



**HAL**  
open science

# Amélioration de la prédiction de la clairance métabolique via l'utilisation de modèles hépatiques innovants

Franck da Silva

► **To cite this version:**

Franck da Silva. Amélioration de la prédiction de la clairance métabolique via l'utilisation de modèles hépatiques innovants. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT083 . tel-03013630

**HAL Id: tel-03013630**

**<https://theses.hal.science/tel-03013630>**

Submitted on 19 Nov 2020

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Cellulaire / Pharmacocinétique

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Institut de médecine régénératrice et de biothérapie de Montpellier, (IRMB- INSERM U1183)

Thèse CIFRE en collaboration avec SANOFI Montpellier

## Amélioration de la prédiction de la clairance métabolique via l'utilisation de modèles hépatiques innovants

Présentée par Franck DA SILVA

Le 16 Novembre 2018

Sous la direction de Martine DAUJAT-CHAVANIEU et Sabine GERBAL-CHALOIN pour l'INSERM  
et de Sylvie KLIEBER, Hélène VERMET et Xavier BOULENC pour SANOFI

Devant le jury composé de

Lysiane RICHERT, PU-PH, Université de Franche-Comté  
Florence GATTACCECA, MCF, Aix-Marseille Université  
Chantal FOURNIER, DR, EFS Pyrénées-Méditerranée  
Cécile LEGALLAIS, DR, Université de Technologie de Compiègne  
Magalie PARDON, IE, Sanofi Paris  
Sylvie KLIEBER, IR, Sanofi Montpellier  
Martine DAUJAT-CHAVANIEU, CR1, Inserm Montpellier

Rapporteur et présidente du Jury  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Examineur



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



## Résumé en Français

La sélection des meilleurs candidats médicament se base sur des choix multiparamétriques réunissant l'efficacité potentielle, les caractéristiques ADME et le profil de sécurité des nouvelles entités chimiques. En ce sens, la prédiction précoce de la pharmacocinétique est élémentaire pour orienter les prises de décision et donner un cap pertinent aux projets. En raison de son rôle central dans le devenir des médicaments, la clairance métabolique médiée principalement par le foie est l'un des paramètres les plus importants. L'objectif de ce projet était d'améliorer la prédiction de la clairance en se concentrant notamment sur les molécules présentant une bonne stabilité métabolique et qui sont de ce fait encore difficiles à étudier. Les travaux menés dans cette thèse nous ont permis d'étoffer nos connaissances sur les modèles hépatiques *in vitro* et les méthodes d'extrapolation usuelles mais aussi de découvrir et de développer de nouvelles stratégies de prédiction. Nous nous sommes concentrés en profondeur sur la clairance métabolique et à tout ce qui impacte les prédictions. Le modèle de co-culture microorganisée (MPCC) Hepatopac™ qui permet de stabiliser les hépatocytes humains sur plusieurs semaines a ainsi été identifié comme une alternative judicieuse aux modèles de routine lorsque les molécules ne peuvent pas être étudiées en culture 2D classique. L'étude de la fraction libre plasmatique et l'intégration de nouvelles hypothèses physiologiques telles que la théorie de « l'uptake facilité par l'albumine » ont également participé à améliorer les prédictions. Compte tenu des performances du modèle Hepatopac™, nous avons développé une approche innovante basée sur le spotting de précision afin de produire tous types de co-cultures microorganisées. Les co-cultures fabriquées grâce à cette technique démontrent que la méthode est robuste, accessible et simple à mettre en œuvre. Notre méthode de spotting a ensuite été utilisée pour faire évoluer le modèle MPCC et l'ouvrir à de nouvelles applications.

## English Abstract

The selection of the best drug candidates is based on multiparametric choices combining the potential efficacy, ADME characteristics and the safety profile of the new chemical entities. In this sense, the early prediction of pharmacokinetic is essential to guide decision-making and provide a relevant course for projects. Because of its central role in drug disposition, metabolic clearance mediated primarily by the liver is one of the most important parameters. The objective of this project was to improve clearance prediction by focusing on low clearance compounds that are still difficult to study. This work allowed us to expand our knowledge on *in vitro* liver models and usual extrapolation methods but also to discover and develop new prediction strategies. We focused on metabolic clearance and all parameters that impact the predictions. Micropatterned co-cultures (MPCCs) of primary human hepatocytes (Hepatopac™), which stabilizes hepatocytes over several weeks, has been identified as a judicious alternative to routine models when the molecules cannot be studied in conventional monolayer culture. The study of plasma protein binding and the integration of new physiological hypothesis such as the "Albumin-Facilitated Uptake" also contributed to improve the predictions. Given the performance of the Hepatopac™ model, we have developed an innovative approach using a digital dispensing system to spot collagen and produce all types of micropatterned co-cultures. Co-cultures manufactured by this technique demonstrate that the method is robust, accessible and easy to use. Our spotting method was used to evolve the MPCC model and explore new applications.

## Remerciements

*Ces travaux menés dans le cadre d'une thèse CIFRE entre SANOFI et l'INSERM m'ont amené à rencontrer des personnes passionnées, engagées et inspirantes. Je tiens ici à les remercier.*

*Je voudrais tout d'abord remercier mes directrices de thèse :*

- *Sylvie Klieber (Sanofi) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son soutien inconditionnel tout au long de cette thèse et pour toutes les connaissances transmises. Un grand merci pour ton engagement et ton aide scientifique, c'est un plaisir de travailler à tes côtés, tu m'as beaucoup appris.*
- *Martine Daujat-Chavanieu et Sabine Gerbal-Chaloin (Inserm) pour votre confiance, votre disponibilité et pour m'avoir aiguillé dans mes travaux de recherche. Merci de m'avoir fait découvrir le monde académique, vous avez grandement contribué à la réussite de ce travail.*

*Mes remerciements vont ensuite à Hélène Vermet pour ses encouragements, sa volonté de réalisation et sa bienveillance tout au long de mon parcours à Sanofi. Merci de m'avoir fait confiance pour mon stage de Master qui est l'origine de ce beau projet et merci pour ton enthousiasme qui a toujours accompagné cette thèse.*

*Merci à Xavier Boulenc pour avoir participé à la genèse de ce sujet et pour avoir continué à suivre et à enrichir cette thèse même après ta mutation professionnelle.*

*J'adresse également mes remerciements à chacun des membres du jury : à Mme Gattacceca et Mme Richert qui m'ont fait l'honneur de rapporter ces travaux, ainsi qu'à, Mme Legallais, Mme Pardon et Mme Fournier-Wirth pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci pour votre investissement et pour avoir accepté d'associer vos expertises respectives à l'évaluation de cette thèse.*

*Un énorme merci à tous mes collègues de travail : l'équipe « Enzymologie et métabolisme » de Sanofi Montpellier, l'équipe « Foie » de l'IRMB et tous les stagiaires/alternants/doctorants. Votre convivialité, vos conseils et votre bonne humeur ont grandement contribué à créer une atmosphère de travail agréable. Vous êtes un maillon fondamental dans la réussite de ce travail. Je ne saurai oublier mes anciens collègues (SQO Microbiologie et DSAR-DD), merci de votre accueil, votre bienveillance et pour tout ce que vous m'avez appris.*

*Je tiens également à remercier Patrick Poulin, pour son aide précieuse et pour avoir contribué à la publication de nos résultats. Un grand merci à Olivier Fedeli et Nassim Djebli, pour vos contributions, vos propositions et vos encouragements durant ces travaux. Merci également à Brian William et Catherine Bougette pour la relecture de ma publication.*

*Je remercie le groupe SANOFI, le site de Montpellier et TMED-BCB qui ont grandement contribué à ma formation et au financement de ce projet. Les compétences acquises auprès du groupe m'ont offert de solides bases pour conduire de futurs projets innovants et je vous en suis très reconnaissant. Merci à l'ANRT et à l'INSERM d'avoir participé au financement de ces travaux et à l'université de Montpellier pour avoir encadré cette thèse.*

*Je termine par une profonde pensée <sup>♡</sup> à mes parents, ma sœur, ma famille pour leur soutien sans faille depuis toujours. Je remercie de tout cœur ma compagne, Emma <sup>♡</sup> d'avoir toujours été là. Merci à vous tous, j'espère être plus présent maintenant que cette thèse est terminée.*

# Remerciements



Sylvie Klieber  
Hélène Vermet  
Xavier Boulenc  
Patrick Poulin

Catherine Arabeyre  
Priscilla Brun  
Magalie Duroux  
Hélène Lacroix  
Marion Layssac  
Martine Mandray  
Patricia Moliner  
Nathalie Raoust

Pauline Compigne  
Stella Guido  
Maxime Jaranton

Fedeli Olivier



Martine Daujat-Chavanieu  
Sabine Gerbal-Chaloin

Philippe Briolotti  
Claire Gondeau  
Florence Guillotin  
Esther Perez-Gracia  
Jeremy Salvador

Christian Jorgensen

Merci à tous les collaborateurs de Sanofi  
Montpellier et de l'IRMB



*« Innover, ce n'est pas avoir une nouvelle idée mais arrêter d'avoir une vieille idée » Edwin H. Land*

# Amélioration de la prédiction de la clairance métabolique via l'utilisation de modèles hépatiques innovants

## Table des matières

LISTE DES ABBREVIATIONS .....	8
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	10
AVANT PROPOS: .....	12
I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
I. Le foie : un rôle fondamental dans le métabolisme des xénobiotiques .....	18
A. Anatomie du foie.....	18
B. Les différentes cellules hépatiques .....	22
1. Les Hépatocytes.....	22
2. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSECs) .....	23
3. Les cellules de Kupffer.....	25
4. Les cellules étoilées du foie (HSCs).....	26
5. Autres cellules .....	27
6. Conclusion .....	27
C. Les grandes fonctions hépatiques.....	28
1. Métabolisme hépatique des glucides.....	28
2. Métabolisme des protéines.....	29
3. Métabolisme des lipides.....	30
4. Fonction biliaire.....	30
5. Fonction de stockage.....	31
6. Fonction de détoxification.....	31
D. Zonation métabolique .....	31
E. La stéatopathie hépatique non-alcoolique .....	33
II. Etude du devenir des médicaments dans l'organisme .....	35
1. Absorption.....	35
2. Distribution.....	37
3. Métabolisme.....	39
4. Elimination.....	45
III. La clairance.....	46
A. Concepts fondamentaux liés à la clairance .....	46
B. Prédire et étudier la clairance dans un contexte de R&D pharmaceutique .....	52
1. Les études exploratoires (ou de recherche) et précliniques en lien avec la clairance métabolique .....	53
2. Exploitation des données générées <i>in vitro</i> et prédiction de la clairance métabolique .....	56
IV. Les modèles <i>in-vitro</i> hépatiques pour l'étude de la clairance.....	57

1.	Les modèles de routines.....	57
2.	Les modèles plus physiologiques .....	59
II.	Résultats .....	64
A.	Evaluation du kit TRANSIL pour la détermination du fup, fumic et fuhep.....	65
1.	Introduction.....	65
2.	Matériels et Méthodes.....	71
3.	Résultats .....	80
4.	Discussion .....	84
5.	Conclusion .....	89
6.	Perspectives : Prédiction in silico du fumic et fuhep.....	91
B.	Prédiction de la clairance métabolique.....	110
1.	Introduction.....	110
2.	Matériels et Méthodes.....	115
3.	Résultats .....	122
4.	Discussion .....	129
5.	Conclusion .....	133
C.	Investigation du rôle de l'albumine et amélioration de la prédiction de la clairance en utilisant le modèle hépatique long terme : Hepatopac™ .....	134
1.	Introduction de la publication.....	134
2.	Commentaire sur la publication :.....	152
D.	Développement d'une technique simple et flexible de Nanospotting destinée à la production de co-cultures micro-organisées .....	154
1.	Introduction.....	154
2.	Matériels et méthodes.....	161
3.	Résultats .....	166
4.	Discussion .....	183
5.	Conclusion .....	187
1.	Perspectives.....	188
E.	Potentiel des co-cultures MPCCs produites en interne pour étudier la stéatose hépatique .	189
1.	Introduction.....	189
2.	Matériels et Méthodes.....	193
3.	Résultats .....	195
4.	Discussion .....	202
5.	Conclusion .....	206
III.	Discussion et conclusions générales .....	207
	Références bibliographiques .....	213

## ***LISTE DES ABBREVIATIONS***

AAFE	Absolute average fold-error
ABC	ATP Binding Cassette
ACN	Acétonitrile
ADME	Ensemble des processus d'Absorption, de Distribution, Métabolisme et Excrétion
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFE	Average fold error
AGP (ou AAG)	alpha-1-glycoprotéine acide, orosomucoïde
ALB	Albumine
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Tri Phosphate
AUC	Aire sous courbe ; "Area Under Curve"
BSA	Serum Albumine Bovine ; "Bovine Serum Albumin"
BCRP	Protéine associée à la résistance au cancer du sein ; "Breast Cancer Resistance Protein"
BSEP	Pompe d'export des acides biliaires ; "Bile Salt Export Pump"
BW	« Body weight » ou poids corporel
Caco-2	Cellules de Carcinome de Colon Humain
CL	Clairance
CL <sub>H</sub>	Clairance hépatique
CL <sub>int</sub>	Clairance intrinsèque
CL <sub>p</sub>	Clairance plasmatique
CoA	Coenzyme A
CYP	Cytochrome P450
CYP450	Cytochrome P450
DDi	Drug-Drug Interactions
DEX	Dextromethorphan
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	Epidermal Growth Factor
EMA	Agence Européenne du Médicament ; "European Medicines Agency"
ES+/ES-	Electrospray en mode d'ionisation positif ou négatif
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FDA	Agence américaine du médicament ; "Food and Drug Administration"
FMO	Flavine Mono Oxygénase
fuhep	fraction libre d'un composé incubé en présence d'hépatocytes
fumic	fraction libre d'un composé incubé en présence de microsomes
fup	fraction libre plasmatique
HNF4 $\alpha$	"Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ "
HBV	Virus de l'hépatite B
HLM	Microsomes hépatiques humains ; "Human Liver Microsomes"
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance ; "High Performance Liquid Chromatography"
IC50	Concentration en Inhibiteur nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition
IVIVE	Extrapolation <i>in vitro- in vivo</i>

Ke	Constante de vitesse d'élimination
Ki	Constante d'inhibition
LC	Chromatographie Liquide
logP	Coefficient de partage octanol-eau
MDR	Multi-drogue resistance ; "Multi Drug Resistance"
MDZ	Midazolam
MRP	Protéine associée à la Multi-drogue résistance ; "Multidrug Resistance-associated Protein"
MS	Spectrométrie de Masse ; "Mass spectrometry"
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NEC	Nouvelle Entité Chimique
NTCP	Polypeptide co-transportant le sodium et le taurocholate ; "Na+-Taurocholate Cotransporting Polypeptide"
O2	Dioxygène
OAT	Transporteur d'anion organique ; "Organic Anion Transporter"
OATP	Polypeptide de transport des anions organiques ; "Organic Anion Transporting Peptide"
OCT	Transporteur de cation organique ; "Organic Cation Transporter"
1'-OH-MDZ	1'-Hydroxy-Midazolam
1'-OH-MDZ-Glu	1'-Hydroxy-Midazolam Glucuronide
PBPK	Physiologically Based Pharmacokinetic
PBSF	Physiologically Based Scaling Factor
PDMS	Polydiméthylsiloxane
P-gp	Glycoprotéine-P
pH	Potentiel Hydrogène
PHH	Hépatocytes primaires Humains
PK	Pharmacocinétique
pKa	constante d'acidité
PLR	« plasma to liver ratio » correspondant au rapport de concentration plasmatique / hépatique de l'albumine
PPB	« plasma protein binding »
PPAR	Récepteur activé par des proliférateurs de peroxysomes ; "Peroxisome Proliferator Activated Receptor"
REL	Réticulum Endoplasmique Lisse
REG	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RT-PCR	"Real Time - reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction"
SLC	"Solute Carriers"
TFP	Triflupéridol
UDP	Uridine 5'-Di-Phosphate
UDPGA	Acide Uridine 5'-Di-Phospho Glucuronique
UGT	UDP-Glucuronosyl Transférase
Vd	Volume de distribution

