro and alleviates cardiotoxicity induced by doxorubicin in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**:407-414.

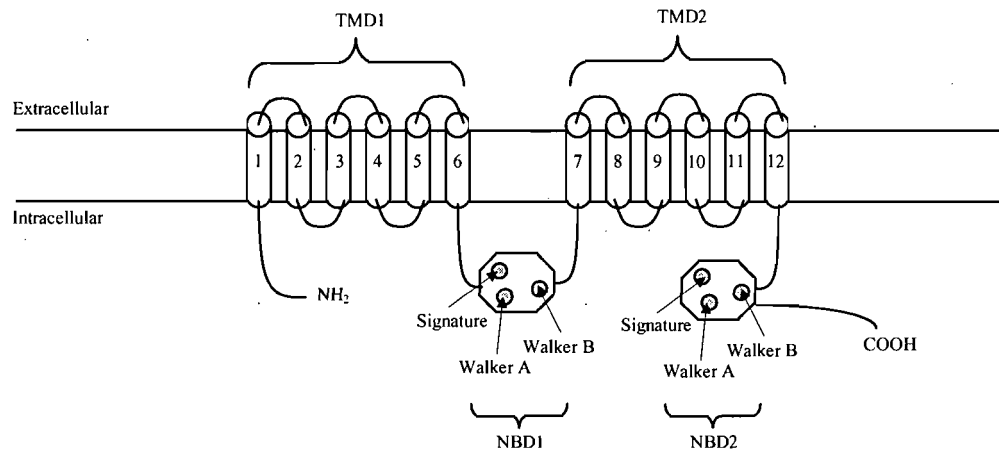
Zou A, Curran ME, Keating MT, and Sanguinetti MC (1997) Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* **272**:H1309-1314.

## 1.10 Figure legends

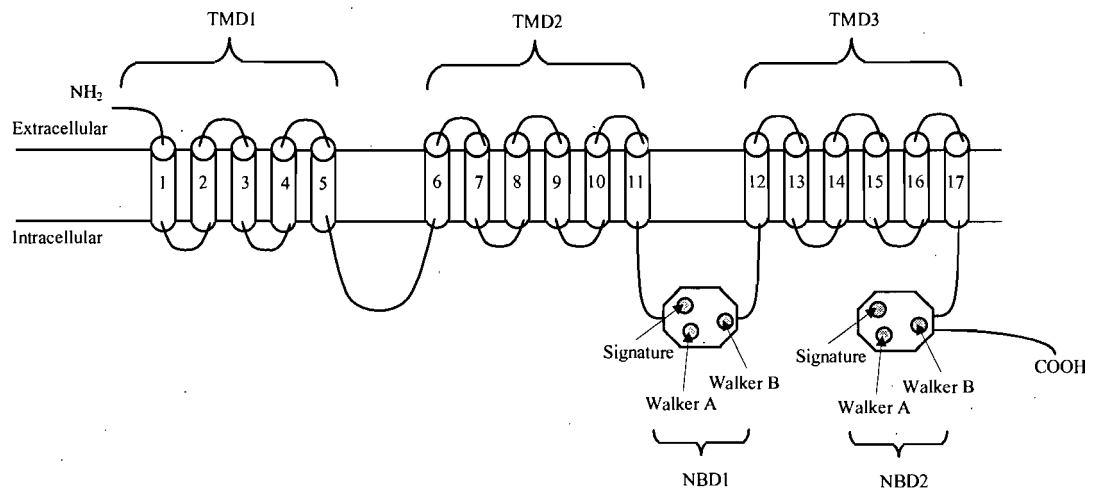
Figure 1: General representation of the ABC transporter protein arrangements. A) P-gp, BSEP, MRP4, MRP5, MRP8, MRP9 proteins contain 12 transmembrane regions, split into two halves forming transmembrane domains (TMD), each with a nucleotide-binding domain (NBD). B) MRP1, MRP2, MRP3, MRP6 and MRP7 have five extra transmembrane regions towards the N-terminus. C) BCRP is a half transporter and contains only six transmembrane regions and one NBD.