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Vascularisation hépatique	18
Figure 2 : Segmentation hépatique	19
Figure 3 : Coupe histologique d'un foie décrivant le lobule hépatique coloration par Hematoxyline Eosine	20
Figure 4 : Travée d'Hépatocytes	20
Figure 5 : Représentation schématique de la zonation d'un lobule hépatique	20
Figure 6 : Organisation du lobule hépatique	21
Figure 7: coupe d'un sinusoiide hépatique observée au microscope optique apres colaration HE	23
Figure 8 : Endothélium sinusoiidale hépatique observation au microscopie électronique à balayage	24
Figure 9 : Résumé des principales caractéristiques des cellules de Kupffer	25
Figure 10 : Cellules de Kupffer résidant dans la lumière d'une sinusoiide.	25
Figure 11 : Actions biologiques associées au processus d'activation des cellules étoilées du foie	26
Figure 12 : Représentation schématique de la zonation métabolique au sein des lobules hépatiques	32
Figure 13 : Analyse histologique de deux biopsies dérivant la stéatose macrovacuolaire et microvacuolaire	33
Figure 14 : Les différents stades de la NAFLD	34
Figure 15 : Classification BDDCS (Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System)	36
Figure 16 : Contribution (en %) des isoformes de CYP450 dans la métabolisation des médicaments	41
Figure 17 : Localisation membranaire des transporteurs hépatiques	44
Figure 18 : Représentations graphiques des modèles Well stirred et Parallel Tube model	49
Figure 19 : Facteurs influant sur les concentrations intracellulaires de médicaments dans l'hépatocyte	51
Figure 20 : Analyse des principales causes d'attrition entre 2000 et 2010	52
Figure 21 : Méthodes in vitro utilisées pour déterminer la fration libre plasmatique	65
Figure 22 : Illustration des kits et de la technologie Transil <sup>XL</sup> .	72
Figure 23 : Kit Transil <sup>XL</sup> workflow	74
Figure 24 : Illustrations du dispositif de dialyse à l'équilibre RED device (Rapid Equilibrium Dialysis)	79
Figure 25 : Détermination de la fraction libre plasmatique : Comparaison Dialyse à l'équilibre vs Transil <sup>XL</sup>	82
Figure 26 : Détermination de la fraction libre microsomale : Comparaison Dialyse vs Transil <sup>XL</sup>	84
Figure 27 : Comparaison des fractions libres plasmatiques (fup) obtenues par Dialyse vs Transil <sup>XL</sup>	87
Figure 28 : Comparaison des fractions libres microsomales (fomic) obtenues par Dialyse vs Transil <sup>XL</sup>	87
Figure 29 : Corrélation entre les clairances prédites et les clairances plasmatiques observées chez l'Homme	127
Figure 30 : Schéma de la structure des ilots d'hépatocytes sur HepatoPac.	155
Figure 31 : Processus global de création de co-cultures micro-organsisées (MPCC) par photolithographie	156
Figure 32 : Catalogue des possibilités de la tôle perforée	158
Figure 33 : Photos du robot dispenser D300e	160
Figure 34 : Logiciel HP Bio Pattern, module de création des Layouts	166
Figure 35 : Tailles des spots en fonction du volume dispensé	169
Figure 36 : Impact de la concentration du collagène sur le spotting	170
Figure 37 : Impact de la concentration du collagène sur le spotting	171
Figure 38 : Spotting sur une plaque 96 puits	172
Figure 39 : Descriptif de la cassette de distribution utilisée pour le spotting	172
Figure 40 : Evaluation de la précision de spotting sur des motifs distribués par le robot D300e	173
Figure 41 : Spotting et ensemencement des co-cultures micro organisées	174
Figure 42 : Ilots d'hépatocytes cultivés en monoculture (Jour 4 et 11)	175
Figure 43 : Suivi morphologique des Ilots d'hépatocytes cultivés avec des fibroblastes 3T3-J2	176
Figure 44 : Suivi morphologique des Ilots d'hépatocytes cultivés avec des cellules souches mésenchymateuse	177
Figure 45 : Activité CYP3A4 des hépatocytes cultivés en MPCC	178
Figure 46 : Activité CYP2D6 des hépatocytes cultivés en MPCC	179
Figure 47 : Suivi de la sécrétion d'albumine de co-cultures micro organisées (#4122C + mMSC)	180
Figure 48 : Immunomarquage de la protéine MRP2 sur les cultures MPCCs (lot #4122C cultivé avec mMSC ou 3T3-J2)	181
Figure 49 : Immunomarquage du CYP3A4 sur les cultures MPCCs (lot #4122C cultivé avec mMSC ou 3T3-J2)	182

<i>Figure 50 : Support transwell® 24 puits adapté pour le spotting</i>	184
<i>Figure 51 : Suivi morphologique des îlots d'hépatocytes cultivés avec des cellules souches mésenchymateuses humaines de la moelle osseuse (BM-MSC)</i>	196
<i>Figure 52 : Suivi morphologique des îlots d'hépatocytes cultivés avec des cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées du tissu adipeux (hASC)</i>	197
<i>Figure 53 : Activités des CYP3A4 et 2D6 mesurées sur 4 types de cocultures MPCC Activités des CYP3A4 et CYP2D6 mesurées sur 4 types de co-cultures MPCC sur les lots 4020 et 4122C</i>	198
<i>Figure 54 : Suivi de la sécrétion d'albumine sur des MPCC cultivées avec des MSC de souris (mMSC) versus humaines (BM-MSC et hASC)</i>	199
<i>Figure 55 : Marquage de la protéine MRP2 et des lipides neutres sur les MPCCs cultivés avec des MSC humaines ou de souris</i>	200
<i>Figure 56 : Concentration intracellulaire en triglycérides mesurée sur les différentes cocultures MPCCs</i>	201
<i>Figure 57 : Effets bénéfiques des MSC sur les hépatocytes et mécanismes potentiellement impliqués dans la symbiose</i>	205

## **LISTE DES TABLEAUX**

<i>Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques et fractions libres (fup et fumic) expérimentales</i>	80
<i>Tableau 2 : Physiological Based Scaling Factors (PBSF)</i>	120
<i>Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques et données pharmacocinétiques des composés testés</i>	123
<i>Tableau 4 : Résumé des performances de succès concernant la classification des molécules testées</i>	124
<i>Tableau 5 : Compilation des clairances prédites et observées</i>	125
<i>Tableau 6 : Évaluation statistique des méthodes IVIVE et modèles in vitro utilisés en routine</i>	128
<i>Tableau 7: Evaluation de différentes solutions de spotting</i>	169

## **AVANT PROPOS:**

Le développement d'un médicament est un processus long, complexe et fréquemment soumis à un haut degré d'incertitude. L'industrie pharmaceutique s'efforce de réduire et d'anticiper cette notion d'inconnu en optimisant la sélection des candidats médicament dès les phases de recherche. En effet, c'est en capitalisant sur les connaissances acquises au cours des échecs et attritions que les stratégies et les critères de sélection ont évolué. Il est ainsi admis que la puissance d'une molécule et sa capacité à moduler une cible ne sont pas les uniques critères pour juger de l'efficacité d'un futur médicament.

L'aptitude d'un composé à atteindre une cible, la facilité d'administration, la durée d'action et l'absence de toxicité sont autant de critères complémentaires à prendre en compte dans les prises de décision. La pharmacocinétique qui a pour but de décrire le devenir du médicament dans l'organisme a ainsi un rôle primordial dans le processus de R&D pharmaceutique. Cette science intègre 4 phases élémentaires : l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion (ADME). À cet égard, le foie joue un rôle majeur dans la disposition des médicaments dans le corps. Lorsqu'un composé atteint le foie via la circulation systémique, l'élimination hépatique commence par la pénétration du médicament à travers la membrane sinusoidale de l'hépatocyte, suivie par le métabolisme et l'excrétion biliaire.

Tôt en recherche, des investigations sont menées pour étudier le profil pharmacocinétique des molécules et sélectionner celles présentant les profils les plus favorables. Il s'agit alors de trouver le meilleur compromis entre la puissance d'une molécule et sa capacité à atteindre la cible afin d'y exercer son effet thérapeutique. Le métabolisme des médicaments et les réactions de biotransformation qui y sont associées jouent un grand rôle dans cette balance. La concentration plasmatique du principe actif est en effet principalement contrôlée par des réactions enzymatiques qui convertissent une molécule en un ou plusieurs métabolites. Toutes les grandes entreprises pharmaceutiques sont ainsi dotées de services spécialisés en pharmacocinétique et métabolisme impliquant des experts DMPK « Drug Metabolism and Pharmacokinetics ».

Les travaux menés au cours de cette thèse se sont concentrés autour de la clairance hépatique qui est un élément majeur de la pharmacocinétique. Par définition, ce paramètre correspond à la quantité de sang qui traverse le foie et qui va être totalement débarrassée du médicament

par unité de temps. La posologie à adopter et les doses à administrer dépendent ainsi en majeure partie de la clairance. Afin d'obtenir un traitement efficace, il faut maintenir les concentrations plasmatiques dans l'intervalle thérapeutique, c'est à dire dans la zone de concentrations assurant l'effet thérapeutique optimal tout en minimisant le risque d'effets indésirables. Pour des raisons évidentes d'éthique, de sécurité et de coûts, l'administration de candidats médicament chez l'homme est restreinte et n'est possible qu'à partir de la phase 1, après validation des données précliniques par les autorités réglementaires. La clairance est ainsi véritablement mesurée qu'à partir de cette première phase clinique soit plusieurs années après le début du projet. Ce paramètre étant essentiel dans la prise de décision et dans la sélection des meilleurs candidats, les industriels se sont dotés d'outils *in vitro* et *in silico* permettant d'estimer la clairance en amont des phases cliniques.

La prédiction de la clairance peut se faire via deux grandes approches. Tout d'abord l'approche allométrique basée sur le principe qu'il existe des analogies biochimiques, anatomiques et physiologiques entre l'homme et l'animal. Cette méthode nécessite des études pharmacocinétiques (*in vivo*) généralement réalisées sur trois espèces différentes avec une administration intraveineuse de composés. Ces extrapolations interspécifiques font intervenir divers paramètres tels que la surface et le poids corporel, le métabolisme basal et le volume des organes afin de transposer les données précliniques (animales) aux études de phase I (Homme). Dans ce manuscrit, nous nous concentrerons surtout sur la seconde approche de prédiction basée sur l'utilisation de données *in vitro* obtenues sur modèles hépatiques. Cette méthode peut être appliquée aussi bien en recherche pour le « ranking » des composés et l'identification des profils pharmacocinétiques les plus favorables, qu'en phase préclinique en complément des méthodes allométriques pour l'estimation de la première dose à administrer chez l'Homme. Ce travail est ainsi consacré à tout ce qui entoure ces méthodes d'extrapolation désignées sous le nom de méthodes IVIVE « *In vitro* to *In vivo* extrapolation » regroupant :

- Les modèles *in vitro* hépatiques, leur nature et leur capacité à mimer une réponse physiologique
- Les paramètres en lien avec la clairance métabolique (ex : liaison aux protéines plasmatiques)
- Les méthodes mathématiques pour l'extrapolation *vitro* -> *vivo*

Quelle que soit la méthode de prédiction, il est nécessaire d'avoir une connaissance accrue de la physiologie humaine et être conscient des limites de chaque modèle et méthode utilisés. La clairance hépatique est la somme de processus complexes et interconnectés qui sont difficiles à reproduire *ex vivo*. Une entité chimique qui se retrouve dans la circulation sanguine suit un long chemin et subit nombre d'interactions avant sa prise en charge par les enzymes du métabolisme. Une molécule peut tout d'abord se lier à des composants sanguins, ce qui va limiter son interaction potentielle avec les hépatocytes responsables du métabolisme. La liaison des médicaments aux protéines plasmatiques (fup) est ainsi un concept extrêmement important en pharmacocinétique car cette fixation impacte les possibilités de diffusion du médicament vers les tissus et leur cible. Le rôle de l'albumine sur la disposition des médicaments sera discuté et de nouvelles hypothèses physiologiques seront également challengées dans ce manuscrit. *In vitro*, la fixation des entités chimiques étudiées au matériel ou à la matrice (ex : fuinc lors de l'utilisation d'hépatocytes, microsomes...) peut potentiellement biaiser l'interprétation et compliquer l'estimation de la clairance intrinsèque. Ces phénomènes sont depuis longtemps discutés dans la littérature et des approches ont été proposées pour corriger la clairance expérimentale. Il est cependant encore difficile de se faire une opinion sur la pertinence de ces méthodologies parfois très différentes. Afin d'apporter plus de précision, nous nous sommes intéressés à la détermination expérimentale de ces paramètres (fup et fuinc) ainsi qu'à leur intégration dans les méthodes d'extrapolation.

En parallèle, le développement et l'utilisation en routine de modèles *in vitro* plus prédictifs ont permis de faciliter la sélection de candidats médicament et de réduire le recours aux animaux de laboratoire. Grâce aux nouvelles techniques et stratégies de sélection des candidats, la fréquence de nouvelles molécules soumises au développement et qui présentent des demi-vies longues (= très stables) est en forte augmentation. L'étude de leur métabolisme nécessite donc des systèmes *in vitro* utilisables sur des temps d'incubations prolongés et supérieurs aux capacités des modèles dits « conventionnels ». Tout comme l'optimisation de l'exploitation des données *in vitro*, le développement et la validation de modèles cellulaires plus physiologiques est au cœur de cette thèse. Au cours de nos travaux, différentes solutions ont donc été ciblées en vue de la mise en place de modèles *in vitro* plus novateurs. L'amélioration des modèles *in vitro* se base principalement sur deux grands axes : d'une part, sur la nature des cellules qui les compose et d'autre part sur l'architecture et l'organisation que l'on

souhaite instaurer dans le modèle. Pour la stabilité des hépatocytes primaires humains, l'hétérogénéité du microenvironnement est particulièrement importante et peut être établie par une co-culture associant les hépatocytes avec d'autres types cellulaires d'origine hépatique. La structuration dimensionnelle est aussi importante pour rétablir et maintenir la fonction des tissus humains *ex vivo*. La culture en trois dimensions (3D), l'utilisation de matrices physiologiques et la construction de supports bio-inspirés (scaffold) sont des outils prometteurs pour imiter de manière authentique l'environnement tissulaire présent *in vivo*. Au cours de ce travail, nous insisterons sur le besoin d'une convergence entre académiques et industriels dans l'objectif de faire naître des consensus et d'entretenir une pluridisciplinarité au bénéfice de l'ingénierie tissulaire. Nos dernières expérimentations présentées à la fin de ce manuscrit sont un exemple de l'utilité d'une telle collaboration. Cette thèse menée conjointement par Sanofi et l'Inserm a en effet permis de transposer des résultats et découvertes initialement centrés sur le DMPK vers d'autres domaines d'applications.

La première partie de cet ouvrage sera consacrée à une étude bibliographique détaillant tout d'abord le foie et son rôle fondamental dans le métabolisme des xénobiotiques. Nous aborderons ensuite le devenir du médicament dans l'organisme en décrivant les quatre phases ADME. Pour entrer en détail dans le contexte de cette thèse, nous continuerons cette revue de la littérature par un chapitre détaillé sur la clairance et les modèles *in vitro* qui permettent de l'étudier. Cette 1<sup>ère</sup> partie sera ensuite clôturée par les méthodes d'extrapolation utilisées pour exploiter les données générées.

Les résultats obtenus durant ces 3 ans de thèse seront ensuite présentés dans la seconde partie de ce manuscrit. Nous commencerons par une étude menée sur la détermination expérimentale du *fup* et *finc* et sur l'utilisation de ces paramètres dans un contexte de prédiction de clairance. Une seconde étude sera dédiée à la comparaison de trois modèles *in vitro* utilisés en routine pour la prédiction de la clairance métabolique. Le modèle de co-culture micro-organisée « Hepatopac » (Medford, MA, Etats Unis) sera ensuite challengé face à un dataset composé d'une majorité de molécules à faible clairance. L'article que nous avons publié sur Hepatopac et qui associe la méthode IVIVE décrite initialement par Poulin et al. et améliorée par nos travaux y sera alors présenté.

Les performances intéressantes d'Hepatopac nous ont encouragés à développer une technologie de Nano-Spotting destinée à la production en interne de modèles hépatiques en co-culture micro-organisée. Initialement ciblé sur le DMPK, nous présenterons en fin de manuscrit, des solutions permettant d'étendre l'application de cette technologie à l'étude de la stéatose hépatique et potentiellement de la NASH.

La présentation de ces résultats sera organisée comme des articles, c'est pourquoi ce manuscrit comportera une partie « Introduction » et « Matériels et méthodes » pour chaque étude afin de se replacer dans le contexte expérimental et rendre la lecture plus pertinente.

Pour finir, une discussion générale et les perspectives associant l'ensemble des résultats générés au cours de cette thèse clôturera cet ouvrage.

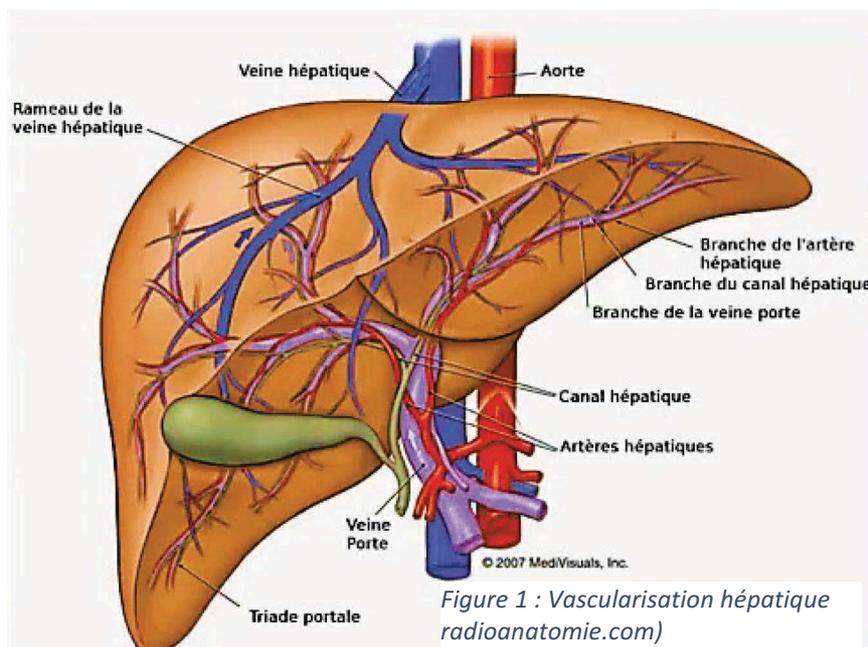
# I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

# I. Le foie : un rôle fondamental dans le métabolisme des xénobiotiques

(compilation bibliographique extrait d'un chapitre de livre rédigé par l'équipe (Herrero *et al.*, 2014)

## A. Anatomie du foie

Avec une masse d'environ 1.5 kg et pouvant atteindre 2.5 kg lorsqu'il est gorgé de sang, le foie est le plus grand organe du corps humain (Figure 1). Il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen et est associé à l'intestin grêle via la veine porte hépatique permettant son irrigation. Le foie effectue plus de 500 fonctions métaboliques conduisant à la synthèse d'un grand nombre de composés libérés dans la circulation sanguine (ex : protéines plasmatiques, urée, facteurs de coagulation, glucose issue de la glycogénolyse) ou excrétés dans le tractus intestinal via la production de bile. En parallèle, de nombreux produits comme par exemple le glycogène et des vitamines peuvent être stockés dans le parenchyme hépatique. La majorité du sang entre dans le foie par l'intermédiaire de la veine porte issue de la fusion entre la veine mésentérique supérieure (tube digestif) et la veine splénique (rate). La veine porte fournit du sang veineux en basse pression et riche en nutriment tandis que le sang artériel provenant de l'artère hépatique amène au foie un sang riche en oxygène et en pression plus importante. Afin d'atteindre toutes les cellules hépatiques, ces deux vaisseaux se divisent ensuite en plusieurs branches à l'intérieur du foie. Après avoir irrigué l'ensemble de l'organe, le sang est évacué par la veine hépatique puis dans la veine cave inférieure qui réachemine le sang vers le cœur. Au niveau sous hépatique, on retrouve la vésicule biliaire qui est accolée au foie.



L'architecture vasculaire qui irrigue l'intérieur du foie est particulièrement complexe. Les principaux vaisseaux sanguins et lymphatiques, les nerfs et les canaux biliaires forment des réseaux capillaires indépendants qui communiquent avec le foie via un site commun : le hile hépatique.

Le foie humain se divise en deux lobes principaux, le plus important étant le lobe droit qui représente près de deux tiers du volume du foie et qui est séparé du lobe gauche (25% du volume) par le ligament falciforme. Deux autres lobes, beaucoup moins imposants sont : le lobe caudé (ou lobe de Spiegel) et le lobe carré.

La pratique de la résection chirurgicale a fait apparaître la nécessité d'installer une nomenclature définissant la segmentation hépatique. La plus populaire étant celle établie par le chirurgien Couinaud qui a divisé le foie en 8 unités fonctionnelles. Chacune de ces unités fonctionnelles contient en son centre une artère, une veine porte et une ou des voies biliaires et, à sa périphérie, a un drainage veineux par une veine hépatique ou une branche de veine hépatique. Ces segments, notés de I à VIII, appartiennent, pour les segments II, III et IV, au foie gauche et pour les segments V, VI, VII et VIII au foie droit (Figure 2).

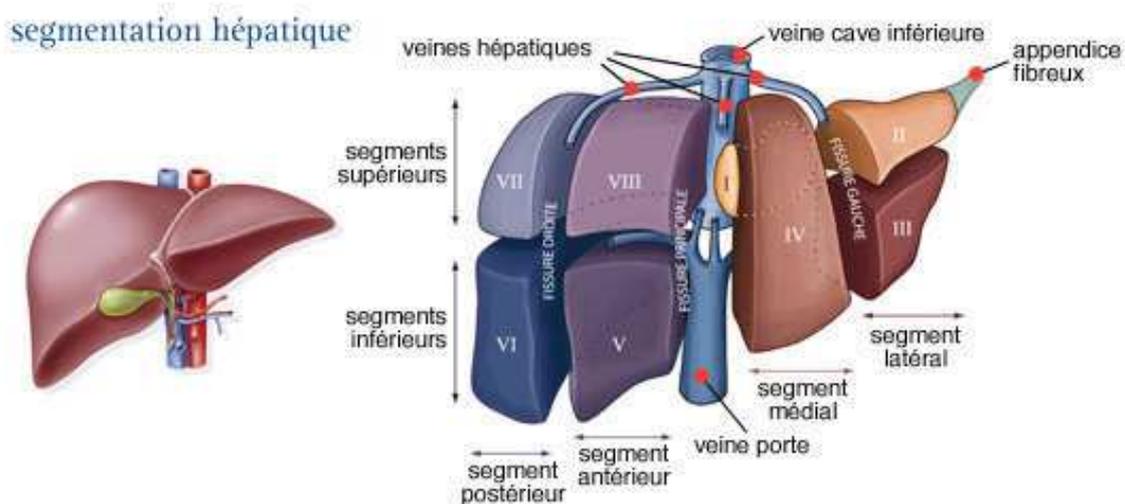


Figure 2 : Segmentation hépatique Source : <http://www.arcaqy.org>

Au niveau histologique, les lobules hépatiques constituent l'unité fonctionnelle du foie. Schématiquement, ils sont très souvent représentés sous forme hexagonale avec un espace porte à chaque sommet. L'espace porte (triade portale) regroupe une branche de la veine porte, une ou deux branches de l'artère hépatique et des canaux biliaires. Les lobules sont organisés et centrés autour de la veine centrolobulaire (Figure 3).

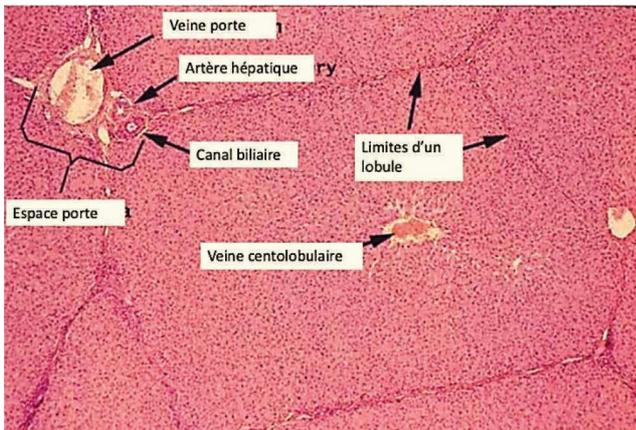


Figure 3 : Coupe histologique d'un foie décrivant le lobule hépatique coloration par Hematoxyline Eosine

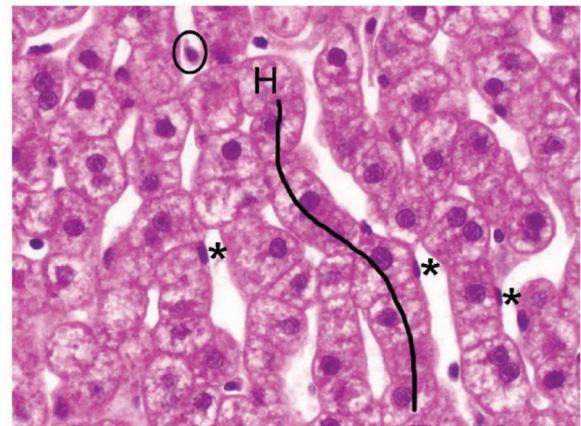


Figure 4 : Travée d'Hépatocytes (trait noir) et sinusoides (en blanc). Le rond noir entoure une cellule de Kupffer. Source : Dominique Wendum

Entre les espaces portes et cette veine centrale, les hépatocytes sont disposés en travées (travées de Remak) et sont séparés par les sinusoides (Figure 4). Au sein des lobules, le sang circule de l'espace porte vers la veine centrolobulaire tandis que la bile produite par les hépatocytes circule en flux opposé en rejoignant l'espace porte. En fonction de la distance qui sépare les hépatocytes de la veine centrolobulaire, il est possible de définir une zone périportale, médiolobulaire et centrolobulaire. Les fonctions hépatocytaires diffèrent en fonction de ces zones (Figure 5). On parle alors de la zonation métabolique qui sera décrite plus précisément dans un prochain chapitre.

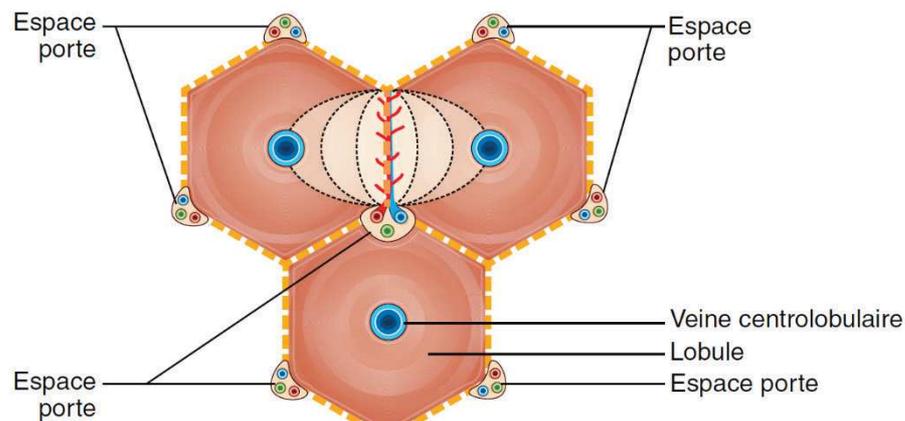


Figure 5 : Représentation schématique de la zonation d'un lobule hépatique

Les sinusoides sont apparentés à des capillaires dont la paroi est constituée par un tapis discontinu de cellules endothéliales. Ces petits vaisseaux peuvent être bordés de cellules de Kupffer et sont perforés de pores de dimensions variables qui favorisent les échanges métaboliques ( $\approx 10$  nm de diamètre). L'espace compris entre les hépatocytes et ces cellules endothéliales est appelé « espace de Disse » (Figure 6). Il renferme les cellules stellaires hépatiques (ou cellules de Ito), de la matrice extracellulaire et de nombreuses microvillosités hépatocytaires qui accroissent la surface d'échange. Le faible flux sanguin et le faible diamètre des sinusoides permettent aux cellules immunitaires (lymphocytes, cellules dendritiques...) d'interagir avec les hépatocytes, l'épithélium vasculaire et les cellules de Kupffer.

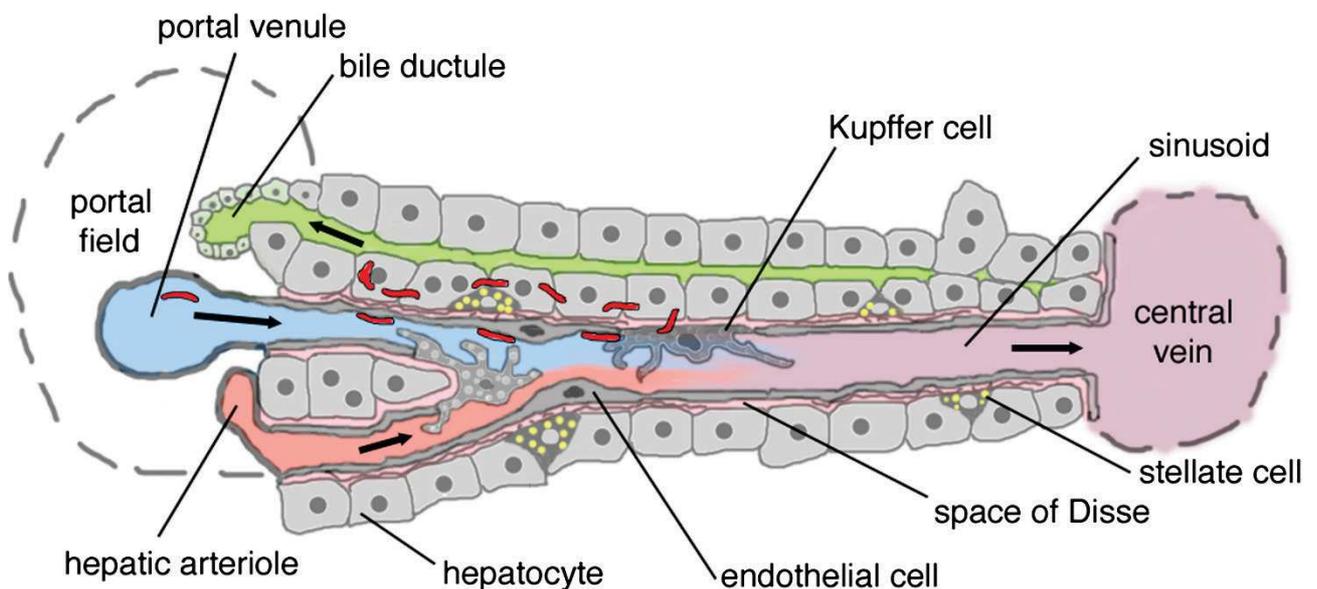


Figure 6 : Organisation du lobule hépatique. Source : Engelmann et al. 2005

La bile est produite par les hépatocytes et sécrétée au niveau des canalicules biliaires. Les canalicules sont de fins conduits délimités par les pôles apicaux des hépatocytes. Ils sont ainsi formés à l'interface de deux hépatocytes qui forment chacun la moitié d'un canalicule. La bile n'est jamais en contact de la lumière sinusoidale grâce aux systèmes de jonctions qui assurent l'étanchéité d'une part et d'autre du canalicule biliaire. Ces canaux servent à drainer la bile vers les espaces portes dans le sens contraire de la circulation sanguine. La bile rejoint ensuite des canaux bordés de cholangiocytes appelés passages de Hering ou « cholangioles ». Les canaux biliaires interlobulaires se réunissent ensuite pour former des conduits de calibre plus important permettant l'évacuation de la bile hors du foie via les canaux hépatiques et cholédoques.

## B. Les différentes cellules hépatiques

Le foie est composé de différents types cellulaires qui interagissent et coopèrent ensemble pour réaliser de nombreuses fonctions permettant le maintien de l'homéostasie dans l'organisme. Au sein de l'organe, l'hépatocyte qui est la cellule majoritaire du tissu est en effet soutenu par les populations cellulaires non parenchymateuses du foie. Les cellules non parenchymateuses qui se nichent dans les sinusoides composent seulement 6.5% du volume hépatique mais représentent 40% du nombre total de cellules dans le foie. Les parois des sinusoides sont bordées par au moins trois types de cellules : les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSECs en anglais), les cellules de Kupffer et les cellules stellaires hépatiques (anciennement connues sous le nom de cellules de Ito ou cellules étoilés ; HSCs en anglais). Des lymphocytes intrahépatiques sont également souvent présents dans la lumière sinusoidale avec notamment les « Pit cells » reconnues pour leurs fonctions de « natural killer » (NK) spécifiques au foie.