Figure 1

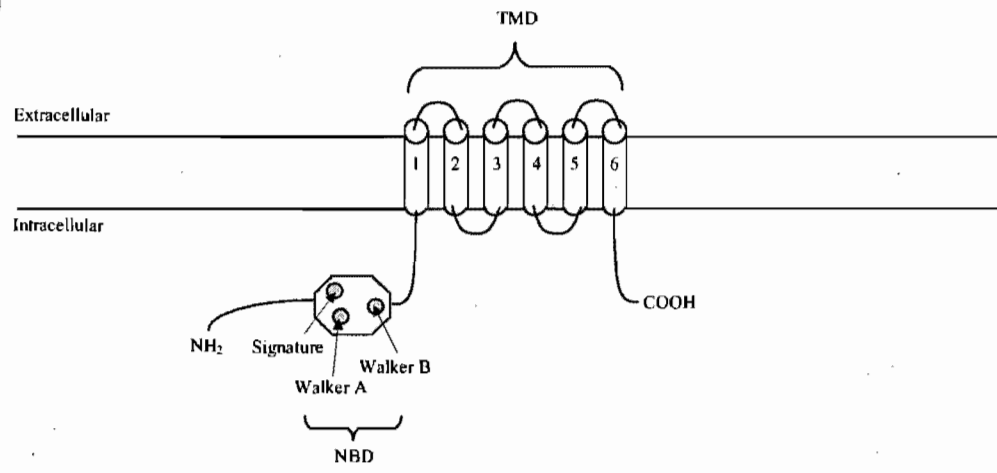
A)



B)



C)



## **ANNEXE II**

**Role of ATP-Binding Cassette transporters in drug  
distribution to the heart and protection from toxic  
compounds**

**Heart and Metabolism 35 :1-6, 2007**



Title page

Role of ATP-Binding Cassette Transporters in Drug Distribution to the Heart and Protection from Toxic Compounds

Lucie Couture<sup>1,2</sup> John A. Nash<sup>2</sup> and Jacques Turgeon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada,

<sup>2</sup>Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal, Senneville, Québec, Canada

Running title : ABC Transporters and Drug Distribution to the Heart

Name and address for correspondence

Jacques Turgeon, Ph.D.


Faculté de pharmacie, Université de Montréal

C.P. 6128, Succursale Centre-Ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Phone: 514-343-6440

Fax: 514-343-7377

e-mail: 



## 2.1 Résumé

Les transporteurs ABC consistent en une famille de protéines qui transportent des substrats contre un gradient de concentration du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. La P-glycoprotéine (P-gp), le transporteur le plus étudié de la grande famille des transporteurs ABC, a été trouvée comme étant exprimée dans des tissus tels que le foie, les reins et les intestins. Ceci suggérait donc un rôle physiologique de la P-gp dans la protection et détoxification de l'organisme. La P-gp et d'autres transporteurs ABC ont été reconnus par la suite comme étant exprimés dans le myocarde. La littérature actuelle suggère que les transporteurs ABC auraient un rôle dans le contrôle de la distribution de xénobiotiques au cœur protégeant ainsi cet organe.

Mots-clés: transporteurs ABC, distribution de médicaments au coeur, cardiotoxicité, efflux de médicaments, protection du coeur

## 2.2 Abstract

ABC transporters consist of a family of proteins that translocate substrates against a concentration gradient from the intracellular toward the extracellular milieu. The most studied transporter from the ABC transporter superfamily, P-glycoprotein (P-gp), was found to be expressed in tissues such as liver, kidneys and intestines. This suggested a physiologic function for P-gp in the protection and detoxification of the organism. P-gp and other ABC transporters were also found to be expressed in the myocardium. Current literature suggests that ABC transporters have a role in controlling distribution of xenobiotics to the heart thus protecting this organ.

Keywords: ABC transporters, cardiac drug distribution, cardiotoxicity, drug efflux, heart protection

## 2.3 Introduction

Accumulation of xenobiotics into tissues does not depend only on their ability to enter cells, but also on their ability to leave them. The ABC (ATP-binding cassette) proteins represent a large family of transmembrane transporters of around fifty ABC transporters that translocate substrates against a concentration gradient from the intracellular toward the extracellular regions following ATP hydrolysis. The most studied transporter from the ABC transporter superfamily, the P-glycoprotein (P-gp), was first found to be overexpressed in tumour cells conferring resistance to several anticancer drugs [1]. P-gp thought at first to be confined to tumour cells, was subsequently recognized to be expressed in normal tissues such as at the apical surface of liver hepatocytes, in proximal tubular cells of kidneys and in enterocytes of intestines. This suggested a physiologic function for P-gp in the detoxification of the organism by excreting its substrates into bile, urine and intestine contents [2-4]. Given the importance of these tissues in drug absorption, metabolism and excretion, it was rapidly conceived that P-gp had an important influence on drug disposition. ABC transporters were also found to be expressed in other tissues such as the heart suggesting a role in detoxification and protection of the heart from accumulation of xenobiotics [5]. The aim of this paper is to shed light on the involvement of ABC transporters in the distribution of xenobiotics to the heart and to discuss their role in the protection of this organ from toxic compounds.

## 2.4 Expression of ABC transporters in the heart

The superfamily of ABC transporters is divided into seven different subfamilies [6] presented in Table 1. Encoded proteins are classified based on the sequence and organization of their nucleotide-binding domain(s) and similarity in gene structure. So far eight of them, recognized to have a role in the transport of xenobiotics in tissues, were found to be expressed in the heart (highlighted in Table 1). These proteins are P-gp, MRP1, MRP3, MRP4, MRP5, MRP7, BCRP, ABCA8 and ALDR. These transporters were found to be expressed either in myocytes or vascular endothelial cells of the heart in human and rodents using molecular biology techniques in human and rodents [5]. Due to the expression of P-gp in endothelial cells of human cardiac vasculature, it was proposed that P-gp serves as a functional barrier between blood and cardiac myocytes in a similar manner to the blood-brain barrier [7,8].

Table 1

Classification of human ATP-binding cassette (ABC) transporters into subfamilies<sup>a</sup>

ABC1 (Subfamily A)	MDR/TAP (Subfamily B)	MRP/CFTR (Subfamily C)	ALD (Subfamily D)	OABP (Subfamily E)	GCN20 (Subfamily F)	White (Subfamily G)
ABCA1	ABCB1 (MDR1 or P-GP)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2	ABCB2 (TAP1)	ABCC2 (MRP2 or cMOAT)	ABCD2 (ALDR)		ABCF2	ABCG2 (BCRP)
ABCA3	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCD3		ABCF3	ABCG4
ABCA4	ABCB4 (MDR3)	ABCC4 (MRP4)	ABCD4			ABCG5
ABCA5	ABCB5	ABCC5 (MRP5)				ABCG8
ABCA6	ABCB6	ABCC6 (MRP6)				
ABCA7	ABCB7	ABCC7 (CFTR)				
ABCA8	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
ABCA10	ABCB10	ABCC10 (MRP7)				
ABCA12	ABCB11 (BSEP or SPGP)	ABCC11 (MRP8)				
ABCA13		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				

<sup>a</sup> Highlighted cells represent ABC transporters expressed in the heart and having recognised activities in the transport of drugs.

Table adapted from [5].

## **2.5 ABC transporters and evidence of their role in the protection of the heart**

### **2.5.1 ABC transporter drug substrates and cardiotoxicities associated with deficiency in ABC transporter genes**

Mice genetically deficient in genes coding for ABC transporters such as P-gp or *mrp1* have been useful to demonstrate the role of transporters to prevent accumulation of xenobiotics into the heart. Indeed, in mice genetically deficient in genes coding for P-gp, significant higher levels of drugs such as vinblastine, loperamide and enaminone anticonvulsants were observed in the heart compared to wild-type mice [9-11]. Greater levels of drugs such as etoposide, grepafloxacin and vincristine were also observed in the heart of mice genetically deficient for the gene coding for *mrp1* [12-14] in comparison to wild-type mice. These findings suggest that these ABC transporters contribute to the protection of the heart from xenobiotics. Moreover, a team of investigators generated transgenic mice that overexpressed *MDR1*, the human gene coding for P-gp, specifically in the cardiac muscle. The administration of single or repeated intravenous doses of doxorubicin led to degenerative changes in the heart of control mice that were absent in transgenic animals [15]. This experiment confirms again the role of P-gp for detoxification processes in the heart.