### 1. Les Hépatocytes (Boden et al., 2008, Macsween et al., 2002)

Les hépatocytes sont de formes polygonales, parfois binucléés et présentent un diamètre généralement compris entre 20 et 30  $\mu\text{m}$  chez l'Homme (Figure 7). Ce sont les cellules effectrices de la majorité des fonctions hépatiques. Ils représentent 80% de la masse du foie et sont caractérisés par trois domaines membranaires majeurs :

- Le domaine basal ou sinusoidale montrant de petites microvillosités impliquées dans les échanges entre le sang irrigant le sinusoides et l'hépatocyte,
- Un domaine latéral jouant le rôle de jonction avec l'hépatocyte voisin,
- Le pôle apical dirigé vers le milieu extérieur, composant des canalicules biliaires.

Le cytoplasme est riche en organites intracellulaires tels l'appareil de Golgi, les mitochondries, les réticulums endoplasmiques (lisse et granuleux) et contient de nombreux grains de glycogène. Cette abondance en organites cytoplasmiques atteste de la forte activité de ces cellules. La vie moyenne des hépatocytes est d'environ 150 jours. Hors conditions pathologiques, le renouvellement hépatocytaire est ainsi très lent et les mitoses sont en

conséquence très rarement observées. Le rôle et les nombreuses fonctions hépatocytaires seront décrits dans le chapitre suivant.

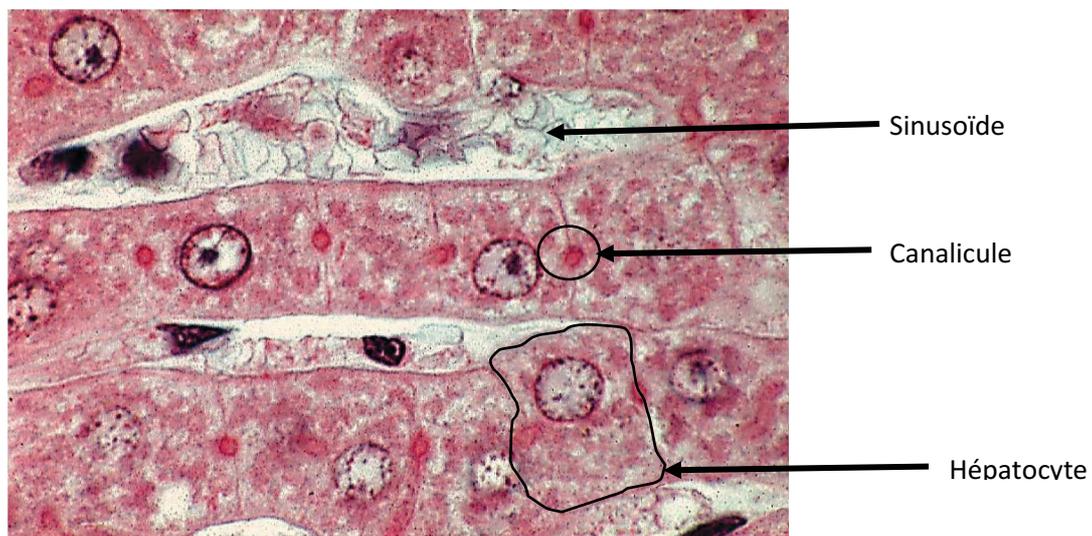


Figure 7: coupe d'un sinusoiide hépatique observée au microscope optique après coloration HE  
source : <http://www.histology.be>

## 2. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSECs)

(Braet and Wisse, 2002; Böttcher *et al.*, 2011)

Ces cellules endothéliales sont des cellules très fines et hautement spécialisées, elles tapissent les sinusoiides hépatiques de façon discontinue et forment des vaisseaux poreux. Dans les années 1970, à la suite des travaux d'Eddie Wisse sur la fenestration, les LSECs sont reconnues comme un type cellulaire distinct.

Les fenestrations occupent 5 à 10% de la surface endothéliale, leurs diamètres compris entre 50 à 150 nm favorisent les échanges entre la lumière sinusoidale et les hépatocytes (Figure 8). La fenestration est hétérogène et diffère entre la région centrolobulaire et périportale. La porosité est plus importante en zone péricentrale mais les pores sont moins larges qu'en région périportale. Ces fenestrations permettent de moduler le passage du plasma et d'une grande variété de composés dans l'espace de Disse. Les petites lipoprotéines et les protéines plasmatiques (ex : albumine) sont par exemple capables de traverser ; Seules les molécules très imposantes (grandes lipoprotéines/chylomicrons) et les cellules seront retenues par la taille de ces pores.

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) libéré par les hépatocytes et les cellules stellaires est le stimulus le plus décrit pour réguler ces fenestrations et les endocytoses. En effet, les LSECs agissent également comme un endothélium de capture (scavenger) très efficace qui utilise l'endocytose médiée par la clathrine pour éliminer les molécules endogènes ainsi que les molécules exogènes des sinusoides (y compris les particules virales).

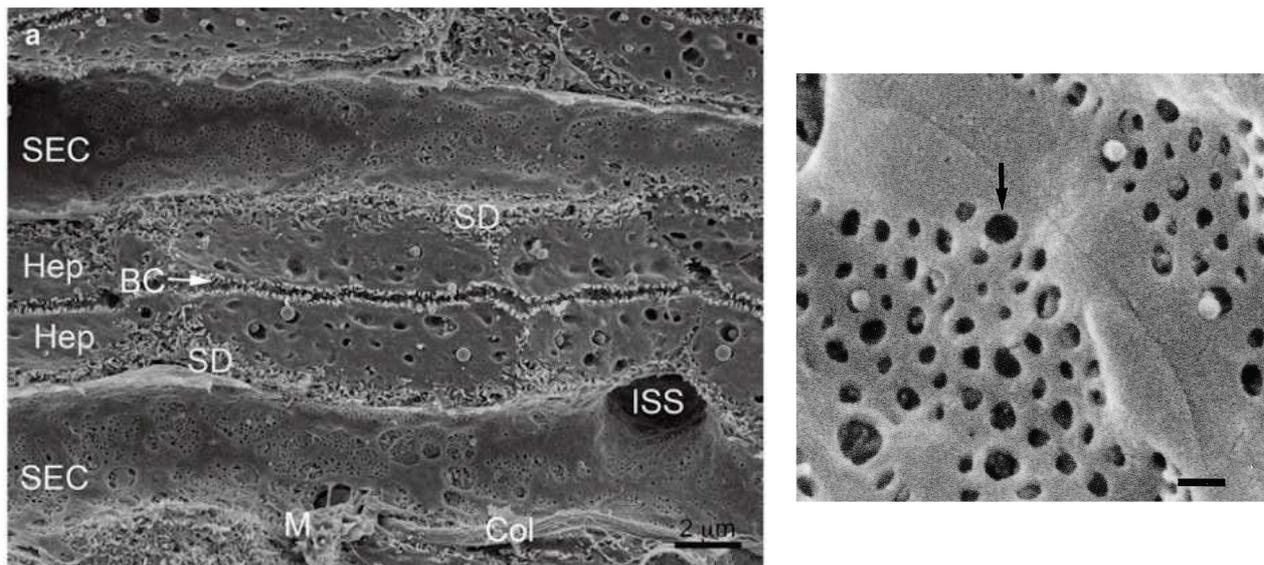


Figure 8 : Endothélium sinusoidale hépatique observation au microscopie électronique à balayage. A gauche, faible grossissement permettant une observation globale de la coupe. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (SEC) sont situées de part et d'autre des travées hépatocytaires (HEP). Sur cette photographie nous pouvons également observer les espaces de Disse (SD) et les canalicules biliaires (BC). A droite, la photographie et le zoom sur les LSECs et leurs fenestrations. Source : Braet & Wisse, 2002

Au cours des 20 dernières années, la liste des publications décrivant les médiateurs sécrétés par les LSECs est impressionnante. Il est devenu de plus en plus évident que les LSECs contribuent activement à l'ensemble des scénarios physiopathologiques en synthétisant et sécrétant des facteurs de croissance, cytokines, chimiokines et autres médiateurs. Via la production de collagène IV, fibronectine et collagène III, les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques interviennent également dans la synthèse de la matrice extracellulaire qui tapisse le micro-environnement hépatique. Elles expriment les récepteurs CD4, CD13, CD14, CD16, le récepteur pour la liposaccharide-binding-protein, les récepteurs II et III du fragment Fc des IgG et expriment des molécules intervenant dans l'adhésion des leucocytes. Elles n'expriment pas PECAM-1 [platelet endothelial cell adhesion molecule] et CD 34.

### 3. Les cellules de Kupffer (Kolios et al., 2006; Roberts et al., 2007)

Il s'agit de macrophages mobiles situés à la surface luminale des cellules endothéliales (Figure 10). On leur prête parfois un rôle dans la formation de la barrière sinusoidale. Cette population représente 80 à 90 % des macrophages fixes de l'organisme et environ 15% des cellules du foie. Les cellules de Kupffer sont capables d'auto-renouvellement mais elles sont principalement issues de la différenciation de monocytes lors de la pénétration de ces derniers dans le foie. Leur surface contient des microvillosités, des pseudopodes et des lamellipodes qui peuvent se projeter dans toutes les directions. Leurs principales caractéristiques physiologiques et physiopathologiques sont résumées dans la figure 9.

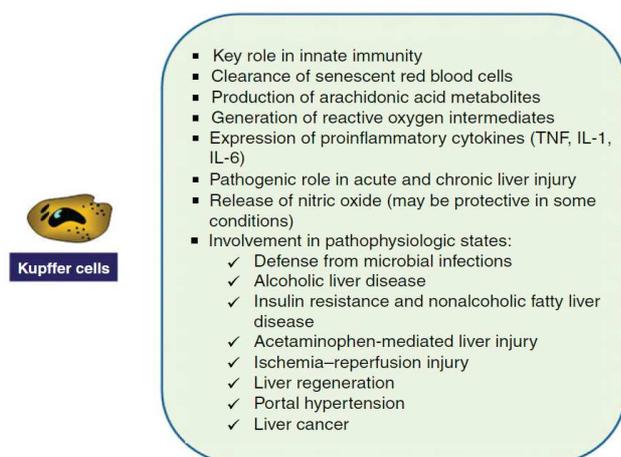


Figure 9 : Résumé des principales caractéristiques physiologiques et physiopathologiques des cellules de Kupffer.  
(Source : Marra and Parola, 2011)

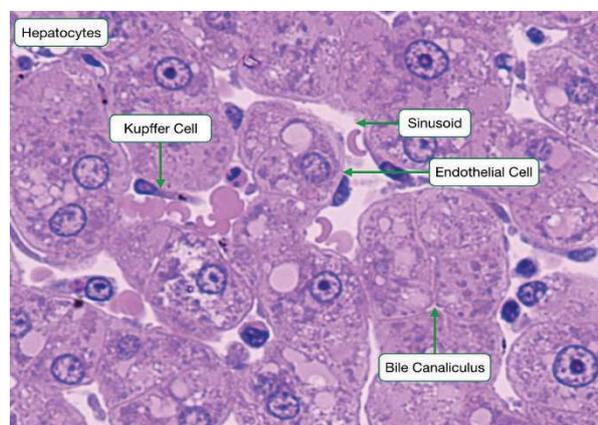


Figure 10 : Cellules de Kupffer résidant dans la lumière d'une sinusoïde.

Tout comme les hépatocytes, les cellules de Kupffer peuvent présenter des différences fonctionnelles et morphologiques en fonction de leur localisation dans le lobule hépatique. Ces cellules sont ainsi plus larges dans la région périportale où elles se spécialisent dans la défense contre les bactéries provenant de l'artère hépatique ou de la veine porte. Grâce à une forte activité lysosomale, les cellules de Kupffer ont une grande capacité phagocytaire permettant l'élimination des particules exogènes mais aussi endogènes (hématies âgées). Dans la zone centrolobulaire, les cellules de Kupffer ont une taille plus faible et leur rôle consiste généralement à interagir avec les cellules du micro-environnement via la sécrétion de médiateurs biologiques tels que des chimiokines et des cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ ). Par le recrutement de cellules immunitaires et leur capacité à présenter l'antigène aux

lymphocytes, les cellules de Kupffer participent à l'installation de l'immunité adaptative. Au cours des phénomènes inflammatoires leur nombre peut fortement augmenter.

#### 4. Les cellules étoilées du foie (HSCs) (Senoo et al., 2007; Friedman, 2008)

La première mention de cellules stellaires hépatiques (HSCs) est celle de Von Kupffer, qui a observé des cellules en forme d'étoiles périvasculaires que l'on croyait appartenir à un réseau nerveux périvasculaire. Au début des années 1970, Kenjiro Wake a conclu que les phagocytes étoilés décrits par Kupffer étaient identiques aux cellules stockant les graisses décrites par Ito. La pertinence physiologique et physiopathologique réelle des HSCs n'a émergé qu'au cours des 20 dernières années, avec la reconnaissance du rôle des cellules stellaires dans la fibrose hépatique et, plus généralement, dans la régénération hépatique. Au cours de ces nombreuses années, les HSCs ont été désignés sous différents noms tels que « lipocytes », « cellules stellaires périvasculaires » ou encore « cellules de Ito ».

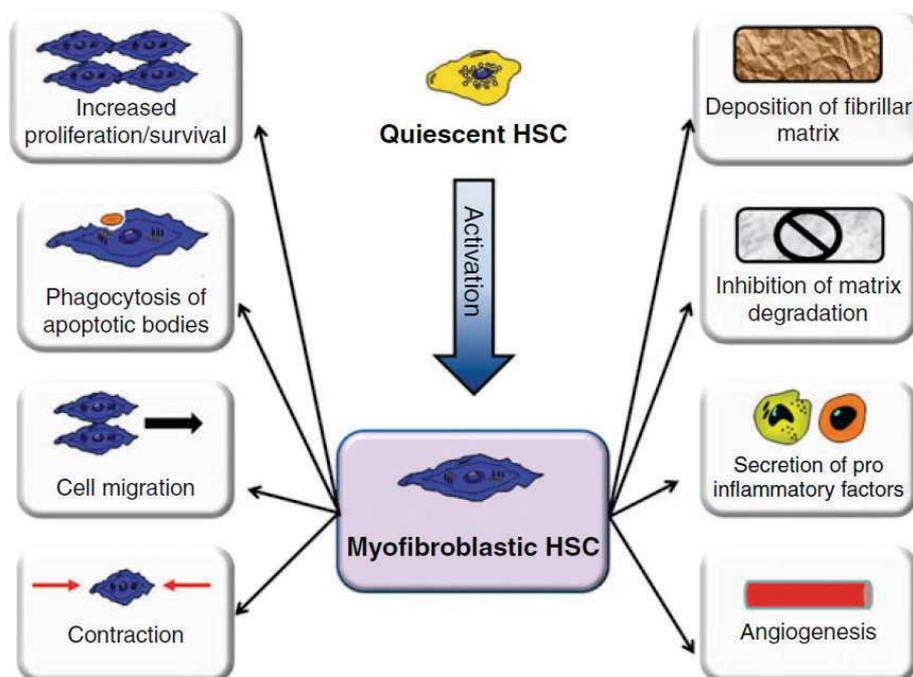


Figure 11 : Actions biologiques associées au processus d'activation des cellules étoilées du foie (Marra and Parola, 2011)

Afin de diminuer la confusion, un groupe international d'investigateurs a recommandé en 1996 de désigner ce type de cellules par « cellules étoilées du foie » (hepatic stellate cells). Les HSCs sont localisées dans l'espace de Disse en contact avec les hépatocytes et les cellules

endothéliales. Même si le nombre total de cellules étoilées constitue un faible pourcentage (entre 5 et 8%) du nombre total de cellules dans le foie, leur disposition est suffisante pour couvrir l'ensemble du réseau sinusoidal. La structure et les prolongements cytoplasmiques des HSCs assurent un encrage fort sur l'endothélium sinusoidal. Dans leur cytoplasme, les gouttelettes lipidiques contenant de la vitamine A représentent la caractéristique structurale la plus manifeste. Cette caractéristique est liée à la principale fonction physiologique connue des cellules étoilées : le stockage hépatique de la Vitamine A. Les HSCs sont équipées de microtubules et de nombreux microfilaments pouvant jouer un rôle dans la synthèse et / ou le transport des lipides. Leurs filaments semblables à l'actine, on leur confère un rôle dans la vasomotricité et dans le renfort de la muqueuse endothéliale. Les HSCs ont également un rôle important dans la synthèse, la maintenance et les modifications de la matrice extracellulaire hépatique. Après activation, elles perdent leur contenu lipidique et prennent un phénotype myofibroblastique (Figure 11). Elles peuvent alors participer activement aux processus de fibrose mais aussi aux processus inflammatoires, en sécrétant des cytokines et en recrutant les lymphocytes T dans le parenchyme.

## 5. Autres cellules

De connaissance plus récente, des lymphocytes surnommés « pit cell » et possédant des activités antitumorales de type natural killer sont également cités comme résidant du foie dans la littérature (H Peng *et al.*, 2016). La taille de leur granule et leur morphologie diffèrent des cellules NK retrouvées dans la circulation systémique. Ils sont visibles dans la lumière capillaire mais peuvent avoir des prolongements pénétrant la barrière endothéliale. Tout comme les autres cellules immunitaires, ces cellules jouent un rôle important dans les processus inflammatoires via la sécrétion de médiateurs.

## 6. Conclusion

Les différents types cellulaires qui composent le foie contribuent au maintien et à la modulation de l'homéostasie hépatique. Les états pathologiques et les perturbations cliniques associées sont ainsi souvent reliés à des problèmes de coopération cellulaire. Une meilleure compréhension des interactions entre chaque type cellulaire ouvre de nouvelles perspectives pour le diagnostic, le traitement des maladies hépatiques et la conception de modèles *in vitro* plus prédictif.

## C. Les grandes fonctions hépatiques

### 1. Métabolisme hépatique des glucides

Que ce soit en période postprandiale ou en période de jeûne, la concentration plasmatique du glucose doit être maintenue dans une fenêtre étroite. En métabolisant 25 à 30% du glucose absorbé pendant les repas, le foie tient un rôle capital dans le métabolisme du glucose. Il permet d'oxyder ce sucre, de le transformer en lipides ou de le stocker sous forme de glycogène. En dégradant le glycogène (glycogénolyse) ou en synthétisant du glucose à partir d'autres substrats (néoglucogénèse), le foie assure entre les repas, un apport d'énergie nécessaire à l'organisme (systèmes nerveux central et aux autres organes).

#### **La phase postprandiale :**

La sécrétion d'insuline est stimulée par l'ingestion de sucres lors du repas. Cette hormone hypoglycémisante produite par les îlots de Langerhans du pancréas favorise l'expression du récepteur GLUT-2 au niveau de la membrane des hépatocytes et oriente l'excès de substrats énergétiques vers le stockage. Par sa proximité avec le pancréas, la concentration d'insuline est près de 3 fois plus élevée dans le sang portal que dans le sang périphérique. Lors d'un repas riche en sucres, la concentration sinusoidale en insuline augmente de 4 à 10 fois avec comme conséquence : L'inhibition de la lipolyse, de la néoglucogénèse et de la glycogénolyse ainsi que la stimulation de la synthèse du glycogène et des triglycérides.

#### **Métabolisme des glucides entre les repas :**

Dans les conditions physiologiques comme le jeûne et l'exercice physique, une autre hormone aux effets antagonistes de l'insuline prend le relais pour maintenir la normoglycémie : le glucagon. Via l'inhibition de la synthèse de glycogène et en stimulant la néoglucogénèse et la glycogénolyse, cette molécule augmente la production hépatique de glucose. Le glucagon diminue la concentration plasmatique en acides aminés en augmentant leur captation hépatique et leur utilisation dans la néoglucogénèse. Chez un sujet de 70 kg, le tissu hépatique produit environ 10 g de glucose par heure dont près de 6 grammes destinés au système nerveux central. Le foie a la rare faculté de pouvoir produire du glucose à partir de précurseurs non glucidiques.

## 2. Métabolisme des protéines

Les protéines plasmatiques sont, soit synthétisées par le foie, soit par la moelle osseuse (immunoglobulines). Que ce soit dans les domaines du transport cellulaire, de l'hémostase, de la réponse inflammatoire et immunitaire, le tissu hépatique participe activement à la production de protéines essentielles à l'organisme.

L'albumine produite par les hépatocytes est la protéine la plus abondante dans le plasma (35–45 g/L). Elle participe au transport des molécules endogènes ou exogènes et au maintien de la pression artérielle. Dans de prochains chapitres, nous reviendrons plus longuement sur cette protéine très impliquée en pharmacocinétique pour sa capacité à se lier aux médicaments. Les apolipoprotéines A, B, C et E, impliquées dans le transport des lipides et les transporteurs des hormones stéroïdiennes tels que la SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin) sont aussi produites au niveau hépatique.

La plupart des facteurs de coagulation (dont le fibrinogène et le complexe prothrombinique), les lipoprotéines plasmatiques (HDL, LDL) et les protéines responsables du métabolisme du fer comme la transferrine et la ferritine sont également issus du foie. En réponse à une inflammation, le foie synthétise les protéines de phase aiguë incluant la protéine C-réactive (CRP), sérum amyloïde A, alpha 2-macroglobulin ( $\alpha$ 2-MG) et certaines globulines. De plus, le foie produit des facteurs de croissance comme l'érythropoïétine et la thrombopoïétine qui sont des hormones permettant de stimuler la formation des précurseurs des hématies et des thrombocytes.

Le tissu hépatique est également le lieu du catabolisme protidique et du métabolisme des acides aminés. En transformant les acides aminés en corps cétoniques, le foie et l'intestin génèrent de l'ammoniaque qui s'avère toxique lorsqu'il se retrouve sous forme libre dans le sang. Les hépatocytes vont permettre d'éliminer ce métabolite toxique en le transformant en urée. Ceci via la combinaison de deux molécules d'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) avec une molécule de  $\text{CO}_2$  durant le cycle de l'urée.

### 3. Métabolisme des lipides

Les acides gras hépatiques proviennent de l'alimentation mais peuvent également être synthétisés par le foie lorsque l'apport en glucides (principalement du glucose) est important. En se liant au glycérol-phosphate (triglycérides) ou au cholestérol, les acides gras peuvent former des esters qui sont stockés dans l'hépatocyte ou sont libérés dans la circulation sous forme de « very low density lipoprotein » (VLDL). Maillons importants des phospholipides, les acides gras sont ainsi présents dans de nombreuses membranes biologiques. En absence de glucose, l'énergie cellulaire résulte principalement de l'oxydation des acides gras et des corps cétoniques dans la mitochondrie. Via la  $\beta$ -oxydation, le catabolisme des acides gras permet de produire de l'acétyl-CoA (précurseur d'ATP et base de la synthèse des corps cétoniques) et des nucléotides réduits FADH<sub>2</sub> (Flavine adénine dinucléotide dihydrogène) et NADH (nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné).

### 4. Fonction biliaire

La bile est un liquide légèrement alcalin composé essentiellement d'eau, d'acides biliaires, de cholestérol et de pigments biliaires. Elle est fabriquée de manière continue au niveau de l'hépatocyte. Les sels biliaires formés à partir d'acides aminés, tels que la taurine et la glycine, et le cholestérol formé lui, à partir d'acides gras, sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique lisse. Les pigments biliaires proviennent quant à eux de la bilirubine qui est l'élément de dégradation de l'hémoglobine.

Ces composés, une fois synthétisés, sont acheminés vers le pôle apical de la cellule afin d'y être déversés dans les canalicules biliaires en direction des canaux biliaires. Après stimulus hormonal par libération de cholécystokinine (CCK), il y a ouverture du sphincter d'Oddi et contraction de la vésicule biliaire qui déverse son contenu via le canal du cholédoque dans le duédonum. La bile participe ainsi à l'émulsion des triglycérides alimentaires et favorise l'absorption des nutriments.

## 5. Fonction de stockage

Le foie est un organe impliqué dans le métabolisme et le stockage de vitamines liposolubles telles que la vitamine A (contenue dans les cellules de Ito) et la vitamine E. La vitamine D est activée de façon primaire au niveau du foie alors que la vitamine K est utilisée pour la synthèse de prothrombine et autres facteurs de coagulation. Enfin, la vitamine B12, l'acide folique et le fer (cellules de Kupffer) sont également stockés par le foie.

## 6. Fonction de détoxification

Outre l'élimination de l'ammoniaque (produit de dégradation des acides aminés par les cellules) sous forme d'urée, l'hépatocyte permet également de détoxifier l'organisme de substances de différentes natures. En effet, par des cascades de réactions enzymatiques d'oxydation, de méthylation, d'acétylation et de conjugaison, les composés liposolubles d'origine endogène (pigments biliaires, bilirubine, stéroïdes, hormones, ...) et/ou exogène (xénobiotiques, polluants, pesticides, ...) sont rendus plus hydrosolubles afin de faciliter leur élimination de l'organisme via les urines, la bile et les fèces. La biotransformation des xénobiotiques qui fait partie intégrante de la clairance métabolique sera traitée plus en détail le prochain chapitre consacré à la pharmacocinétique.

### D. Zonation métabolique

Les nombreuses fonctions du foie sont modulées par une propriété hépatique remarquable appelée zonation fonctionnelle. Les hépatocytes présentent en effet des fonctions métaboliques qui diffèrent en fonction de leur localisation. Ainsi, les hépatocytes situés proche de l'espace porte n'ont, par exemple, pas les mêmes fonctions que ceux situés en région centrolobulaire. Les hépatocytes de la zone 1 (Figure 12) assurent principalement la gluconéogenèse, la formation d'urée et la  $\beta$ -oxydation des lipides. Les hépatocytes péricentraux sont principalement impliqués dans la glycolyse, la synthèse de glutamine, la liponéogenèse et la détoxification. Ces différences fonctionnelles s'accompagnent d'une expression zonale des enzymes. Des études histochimiques réalisées sur des tissus hépatiques

de rongeurs (Braeuning *et al.*, 2006; Hailfinger *et al.*, 2006) et dans des échantillons de foie ou d'hépatoblastomes humains (Schmidt *et al.*, 2011) ont montré que les CYP2E1, CYP1A2, la cytochrome P450 réductase (POR), CAR et AhR sont principalement exprimés dans la zone 3 du lobule hépatique (Figure 12). L'expression zonale de ces différentes molécules est régulée par la direction du flux sanguin, les gradients d'oxygène ou de molécules circulantes (Jungermann and Kietzmann, 1996) et par la composition de la matrice extracellulaire (Reid *et al.*, 1992). D'un point de vue moléculaire, la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et la protéine APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) ont récemment été identifiés comme les principaux régulateurs de cette zonation fonctionnelle (Benhamouche *et al.*, 2006). Le glucagon semble également contrôler l'expression des gènes et la zonation métabolique dans le foie en contrant l'action de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (Cheng *et al.*, 2018).

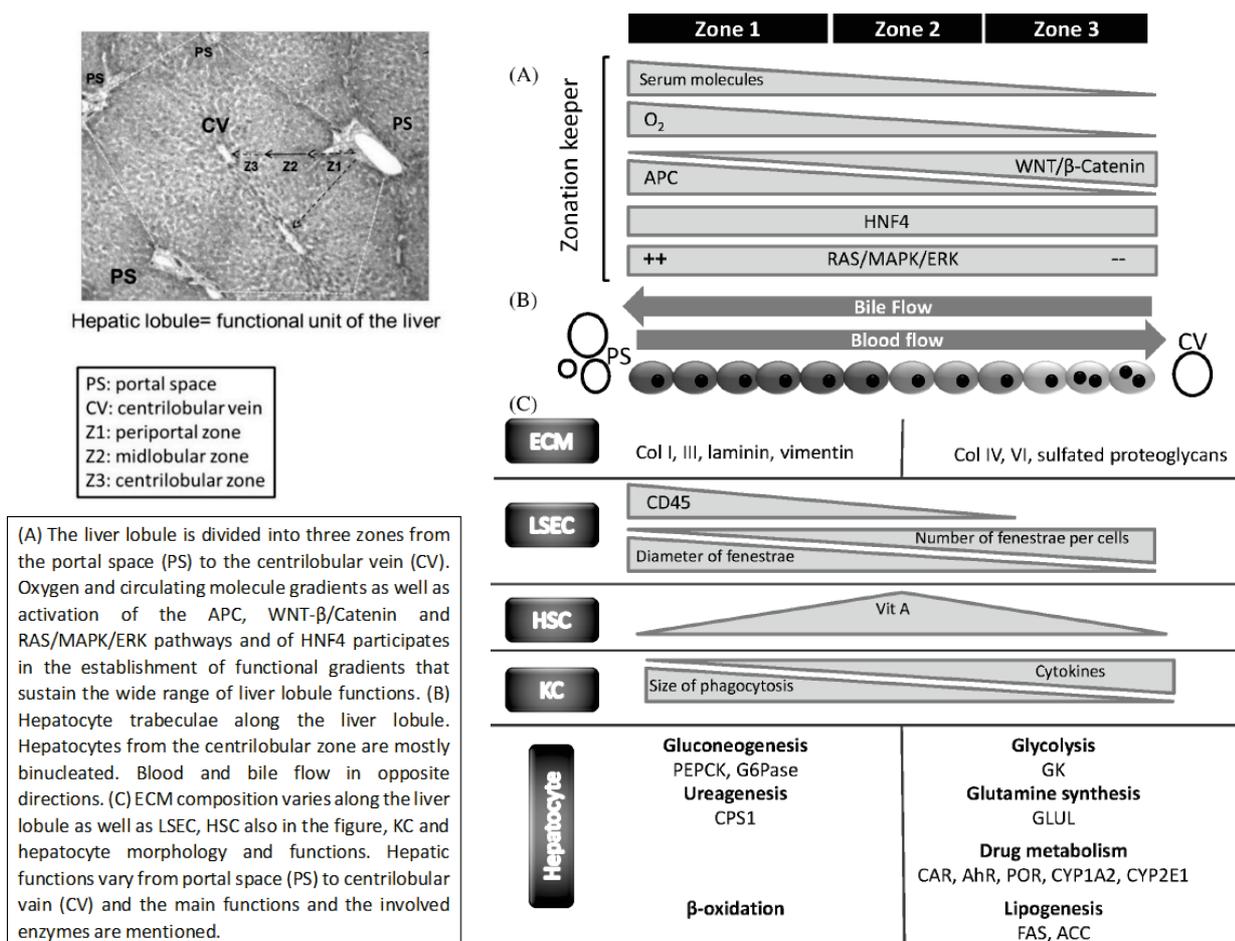


Figure 12 : Représentation schématique de la zonation métabolique au sein des lobules hépatiques source : Herrero *et al.*, 2014

## E. La stéatopathie hépatique non-alcoolique

Le foie peut être confronté à de nombreuses pathologies dont :

- La fibrose et la cirrhose hépatiques (d'origine alcoolique ou non)
- La stéatose
- Les hépatites virales (notamment les virus de l'hépatite A, B ou C)
- Les hépatites médicamenteuses
- L'hépatite fulminante
- Les cancers du foie
- Les pathologies des voies biliaires

Les atteintes du foie et des voies biliaires peuvent se traduire par une diminution des capacités anaboliques (synthèse des protéines plasmatiques, facteurs de coagulation...) et une altération des fonctions de détoxification comme par exemple la biotransformation des médicaments.

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD « Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ») est la principale cause de maladie hépatique dans le monde, avec une prévalence globale estimée à 25%. Au cours de ces dernières décennies, les habitudes alimentaires ont évolué vers une alimentation plus riche en graisse et en sucre. Cette évolution n'est pas sans conséquences sur la santé publique et les cas de diabète et d'obésité ne cessent d'augmenter. L'émergence de maladies hépatiques telles que la NAFLD est inquiétante, le nombre de diagnostics a doublé en moins de 20 ans (Loomba and Sanyal, 2013). La NAFLD se caractérise par une accumulation de triglycérides (Figure 13), sous la forme de gouttelettes lipidiques à l'intérieur de plus de 5 % des hépatocytes (Bedossa, 2013).