In humans treated with anthracyclines for non-Hodgkin lymphoma, the propensity to anthracycline-induced cardiotoxicity was increased in patients carrying single nucleotide polymorphisms in MRP1 and MRP2. The acute anthracycline-induced cardiotoxicity was associated with the Gly671Val variant of MRP1 and with the Val1188Glu-Cys1515Tyr haplotype of MRP2. The association of polymorphisms in the gene coding for MRP1 and MRP2 and observed anthracycline-induced cardiotoxicity is another proof of the importance of ABC transporters in the protection of the heart [16].

### **2.5.2 Cardiotoxicities and interactions of ABC transporter drug substrates**

Many cases of cardiotoxicities have been linked to an increase in drug concentrations in the heart following co-administration of antineoplastic drugs and multidrug resistance-reversing agents (drugs identified as P-gp inhibitors and having the capabilities to restore drug sensitivity of antineoplastic-resistant tumor cells). For instance, it was found that the co-administration of doxorubicin and the multidrug resistance-reversing drug verapamil increased the peak concentration of doxorubicin in the heart of mice by 40%. The co-administration augmented the incidence and severity of degenerative changes in cardiac tissue, and decreased the survival rate compared to doxorubicin alone [17]. Other studies in rodents demonstrated that cyclosporine A or its analogue PSC 833, two other multidrug resistance-reversing

agents, could also increase doxorubicin concentrations [18,19]. This latter finding correlated with a higher incidence and severity of myocardial damage [19]. The mechanism involved is likely related to an accumulation of drugs in the heart due to the inhibition of the normal protective function of P-gp, or other ABC transporters, by multidrug resistance-reversing agents. These findings suggested that caution is advisable when prescribing a combination of ABC transporter substrates to patients. Some commonly used drugs for the treatment of cardiac diseases, cancer, infections, HIV, and immunosuppressive drugs which are substrates of ABC transporters and that may be associated with drug-drug interaction-related cardiotoxicities are presented in Table 2.



Table 2

Examples of commonly used drugs that are substrates of ABC transporters and that may be related to drug-drug interaction-related cardiotoxicity

A

	CARDIAC DRUGS			ANTIBIOTIC DRUGS		
	Sodium channel blockers	Calcium channel blockers	Cardiac glycosides	Fluoroquinolones	Macrolides	
	Quinidine	Verapamil	Digoxin	Grepafloxacin	Erythromycin	Clarithromycin
ABCB1 (MDR1 or P-gp)	[23,24]	[25,26]	[27,28]	[29,30]	[24,31]	[32]
ABCC1 (MRP1)				[29]		
ABCA8			[33]			

Clear cells represent evidence that the drug is a substrate (or inhibitor) of the ABC transporter.

Shaded cells represent evidence that the drug is not a substrate (or inhibitor) of the ABC transporter.

B

	ANTICANCER DRUGS					
	Anthracyclines		<i>Vinca</i> alkaloids		Epipodophyllotoxins	Other
	Daunorubicin	Doxorubicin	Vinblastine	Vincristine	Etoposide (VP-16)	Paclitaxel
ABCB1 (MDR1 or P-gp)	[34]	[1,35]	[1,35]		[35]	[36]
ABCC1 (MRP1)	[37]	[37,38]	[37]	[37,38]	[37,38]	[37]
			[38]			[38]
ABCC3 (MRP3)	[39]	[39]		[39]	[39,40]	[39]
		[40]		[40]		
ABCC5 (MRP5)	[41]			[41]	[41]	
ABCC10 (MRP7)		[42]	[42]	[42]		[42]
ABCG2 (BCRP)	[43]	[43]		[43,44]	[44]	[43,44]
ABCA8		[33]				

Clear cells represent evidence that the drug is a substrate (or inhibitor) of the ABC transporter.

Shaded cells represent evidence that the drug is not a substrate (or inhibitor) of the ABC transporter.

C

	HIV DRUGS				IMMUNOSUPPRESSIVE DRUGS	
	Protease inhibitor				Cyclosporin A	Tacrolimus (FK506)
	Indinavir	Nelfinavir	Ritonavir	Saquinavir		
ABCB1 (MDR1 or P-gp)	[45]	[45,46]	[46]	[45,46]	[10,47]	[47]
ABCC1 (MRP1)	[48]		[46]	[46]		
			[48]	[48]		
ABCC3 (MRP3)	[48]		[48]	[48]		
ABCC4 (MRP4)						
ABCC5 (MRP5)	[48]		[48]	[48]		
ABCG2 (BCRP)	[44,48]	[44]	[48]	[48]		

Clear cells represent evidence that the drug is a substrate (or inhibitor) of the ABC transporter.

Shaded cells represent evidence that the drug is not a substrate (or inhibitor) of the ABC transporter.

## 2.6 ABC transporters and cellular mechanisms of cardiotoxicity such as drug-induced Long QT syndrome

ABC transporter activities control intracellular access of drugs to their binding sites and modulate drug efficacy or toxicity. Drug-induced prolongation of cardiac repolarization (drug-induced Long QT syndrome) is currently a major concern for patient's safety and drug industry. The block of a specific cardiac potassium current, the rapid component of the delayed rectifier channel ( $I_{Kr}$ ) encoded by the *human ether-a-go-go related gene (hERG)*, is the underlying mechanism of prolonged repolarization observed in patients undergoing treatment with most QT-prolonging drugs. Excessive prolongation of cardiac repolarization (interval QT) increases the risk of early afterdepolarisation that could trigger, in the context of increased dispersed repolarization, a polymorphic ventricular tachycardia termed *torsades de pointes*. The  $I_{Kr}$  binding site for currently used drugs is believed to be on the intracellular site of the channel embedded in the plasma membrane [20,21]. Consequently, factors such as ABC transporters that regulate intracellular concentrations of  $I_{Kr}$  binding drugs could modulate the risk of the drug-induced Long QT syndrome. Recently, the risk of QT prolongation following concomitant administration of two P-gp substrates, domperidone and ketoconazole, has been recognised [22]. Indeed, a cardiac prolongation was observed when domperidone

and ketoconazole were administered concomitantly, but not when domperidone was administered alone.

## **2.7 Conclusion**

It is now widely accepted that transporters, along with CYP450 enzymes, contribute significantly to bioavailability and drug disposition of xenobiotics. Cases of increased concentrations of drugs in the heart, cardiotoxicities occurring following the administration of concomitant ABC transporter substrates and the use of knockout mice demonstrate the important role of these proteins in the efflux of drugs from the heart. We are still at an early stage in the discovery of ABC transporters in the myocardium and their involvement in the cardiac disposition of drugs. Nevertheless, there is increasing evidence that already indicate a major role of these transporters in the protection of the heart from toxic compounds.

## 2.8 References

1. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, et al. Expression of a full length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:3004-3008.
2. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:7735-7738.
3. Gatmaitan ZC, Arias IM. Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol*. 1993;24:77-97.
4. Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, et al. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem*. 1993;268:14991-14997.
5. Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-binding cassette (ABC) transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart. *Pharmacol Rev*. 2006;58:244-258.

6. Dean M, Hamon Y, and Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 2001;42:1007-1017.
7. Meissner K, Sperker B, Karsten C, et al. Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:1351-1356.
8. Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, et al. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics.* 2004;14:381-385.
9. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell.* 1994;77:491-502.
10. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, et al. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 1996;97:2517-2524.
11. Cox DS, Scott KR, Gao H, et al. Effect of P-glycoprotein on the pharmacokinetics and tissue distribution of enaminone anticonvulsants: Analysis

by population and physiological approaches. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:1096-1104.