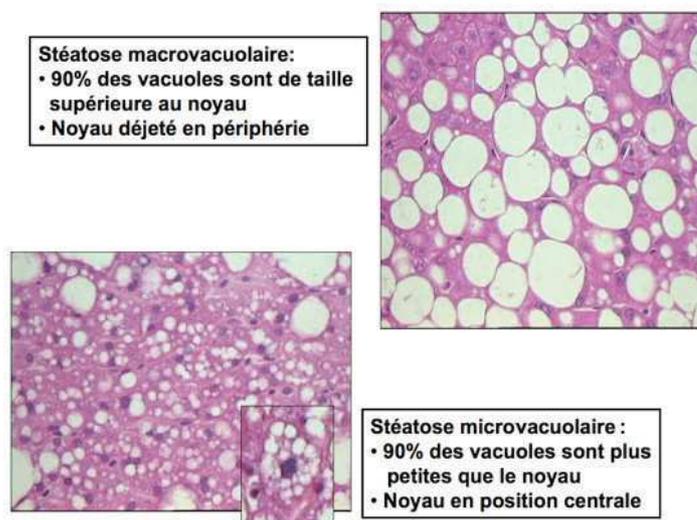


Figure 13 : Analyse histologique de deux biopsies dérivant la stéatose macrovacuolaire et microvacuolaire. 33

Source : <http://www.centre-hepato-biliaire.org>

La stéatose peut également être d'origine virale, ou induite par une consommation excessive d'alcool mais on s'intéressera seulement à la NAFLD. Cette dernière est associée au syndrome métabolique, caractérisé par une prise de poids excessive et une résistance à l'insuline (Koo, 2013). La stéatose est une pathologie asymptomatique et réversible mais qui est également susceptible d'évoluer vers la stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Chez environ 1/3 des patients, la NASH évolue à travers différents stades de la fibrose vers la cirrhose. Elle favorise également l'apparition de Carcinome hépatocellulaire (Figure 14).

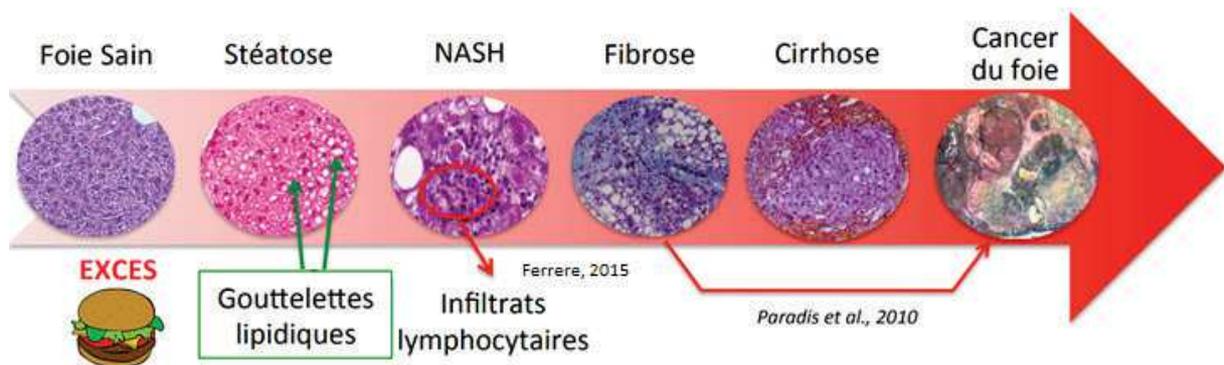


Figure 14 : Les différents stades de la NAFLD (Ferrere, 2015)

La NASH est complexe à diagnostiquer car c'est une pathologie dont la définition est histologique. L'analyse de la biopsie hépatique met en évidence une stéatose accompagnée par des lésions d'hépatite : ballonisation, nécrose, inflammation et corps de Mallory (Teresa Maria Antonini, 2016).

En 2018, il n'y a pas encore de médicaments approuvés contre la NASH. Le traitement actuel est ainsi basé sur le contrôle de chacun des facteurs de risque métabolique :

- Limiter le surpoids, favoriser l'exercice physique et le régime (la chirurgie bariatrique dans les cas plus difficiles)
- Combattre l'insulino-résistance par la prescription de médicaments qui améliorent la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline (metformine, glitazones...)

Les experts estiment que 21 % des Américains atteints de NAFLD ont une NASH, ce qui équivaut à 3 à 4 % de la population totale des États-Unis (Younossi *et al.*, 2016). Des traitements visant à combattre la NASH sont actuellement en phases cliniques mais les programmes de recherche souffrent globalement d'un manque de modèles *in vitro* efficaces

pour étudier ces pathologies. Nous reviendrons sur cette problématique dans le dernier article de ce manuscrit.

## II. Etude du devenir des médicaments dans l'organisme

Parmi les étapes de développement d'un médicament, les études de pharmacocinétique visent à décrire le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant. Les informations acquises au cours de ces études apportent de précieuses informations qui accompagnent et conditionnent le choix de la posologie future ainsi que les voies d'administration à adopter. La clairance métabolique que nous allons étudier dans cette thèse intègre une des 4 grandes étapes « ADME » de la pharmacocinétique d'un médicament : Adsorption, Distribution, Métabolisme et élimination.

### 1. Absorption

L'absorption est le processus par lequel le médicament inchangé passe de son site d'administration à la circulation générale. La forme galénique et la voie d'administration ont une grande influence sur cette première phase. Contrairement à la voie intra-veineuse (IV) où toute la dose administrée atteint la circulation générale, l'absorption des médicaments après une administration par voie orale (*per os*) est limitée par un certain nombre de mécanismes.

À l'exception de la voie I.V, l'absorption est en effet limitée par le passage de membranes épithéliales lipoprotéiques comme la muqueuse buccale, gastro-intestinale, pulmonaire ou la peau. Un médicament administré *per os* doit pouvoir se dissoudre dans le milieu gastro-intestinal et ne pas être détruit par l'acidité des sécrétions gastriques ou par les enzymes contenues dans la lumière intestinale. La dissolution du médicament se fait plus ou moins rapidement selon l'hydrosolubilité des médicaments et la formulation galénique. Une fois cette dissolution obtenue, le médicament passe la barrière digestive principalement par diffusion passive ou par phénomène de transport actif.

Les propriétés physico-chimiques des nouvelles entités chimiques sont déterminées assez tôt pour essayer de prédire la capacité du composé à être absorbé. La solubilité, le pKa, la

lipophilie et la perméabilité sont en effet des paramètres très importants dans le processus d'absorption.

Le système de classification biopharmaceutique (BCS) est un cadre scientifique proposé par Amidon *et al.* en 1995 puis préconisé par la FDA pour classer les substances médicamenteuses en fonction de leur solubilité aqueuse et de leur perméabilité intestinale. Combiné à la dissolution du produit médicamenteux, le système BCS est un outil utile pour la prédiction de l'absorption intestinale des médicaments. En 2005, Wu et Benet ont proposé une amélioration en ajoutant un 3<sup>ème</sup> facteur lié au métabolisme et aux transporteurs. Les substances médicamenteuses sont classées selon les quatre catégories suivantes (Wu and Benet, 2005) :

	High Solubility	Low Solubility
High Permeability/ Metabolism	<b>Class 1</b> Transporter effects minimal in gut and liver	<b>Class 2</b> Efflux transporter effects predominate in gut, but both uptake & efflux transporters can affect liver
Low Permeability/ Metabolism	<b>Class 3</b> Absorptive transporter effects predominate (but can be modulated by efflux transporters)	<b>Class 4</b> Absorptive and efflux transporter effects could be important

Figure 15 : Classification BDDCS (Biopharmaceutical Drug Disposition Classification System)

La classe 1 est la plus favorable pour espérer obtenir une bonne absorption et la classe 4 la plus défavorable (Figure 15). Cette classification aide les professionnels à situer leurs produits et à orienter le développement chimique ou galénique en conséquence. Une substance médicamenteuse est considérée comme « très soluble » lorsque la plus forte dose clinique est soluble dans 250 mL ou moins de milieu aqueux, dans une gamme de pH de 1 à 7,5 à 37°C. Une substance médicamenteuse est considérée comme « hautement perméable » lorsque l'absorption (chez l'homme) est supérieure à 90% de la dose administrée. La perméabilité peut être déterminée de plusieurs façons, mais est le plus souvent effectuée à l'aide de la lignée Caco-2. La phase d'absorption se caractérise par un paramètre pharmacocinétique appelé Biodisponibilité du principe actif, qui est le pourcentage de molécule administrée atteignant effectivement la circulation générale. Ce paramètre rend compte des phénomènes de

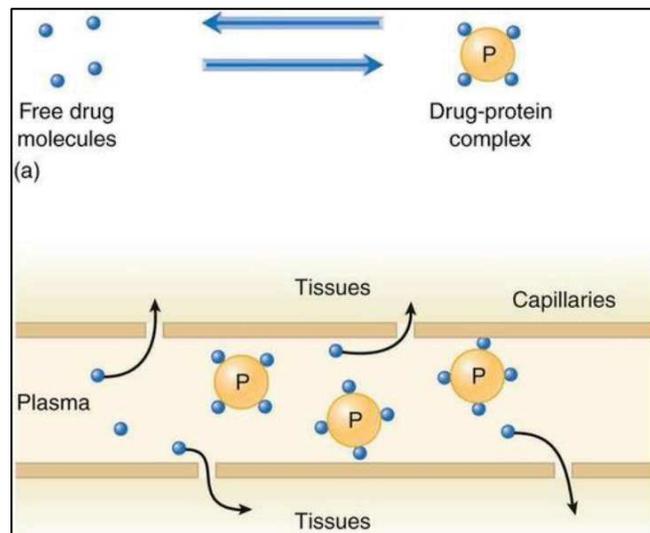
résorption trans-membranaires et de premiers passages digestif ou et/ou hépatique. La biodisponibilité d'une voie IV est de 100 %, la biodisponibilité des formes orales peut varier de 5 % à 100 % en fonction des paramètres de résorption digestive et du poids du premier passage hépatique ou digestif.

## 2. Distribution

Après avoir atteint la circulation générale, le médicament est distribué dans les différents tissus de l'organisme. La distribution d'un composé au sein de l'organisme est le plus souvent hétérogène car elle dépend des caractéristiques propres à chaque tissu : débit sanguin, affinité de la molécule pour le tissu, perméabilité des membranes cellulaires, pH local... Dans la circulation générale, le principe actif va pouvoir y être transporté et interagir avec les constituants sanguins. On y retrouve notamment les protéines plasmatiques dont certaines ont la propriété de fixer des substances endogènes (hormones, lipides, bilirubine...) mais également des produits exogènes comme les xénobiotiques.

Le médicament peut alors se présenter sous deux formes dans le plasma :

- La forme libre qui permet au principe actif de diffuser librement jusqu'au site d'action. Seule cette forme sera active pharmacologiquement.
- La forme liée aux protéines plasmatiques où le principe actif sera inapte à diffuser jusqu'à la cible. C'est une forme de stockage ou de transport entraînant une perte temporaire de l'action pharmacologique.



Cette théorie où seule la fraction plasmatisque libre est diffusible, active et éliminable est remise en question par de nouvelles hypothèses physiologiques que nous challengerons au cours de nos expérimentations.

Tout comme la clairance, la liaison aux protéines plasmatiques est l'un des paramètres les plus fondamentaux du métabolisme et de la pharmacocinétique des médicaments (DMPK). La mesure de la fraction libre (fup) est en effet utilisée pour établir les relations PK/PD, prédire des phénomènes importants tels que les interactions médicamenteuses et la clairance mais aussi pour évaluer la toxicité des candidats médicament (Smith *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). Différentes protéines sériques sont capables de fixer les xénobiotiques. On peut citer les lipoprotéines (LDL, HDL, VHDL), les  $\gamma$  globulines mais l'alpha-1-glycoprotéine acide (AAG) et l'albumine sont les deux protéines les plus impliquées dans la fixation des médicaments. Le complexe médicament-protéines est caractérisé par sa constante d'affinité, le nombre de sites de fixation et le taux de médicament fixé (en %). Les interactions avec les protéines plasmatiques dépendent en partie des caractéristiques acido-basiques des médicaments. Les médicaments acides et liposolubles se fixent préférentiellement sur l'albumine tandis que l'AAG fixe plutôt les médicaments basiques.

Les composés liés à plus de 99.9 % aux protéines plasmatiques sont fréquents ce qui complique parfois la détermination expérimentale du fup. Les méthodes pour mesurer la fraction libre plasmatique sont nombreuses. Les plus utilisées sont la dialyse à l'équilibre, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation (Bohnert and Gan, 2013; Bohnert and Gan, 2013; Di *et al.*, 2017). Le lien entre le fup et la clairance est une notion centrale dans ce projet de thèse et va être détaillé tout au long de ce manuscrit.

Outre le fup, le volume de distribution (Vd) peut aussi être calculé pour estimer la façon dont la molécule se distribue dans l'organisme. Ainsi, plus le volume apparent de distribution est important, plus la molécule aura tendance à quitter le flux vasculaire pour diffuser dans l'organisme, augmentant la chance que le tissu cible soit exposé au principe actif (Smith *et al.*, 2010). Certains organes tel le cerveau sont toutefois protégés des molécules exogènes potentiellement toxiques par des structures spécifiques telle la barrière hémato-encéphalique. Ces structures compliquent l'accès des médicaments aux récepteurs ce qui peut nuire à l'efficacité du traitement.

Le volume de distribution reste un volume fictif et n'est en aucun cas une valeur physiologique. Il reste très utilisé car il offre un reflet de la distribution d'une substance dans l'organisme. Comme de nombreux paramètres pharmacocinétiques, le Vd dépend des

caractéristiques physico-chimiques (solubilité, charge, taille, etc.) et de la manière dont la molécule réagit avec les différents composants de l'organisme (lipides, tissus, protéines etc.).

### 3. Métabolisme

#### *a) Introduction*

Le métabolisme s'opère dans différents organes tels que les poumons, les reins, les intestins ou encore dans des tissus comme la peau ou la barrière hémato-encéphalique. Néanmoins, les différents systèmes enzymatiques responsables du métabolisme des xénobiotiques se situent principalement au niveau du foie. Les hépatocytes contiennent en effet une importante variété et quantité d'enzymes engagées dans la transformation des médicaments. A l'échelle cellulaire, les enzymes responsables de la détoxification sont principalement localisées dans le réticulum endoplasmique (enzymes microsomales) et dans le cytosol (enzymes cytosoliques).

La biotransformation représente l'ensemble des réactions biochimiques que subissent les substances exogènes (et endogènes) et qui ont pour effet de diminuer leur lipophilie en augmentant leur polarité et ainsi favoriser leur élimination. Dans la grande majorité des cas, les résultats de cette biotransformation mènent à un produit dont l'activité pharmacologique est réduite. Néanmoins dans certains cas, ces réactions génèrent des métabolites plus réactifs que le produit parent (phénomène de bioactivation), aux effets toxicologiques importants voire néfastes (carcinogénèse, tératogénèse, nécrose hépatique, réaction auto-immune, ...). Dans d'autres cas, plus favorables, l'activation biologique peut générer un métabolite plus actif que le produit parent. C'est notamment le cas des pro-drogues qui génèrent le produit actif (drogue) par métabolisation (exemple : le parécoxib inactif est hydrolysé en son métabolite actif, le valdécoxib, utilisé en postopératoire dans le traitement de la douleur).

#### *b) Les enzymes impliquées dans le métabolisme*

La biotransformation peut être divisée en deux phases : la phase I et la phase II. Le métabolisme de phase I met en jeu des réactions de fonctionnalisation de type oxygénation,

réduction, déhalogénéation ou hydrolyse, qui ont pour but de greffer à la molécule un nouveau groupement fonctionnel la rendant plus hydrophile et donc plus facilement excrétable. Les enzymes de phase I les plus importantes sont les cytochromes à P450 (CYP) (Zanger and Schwab, 2013) et les flavines à mono oxygénase (FMO).