12. Wijnholds J, Mol CA, van Deemter L, et al. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:7476-7481.
13. Sasabe H, Kato Y, Suzuki T, et al. Differential involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and p-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:648-655.
14. Muramatsu T, Johnson DR, Finch RA, et al. Age-related differences in vincristine toxicity and biodistribution in wild-type and transporter-deficient mice. *Oncol Res.* 2004;14:331-343.
15. Dell'Acqua G, Polishchuck R, Fallon JT, et al. Cardiac resistance to adriamycin in transgenic mice expressing a rat alpha-cardiac myosin heavy chain/human multiple drug resistance 1 fusion gene. *Hum Gene Ther.* 1999;10:1269-1279.
16. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, et al. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphism are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Circulation.* 2005;112:3754-3762.



17. Sridhar R, Dwivedi C, Anderson J, et al. Effects of verapamil on the acute toxicity of doxorubicin in vivo. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84:1653-1660.
18. Colombo T, Zucchetti M, D'Incalci M. Cyclosporin A markedly changes the distribution of doxorubicin in mice and rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;269:22-27.
19. Bellamy WT, Peng YM, Odeleye A, et al. Cardiotoxicity in the SCID mouse following administration of doxorubicin and cyclosporin A. *Anticancer Drugs.* 1995;6:736-743.
20. Zou A, Curran ME, Keating MT, et al. Single HERG delayed rectifier K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol.* 1997;272:H1309-1314.
21. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, et al. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res.* 1999;84:989-998.
22. Medicines Control Council. Interaction between ketoconazole and domperidone and the risk of QT prolongation – important safety information. *S Afr Med J.* 2006;96:596.

23. Kusunohara H, Suzuki H, Terasaki T, et al. P-Glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283:574-580.
24. Kim RB, Wandel C, Leake B, et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res.* 1999;16:408-414.
25. Verschraagen M, Koks CH, Schellens JH, et al. P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: The case of digoxin-verapamil. *Pharmacol Res.* 1999;40:301-306.
26. Kim RB Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev.* 2002;34:47-54.
27. de Lannoy IA, Silverman M. The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:551-557.
28. Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, et al. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263:840-845.

29. Tamai I, Yamashita J, Kido Y, et al. Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain caused by multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295:146-152.
30. Naruhashi K, Tamai I, Inoue N, et al. Active intestinal secretion of new quinolone antimicrobials and the partial contribution of P-glycoprotein. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53:699-709.
31. Schuetz EG, Yasuda K, Arimori K, et al. Human MDR1 and mouse *mdr1a* P-glycoprotein alter the cellular retention and disposition of erythromycin, but not of retinoic acid or benzo(a)pyrene. *Arch Biochem Biophys.* 1998;350:340-347.
32. Wakasugi H, Yano I, Ito T, et al. Effect of clarithromycin on renal excretion of digoxin: interaction with P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther.* 1998;64:123-128.
33. Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, et al. Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298:41-45.
34. Kartner N, Shales M, Riordan JR, et al. Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res.* 1983;43:4413-4419.

35. Pastan I, Gottesman MM, Ueda K, et al. A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:4486-4490.
36. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2031-2035.
37. Cole SP, Sparks KE, Fraser K, et al. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res*. 1994;54:5902-5910.
38. Sharp SY, Smith V, Hobbs S, et al. Lack of a role for MRP1 in platinum drug resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer*. 1998;78:175-180.
39. Zeng H, Bain LJ, Belinsky MG, et al. Expression of multidrug resistance protein-3 (multispecific organic anion transporter-D) in human embryonic kidney 293 cells confers resistance to anticancer agents. *Cancer Res*. 1999;59:5964-5967.
40. Zelcer N, Saeki T, Reid G, et al. Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J Biol Chem*. 2001;276:46400-46407.

41. McAleer MA, Breen MA, White NL, et al. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 1999;274:23541-23548.
42. Hopper-Borge E, Chen ZS, Shchaveleva I, et al. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): Resistance to docetaxel. *Cancer Res.* 2004;64:4927-4930.
43. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:15665-15670.
44. Wang X, Furukawa T, Nitanda T, et al. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol.* 2003;63:65-72.
45. Kim RB, Fromm MF, Wandel C, et al. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest.* 1998;101:289-294.

46. Jones K, Hoggard PG, Sales SD, et al. Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport. *AIDS*. 2001;15:675-681.
47. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, et al. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*. 1993;268:6077-6080.
48. Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM, et al. Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS*. 2002;16:2295-2301.

## **ANNEXE III**

### **Autre contribution**

A Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Assess the Role of ABC Transporters in Drug Distribution"

Frédérique Fenneteau<sup>1</sup>, Jacques Turgeon<sup>1</sup>, Lucie Couture<sup>1,2</sup>, Jun Li<sup>1,3</sup>, Véronique Michaud<sup>1</sup> et Fahima Nekka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal, Senneville, Québec, Canada

<sup>3</sup>Centre de recherches mathématiques de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Article soumis à Pharmaceutical Research



## **ANNEXE IV**

### **Accords des coauteurs et contributions aux travaux**

**Contribution aux travaux**

Article : Involvement of P-glycoprotein in the distribution of domperidone to the heart and other tissues in mice.

Revue: Drug Metabolism and Disposition

Auteurs : Couture L, Nash JA, Nguyen L, et Turgeon J.

L. Couture a réalisé toutes les étapes des travaux de recherche présentés dans cet article. Entre autres, elle a rédigé le protocole, effectué les travaux de laboratoire, analysé les données, déterminé les paramètres de pharmacocinétiques, rédigé l'article. Dr Nash a contribué plus particulièrement à la phase *in-vivo* et à la révision de l'article. Dr Nguyen a contribué plus particulièrement aux analyses de HPLC avec détection radiométrique et à la révision de l'article. Dr Turgeon, directeur de recherche, a assuré une supervision tout au long de l'étude et a participé à la révision de l'article.

**Contribution aux travaux**

Article : Effects of verapamil pre-treatments on the distribution of domperidone to the heart and other tissues in guinea pigs.

Revue: Soumis à Journal of Pharmaceutical Sciences.

Auteurs : Couture L, Nash JA, Nguyen L, et Turgeon J.

L. Couture a réalisé toutes les étapes des travaux de recherche présentés dans cet article. Entre autres, elle a rédigé le protocole, effectué les travaux de laboratoire, analysé les données, déterminé les paramètres de pharmacocinétiques, rédigé l'article. Dr Nash a contribué plus particulièrement à la phase *in-vivo* et à la révision de l'article. Dr Nguyen a contribué plus particulièrement aux analyses de HPLC avec détection radiométrique et à la révision de l'article. Dr Turgeon, directeur de recherche, a assuré une supervision tout au long de l'étude et a participé à la révision de l'article.

**Contribution aux travaux**

Article : The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: A special look at the heart.

Revue: Pharmacological Reviews 58 :244-258, 2006.

Auteurs : Couture L, Nash JA, et Turgeon J.

L. Couture a effectué la revue de la littérature et rédigé l'article. Dr Nash a participé à la révision de l'article. Dr Turgeon, directeur de recherche, a assuré une supervision tout au long de l'écriture de l'article et participé à la révision de l'article.

**Contribution aux travaux**

Article : Role of ABC (ATP-binding cassette) transporters in drug distribution to the heart and protection from toxic compounds.

Revue: Heart and Metabolism no. 35, 2007

Auteurs : Couture L, Nash JA, et Turgeon J.

L. Couture a effectué la revue de la littérature et rédigé l'article. Dr Nash a participé à la révision de l'article. Dr Turgeon, directeur de recherche, a assuré une supervision tout au long de l'écriture de l'article et participé à la révision de l'article.