Le métabolisme de phase II (réactions de conjugaison) consiste à greffer une petite molécule endogène polaire (acide glucuronique, glutathion, sulfate, glycine au des acides aminés) soit directement sur le xénobiotique soit sur un métabolite "fonctionnalisé" généré durant la phase I, de manière à augmenter son caractère polaire et faciliter son élimination par les voies biliaires et rénales. Les réactions de conjugaison sont principalement catalysées par les UDP-glucuronosyl-transférases (UGT), les sulfo-transférases (SULT) et les glutathion-S-transférases (GST) (Yang *et al.*, 2017). Un composé peut être métabolisé par l'une ou l'autre de ces voies métaboliques ou par les deux de manière séquentielle. Quand l'entrée du composé dans la cellule nécessite des transporteurs membranaires actifs dits « d'uptake » on parle de phase 0 du métabolisme. A l'inverse, quand l'élimination des métabolites ou leur excrétion requiert un transporteur, on parle de métabolisme de phase III. Le tableau suivant présente les principales enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et leur localisation cellulaire :

	Enzymes	Localisation cellulaire
<b>Oxydation - Réduction</b>	Cytochrome P450	Réticulum endoplasmique
	Flavine à mono oxygénase	Réticulum endoplasmique
	Peroxydase	Cytosol
	Monoamine oxydase	Mitochondrie
	Alcool déshydrogénase	Cytosol
	Aldéhyde déshydrogénase	Cytosol & Mitochondrie
	Aldo-céto réductase	Cytosol
	Xanthine déshydrogénase	Cytosol
	Aldéhyde oxydase	Cytosol
<b>Hydrolyse</b>	Estérase	Cytosol, Réticulum endoplasmique, mitochondrie
	Amidase	Cytosol, Réticulum endoplasmique, mitochondrie
	Epoxyde hydrolase	Réticulum endoplasmique, cytosol
	Dipeptidase	Réticulum endoplasmique
<b>Enzyme de conjugaison</b>	Glutathion-S-transférase	Cytosol
	Sulfotransférase	Cytosol
	Acétyltransférase	Cytosol
	UDP-Glucuronosyltransférase	Réticulum endoplasmique
	Méthyltransférase	Réticulum endoplasmique, cytosol
	Conjugaison aux acides aminés (Glycine, taurine,...)	Mitochondrie
	Aminoacyl-transférase	Réticulum endoplasmique

(1) Les enzymes de phases 1 :

Parmi les enzymes de phase I, les systèmes les plus étudiés et les plus importantes sont les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450 ou CYP). Ces systèmes enzymatiques catalysent un grand nombre de réactions et présentent un très large spectre de substrats d'origines endogène et exogène (Zanger and Schwab, 2013). Elles présentent une très haute spécificité envers les substrats de nature endogène et interviennent notamment dans le métabolisme oxydatif des stéroïdes, des acides gras, des leukotriènes et des prostaglandines. A l'inverse, ces enzymes présentent une très faible spécificité vis-à-vis des substrats exogènes ce qui leur confère leur rôle si déterminant dans la détoxification de l'organisme. D'autres enzymes, moins importantes que les cytochromes P450, peuvent également être impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Parmi celles-ci, on peut citer les alcools et aldéhydes déshydrogénases, les flavines à monooxygénase ou encore les amines oxydases.

Chez l'homme, il existe une cinquantaine de CYP450. Cependant quatre isoenzymes assurent le métabolisme de la plupart des médicaments. Il s'agit des CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 et CYP1A2 qui métabolisent près de 90 % des médicaments couramment utilisés (Figure 16).

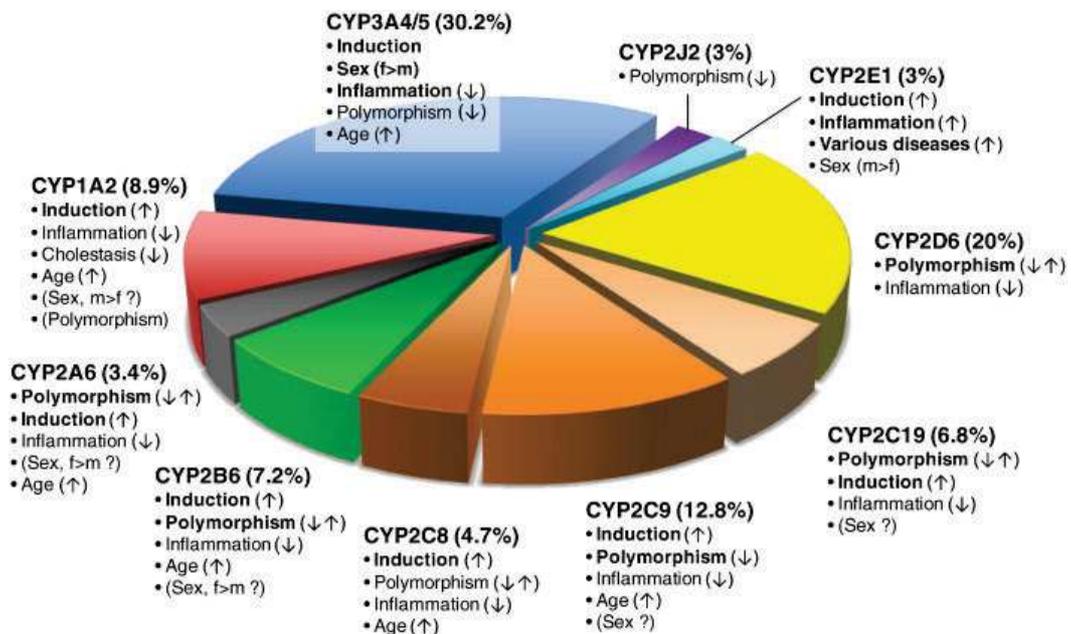


Figure 16 : Contribution (en %) des isoformes de CYP450 dans la métabolisation des médicaments et facteurs influençant la variabilité (Zanger et Schwab, 2013)

Dans le foie, les proportions des différents CYP sont soumises à une forte variabilité interindividuelle, le cumul des CYP3A4/5 varie entre 20 et 50 %, le cumul des CYP2C8/9 entre 10 et 30 %, le CYP2D6 entre 2 et 6 %, le CYP2C19 entre 1 et 10 %, le CYP1A2 entre 1 et 13% et les CYP2E1 et 2A6 à 7 %. La contribution d'une isoforme dans la métabolisation est indépendante de son abondance dans le foie. En effet, nous pouvons voir que le CYP2D6 qui ne représente en moyenne que 4 % des cytochromes totaux, contribue pour près de 20 % dans le métabolisme des xénobiotiques (Guéguen *et al.*, 2006).

D'un point de vue structural, les CYP sont des complexes enzymatiques membranaires essentiellement localisés dans le réticulum endoplasmique lisse (REL) des cellules du foie. Ces enzymes insérées dans la membrane par un peptide N-terminal et la majeure partie de la molécule est située du côté cytosolique. Ce sont des hémoprotéines d'un poids moléculaire d'environ 50 kDa qui comportent un hème et qui nécessitent du NADPH pour fonctionner.

## (2) Les enzymes de phases 2

Les réactions de phase II, principalement catalysées par les transférases ont pour but de fixer un composé endogène de petite taille (acide glucuronique, glutathion, ion sulfate ou acétate, un groupement méthyle ou encore la glycine), soit directement sur le médicament, soit sur un métabolite issu de la phase I, dite de fonctionnalisation. Ces réactions permettent d'augmenter le caractère hydrophile du composé. L'efficacité pharmacologique, à certaines exceptions près, est perdue et le métabolite peut être excrété sous forme conjuguée via la bile ou les urines. Le tableau suivant liste les principales enzymes de phase II, leur localisation tissulaire, leur co-facteur respectif ainsi que quelques-uns des substrats connus :

Enzyme	Co-facteur	Localisation	Réaction
UGT (UDP-glucuronosyl-transférase)	UDPGA (acide UDP- glucuronique)	Foie, rein, intestin, poumon, peau, prostate, cerveau	Glucurono-conjugaison
GST (Glutathion-S-transférase)	Glutathion	Foie, rein	Conjugaison au glutathion
SULT (Sulfo-transférase)	PAPS (3'-phosphoadénosine-5' phosphosulfate)	Foie, rein, intestin	Sulfo-conjugaison
MT (Méthyl-transférase)	SAM (S-adénosyl-L-méthionine)	Foie, rein, poumon, SNC	Méthylation
NAT (N-acétyl-transférase)	Acétyl coenzyme A	Foie, poumon, rate, muqueuse gastrique, lymphocytes	N-acétylation

Pendant longtemps les enzymes de phases II ont été bien moins étudiées que les CYP450s, mais différents travaux menés récemment ont permis de montrer leur implication de plus en plus importante dans le métabolisme des xénobiotiques (Picard *et al.*, 2005). Cela s'explique par l'effort de l'industrie pharmaceutique à synthétiser des nouvelles molécules capables d'être métabolisées par différentes enzymes afin de limiter les risques d'interactions médicamenteuses (DDI). Aujourd'hui, l'étude des UGTs est fortement conseillée par les autorités réglementaires pour le développement de nouveaux médicaments car il est possible d'avoir comme pour les CYPs des interactions médicamenteuses, des variabilités inter-individuelles de réponse aux médicaments et des effets secondaires dûs à l'activité de ces enzymes.

### (3) La phase 3

Il est admis que la phase III comprend essentiellement des protéines de transport exprimées de façon polarisée dans un grand nombre de tissus comme le foie, le rein, l'intestin ou le cerveau où elles jouent un rôle important dans la pénétration des xénobiotiques et autres composés dans l'organisme. Leur fonction est primordiale dans les processus d'absorption, de distribution et d'excrétion (Kim, 2003; Staudinger *et al.*, 2003; Williamson and Riley, 2017).

Les transporteurs appartiennent à deux grandes familles : les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et la famille des "solute carriers" (SLC) (Figure 17).

L'exportation vers l'espace canaliculaire est assurée par plusieurs transporteurs de la membrane apicale appartenant à la superfamille ABC. Ces transporteurs requièrent de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Mizuno *et al.*, 2003). Ils importent et exportent un très grand nombre de composés à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule et présentent une très large spécificité de substrat : acides aminés, sucres, ions, lipides et molécules thérapeutiques.

Une cinquantaine de transporteurs ABC ont été identifiés à ce jour (Wlcek and Stieger, 2014) chez l'homme. Parmi les principaux, on trouve la P-glycoprotéine ou MDR1 (Pgp ou "multidrug resistance 1") encore nommée ABCB1, (Brinkmann and Eichelbaum, 2001) qui transporte les cations organiques (colchicine, cyclosporine, doxorubicine, tamoxifène, tacrolimus...), BSEP

("bile salt export pump"), principal transporteur des acides biliaires, MDR3 ("multidrug resistance 3 P-glycoprotein"), responsable du transport des phospholipides et la sous-famille des MRP ("multidrug resistance associated protein") (Kerb *et al.*, 2001). Ces dernières incluent des protéines classées de 1 à 9. MRP1 et MRP3 sont localisées du côté basolatéral des cellules polarisées alors que MRP2 se situe plutôt du côté apical de ces cellules. MRP2 contribue donc à l'excrétion biliaire des composés au niveau du foie alors que MRP1 et MRP3 participent plutôt à l'excrétion de composés dans le sang pour une élimination urinaire.

Les transporteurs de la famille des "solute carriers" sont localisés dans la membrane sinusoïdale des hépatocytes. Ils comprennent le NTCP ("Na<sup>+</sup>-taurocholate cotransporting polypeptide"), qui assure la capture hépatocytaire des acides biliaires, et différents membres de la famille des OATP ["organic anion transporting polypeptides" (Tirona and Kim, 2002). Les OATP transportent un grand nombre de composés endogènes et exogènes tels que la bilirubine sous forme conjuguée et libre, des stéroïdes conjugués, des composés neutres, des cations organiques de type II ou des acides biliaires. Ils sont localisés sur la face sinusoïdale des cellules (Chu *et al.*, 2013).

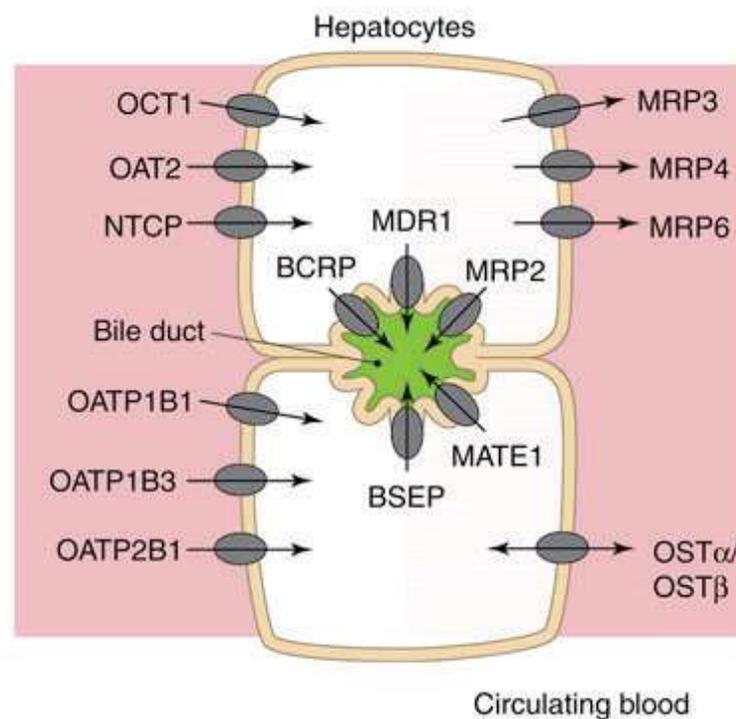


Figure 17 : Localisation membranaire des transporteurs importants en DMPK et susceptibles d'influer sur les concentrations intracellulaires des hépatocytes (Chu *et al.*, 2013)

#### 4. Elimination

L'ultime étape des phases ADME est l'élimination du composé de l'organisme. Le processus d'excrétion concerne la molécule sous forme inchangée et/ou ses métabolites. En plus de les métaboliser, le foie peut participer à l'élimination des médicaments via le système biliaire. Après excrétion dans la bile, les composés se retrouvent dans l'intestin où ils peuvent être définitivement éliminés mais aussi réabsorbés : c'est le cycle entéro-hépatique.

Les médicaments sont également éliminés par les voies urinaires. Au niveau rénal, les médicaments passent du sang dans l'urine par deux processus différents :

- La filtration glomérulaire : la plupart des médicaments et leurs métabolites ont une faible masse molaire qui leur permet d'être filtrés par le glomérule. Le fup a également un impact sur cette voie d'élimination car seule la fraction libre pourra être filtrée. Une fois dans l'urine certains médicaments peuvent subir une réabsorption de l'urine vers le sang par diffusion passive. Ce phénomène de réabsorption tubulaire est influencé par le degré d'ionisation de la molécule et peut limiter l'excrétion rénale des médicaments.
- La sécrétion tubulaire (moins fréquente) : certains composés (ex : pénicillines, metformine) peuvent être sécrétés dans le tube contourné proximal par des systèmes de transport actif qui utilisent de l'énergie. Ils sont saturables et une compétition peut s'exercer entre différentes molécules. L'élimination de la pénicilline est par exemple retardée par la co-administration de probénécide.

La contribution des poumons, de l'intestin, de la salive, l'air expiré, les larmes et de la sueur pour l'excrétion est possible mais habituellement négligeable par rapport aux voies biliaire et urinaire. Le passage du médicament dans le lait maternel est tout aussi rare mais est important à connaître pour éviter les risques d'intoxication chez le nouveau-né.

La parfaite connaissance des voies et processus impliqués dans l'élimination d'un médicament peut aider à faire face à des cas de surdosages ou être mise à profit à des fins thérapeutiques. Pour augmenter ou diminuer la réabsorption tubulaire, il est par exemple possible de modifier l'état d'ionisation d'un composé en acidifiant ou alcalinisant les urines. Des inhibiteurs peuvent aussi être utilisés pour bloquer les transporteurs actifs impliqués dans la sécrétion tubulaire et prolonger l'effet d'un médicament en maintenant des concentrations plus élevées.

### III. La clairance

Le concept de clairance a été introduit dans les années 1970 par Gillette (1971), Rowland et al. (1973), et Wilkinson et Shand (1975). Comme le décrit élégamment Benet (2010) en hommage au Dr Rowland pour ses contributions dans ce domaine, de nombreuses observations expérimentales ne pouvaient pas être expliquées par les théories pharmacocinétiques qui prévalaient encore au début des années 1970. Avant l'introduction des concepts de clairance, le comportement pharmacocinétique des médicaments était en effet décrit par des relations mathématiques très complexes sans lien évident avec la physiologie. L'introduction des concepts a rapidement suscité de l'engouement car il y avait enfin une relation entre la clairance des organes et les paramètres physiologiques, tels que la fraction libre plasmatique ( $f_{up}$ ), la capacité intrinsèque de l'organe à éliminer le médicament ( $CL_{int}$ ) et le débit sanguin de l'organe ( $Q$ ). Depuis les années 1970, les concepts de clairance ont été largement utilisés dans la littérature pour expliquer le comportement pharmacocinétique de nombreux médicaments. L'étude de l'impact de l'âge, des voies d'administrations, des interactions médicamenteuses ou de certaines pathologies sur la pharmacocinétique des médicaments a été facilitée par ces nouveaux concepts.

#### A. Concepts fondamentaux liés à la clairance

##### a) Définition

Les deux principaux organes d'élimination sont le foie (métabolisme et excrétion biliaire du médicament) et les reins (excrétion de médicaments inchangés et/ou de leurs métabolites). Certains médicaments sont éliminés uniquement par le rein sans même subir de métabolisation (tel que l'aténolol) alors que d'autres comme le propranolol peuvent être éliminés à 100% par le métabolisme hépatique. La majorité des médicaments sont cependant éliminés par une combinaison des deux voies. Par exemple, 60% de la digoxine ou 70% de la procainamide sont excrétés sous forme inchangée dans l'urine, le reste étant métabolisé par le foie (Thummel *et al.*, 2015). La valeur de clairance ( $CL$ ) obtenue à partir des données de

concentration sanguine, parfois appelée clairance totale ou systémique, est une somme des valeurs de clairance de chaque organe contribuant à l'élimination globale du médicament.

La clairance totale peut ainsi être représentée par cette équation :

$$CL = CL_{rénale} + CL_{hépatique} + CL_{autres}$$

La clairance rénale peut être facilement déterminée en mesurant la quantité de médicament inchangé excrété dans les urines au cours du temps. La mesure de la clairance hépatique et des autres types de CL (ex : intestinale, pulmonaire) nécessite des procédures très invasives et sont donc beaucoup plus complexes à mesurer *in vivo* chez l'Homme. Grâce à l'additivité des clairances, la clairance hépatique peut être calculée en soustrayant la CL rénale à la clairance systémique mesurée à partir des concentrations sanguines (Mehvar, 1991).

Nous pouvons constater que les concepts qui décrivent la clairance d'un médicament au travers d'un organe n'ont guère évolué depuis le milieu des années 70 (Sirianni and Pang, 1997; Mehvar, 2006; Pang *et al.*, 2007). La clairance est définie comme le volume de plasma ou de sang totalement épuré par unité de temps ; elle est ainsi habituellement exprimée comme un débit en mL/min.

Dans cette thèse nous nous intéresserons plus particulièrement à la clairance hépatique qui peut être décrite par cette équation :

$$CL_{hépatique} = Q_h \times E_h$$

Où  $E_h$  est le coefficient d'extraction hépatique qui correspond à la fraction de médicament qui est éliminé par l'organe après l'avoir traversé un fois.  $Q_h$  est le débit sanguin hépatique qui est proche de 20.7 mL/min/kg chez l'Homme.  $E_h$  peut être estimé en mesurant la différence entre la concentration du médicament à l'entrée du foie ( $C_{in}$ ) et la concentration à la sortie de l'organe ( $C_{out}$ ) :

$$E_h = \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}}$$

Les limites inférieure et supérieure du coefficient d'extraction hépatique se situent entre 0 et 1. La valeur maximale que peut atteindre la  $CL_{hépatique}$  est donc égale au débit sanguin hépatique  $Q_h$ .

b) *Les facteurs et processus impliqués dans la clairance hépatique*

Dans le foie, les médicaments voyagent à travers les sinusoides et entrent en contact avec les hépatocytes qui renferment les enzymes du métabolisme. Le médicament dans les sinusoides peut être sous deux formes, soit liée, soit libre. L'étendue de l'extraction et de la clairance des médicaments dépend d'au moins 3 facteurs :

- La fraction libre du composé dans le sang ( $f_{ub}$ ) ou dans le plasma ( $f_{up}$ ) : Il est généralement assumé que seule la fraction libre peut pénétrer dans les hépatocytes pour y être métabolisée ou excrétée par voie biliaire. Selon cette théorie, plus la fraction libre est grande plus la clairance a une chance d'être importante.
- La clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ) : Ce paramètre correspond à la capacité intrinsèque du foie à éliminer un médicament de la circulation en l'absence de toute limite de débit. En d'autres termes, il s'agit du volume de sang hypothétique que le foie pourrait éliminer par unité de temps si  $Q_h$  était illimité. La  $CL_{int}$  est le résultat des réactions de biotransformation que nous avons décrites dans le chapitre précédent.
- Le débit sanguin hépatique  $Q_h$  : Le débit sanguin affecte  $E_h$  et la  $CL_{hépatique}$  de manière différente : En effet, quand le débit augmente le coefficient d'extraction peut diminuer car les hépatocytes ont moins de temps pour capter le produit et l'éliminer. Cependant, parce que la  $CL_{hépatique}$  dépend à la fois de  $E_h$  et de  $Q_h$ , une augmentation de  $Q_h$  peut aussi entraîner une augmentation de la  $CL_{hépatique}$ .

Le lien entre ces différents facteurs n'est pas toujours simple à intégrer dans une démarche de prédiction. Il n'y a pas vraiment de règles absolues et tous les médicaments peuvent être considérés comme des cas particuliers. Pour les médicaments ayant une forte affinité pour les enzymes du métabolisme (tel que le propranolol), la  $CL_{int}$  peut être jusqu'à 7 fois plus élevée que le débit sanguin hépatique. La  $CL_{hépatique}$  de ce type de molécule sera donc limitée par  $Q_h$  car leur coefficient d'extraction est proche de 1. A l'inverse les molécules très faiblement métabolisées auront un faible coefficient d'extraction et leur  $CL_{hépatique}$  sera limitée par la  $CL_{int}$ .

c) *Modèles mathématiques décrivant la clairance hépatique.*

Différents modèles mathématiques sont utilisés pour décrire la relation entre les paramètres physiologiques et la clairance hépatique. Deux des principaux modèles introduits dans les années 1970, encore largement utilisés, sont le *Well stirred model* (« parfaitement mélangé ») et le *Parallel Tube model* (« tubes parallèles »). Les deux approches ont des hypothèses communes : seule la fraction libre est distribuée et métabolisée et la vitesse de distribution est uniquement limitée par le débit hépatique. Le *Well stirred* modélise le foie comme un compartiment unique et parfaitement agité. Cela suppose une répartition instantanée du médicament dans l'organe et donc un équilibre entre la concentration hépatique et la concentration en sortie du foie. Le *Parallel Tube model* considère quant à lui que le foie est une série de cylindres identiques et parallèles et que les enzymes sont distribuées uniformément le long de ces cylindres. La quantité de molécule diminue ainsi de façon exponentielle au fur et à mesure de la traversée de l'organe. Ces deux modèles sont représentés graphiquement sur la figure 18 (Mehvar, 2018) :

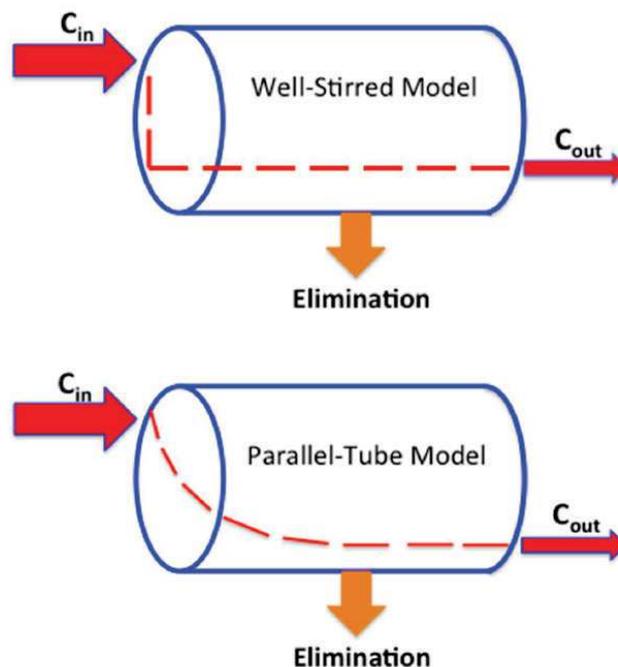


Figure 18 : Représentations graphiques des modèles Well stirred et Parallel Tube model

Selon le Well stirred model la clairance hépatique est décrite par cette équation :

$$CL_{\text{hépatique}} = \frac{fu_b \times CL_{\text{int}} \times Q_h}{fu_b \times CL_{\text{int}} + Q_h}$$

( $fu_b$  est la fraction libre du composé dans le sang et  $CL_{\text{int}}$  la clairance intrinsèque)

Cette équation a été proposée par Rowland et al en 1973 et est encore aujourd'hui le modèle hépatique le plus utilisé dans les méthodes d'extrapolation (IVIVE) dont nous reparlerons plus tard.

L'équation du *Parallel Tube model* a quant à elle été proposée par Winkler et al en 1973 :

$$CL_{\text{hépatique}} = Q_h \times \left[ 1 - \exp\left(-CL_{\text{int}} \times \frac{fu_b}{Q_h}\right) \right]$$

Pour la prédiction des clairances hépatiques, des simulations ont montré qu'il n'y a pas de différence majeure entre le *Parallel Tube model* et le *Well stirred model*. La présence de la fonction exponentielle dans le *Parallel Tube model* peut toutefois entraîner une discordance entre les deux modèles lorsque le coefficient d'extraction  $E_h$  est très élevé (Pang and Rowland, 1977; Chiba *et al.*, 2009). Les équations de ces deux modèles supposent que la perméabilité du médicament à travers l'espace interstitiel et les membranes hépatocytaires est beaucoup plus élevée que la  $CL_{\text{int}}$  du médicament.

#### d) *Le modèle de clairance étendue (Extended clearance model)*

Les modèles de clairance hépatique que nous avons décrits dans le paragraphe précédent supposent que (i) la clairance hépatique (métabolisme et/ou excrétion biliaire) est limitée par la fraction libre plasmatique et que (ii) la perméabilité du médicament à travers l'espace interstitiel et les membranes hépatocytaires n'est pas limitante. Cependant, si la perméabilité devient limitante dans l'élimination du médicament, ces équations doivent être modifiées pour tenir compte de ce phénomène. La pravastatine est un exemple de composé pour lequel le processus de clairance est limité par sa diffusion membranaire (Yamazaki *et al.*, 1996) et dont les prédictions sont erronées si la perméabilité n'est pas prise en compte (Watanabe *et al.*, 2009; Varma *et al.*, 2015). Dans le foie, les médicaments doivent tout d'abord passer la

membrane hépatocytaire qui sépare le sang du cytosol des hépatocytes. Le passage de cette barrière représente la perméabilité et peut se produire par diffusion passive et/ou transport actif. Une fois dans le cytoplasme, les médicaments sont sujets au métabolisme, à la sécrétion canaliculaire (excrétion biliaire) mais peuvent également retourner dans le sang via des transporteurs d'efflux. La figure 19 extraite de la publication de Chu et al. (2013) schématise les nombreux processus (numérotés de 1 à 9 sur la figure) impliqués dans la clairance d'une molécule :

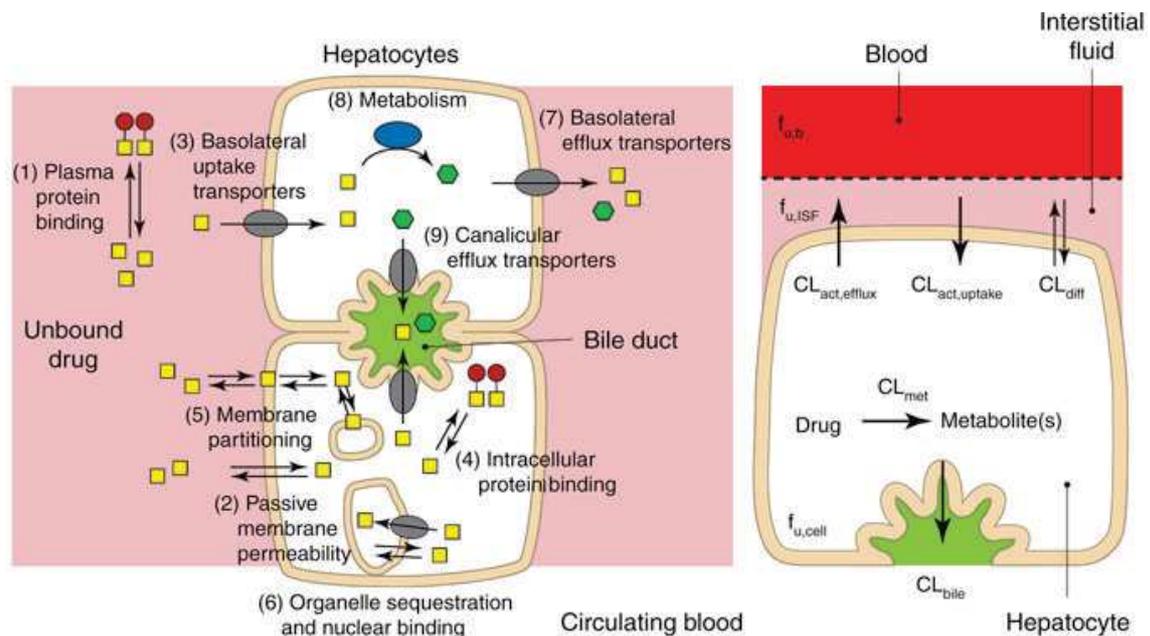


Figure 19 : Facteurs influant sur les concentrations intracellulaires de médicaments dans l'hépatocyte source : Chu et al., 2013

Face aux nouvelles connaissances sur les transporteurs et au nombre grandissant de composés susceptibles d'être pris en charge par ces protéines, les scientifiques ont développé de nouvelles équations qui intègrent le phénomène de transport et de diffusion (Liu and Pang, 2005; Maeda et al., 2011; Camenisch, 2016) :

$$CL_{int} = \frac{(CL_{uptake} + CL_{passive}) \times (CL_{métabolique} + CL_{biliaire})}{(CL_{passive} + CL_{métabolique} + CL_{biliaire})}$$

Dans ce projet de thèse nous nous intéresserons essentiellement à la clairance métabolique mais tous ces phénomènes liés aux transporteurs et à la diffusion sont à garder à l'esprit.

## B. Prédire et étudier la clairance dans un contexte de R&D pharmaceutique

La sélection des candidats médicaments se base en grande partie sur leurs caractéristiques ADME car il ne fait aucun doute que le profil pharmacocinétique d'un candidat conditionne grandement son succès final. Plusieurs analyses des causes d'attrition montrent que les problèmes de pharmacocinétique et de biodisponibilité ne constituent plus un facteur majeur d'échec (Kola and Landis, 2004; Emoto *et al.*, 2010; Waring *et al.*, 2015) (Figure 20). Ces données prouvent que les efforts déployés par le secteur pour améliorer les prédictions pharmacocinétiques portent leurs fruits et participent à augmenter les taux de succès. L'absence d'efficacité clinique et les problèmes de sécurité sont désormais considérés comme les principaux obstacles à la réussite des programmes de recherche et développement.

Termination reason	Overall	Period 2000–2005	Period 2006–2010	Candidate nomination	Phase I	Phase II
Clinical safety	68 (11%)	48 (13%)	20 (8%)	5 (1%)	40 (25%)	22 (25%)
Commercial	40 (7%)	23 (6%)	17 (7%)	26 (7%)	10 (6%)	4 (4%)
Efficacy	55 (9%)	45 (11%)	10 (4%)	10 (3%)	14 (9%)	31 (35%)
Formulation	9 (1%)	4 (1%)	5 (2%)	8 (2%)	1 (0.6%)	0
Non-clinical toxicology	240 (40%)	144 (40%)	96 (40%)	211 (59%)	21 (13%)	7 (8%)
Patent issue	1 (0.2%)	0	1 (0.4%)	1 (0.3%)	0	0
Pharmacokinetics or bioavailability	29 (5%)	19 (5%)	10 (4%)	3 (0.8%)	25 (16%)	1 (1%)
Rationalization of company portfolio	124 (21%)	46 (13%)	78 (32%)	75 (21%)	29 (18%)	19 (21%)
Regulatory	2 (0.3%)	2 (0.6%)	0	1 (0.3%)	1 (0.6%)	0
Scientific	33 (5%)	28 (8%)	5 (2%)	13 (4%)	15 (10%)	5 (6%)
Technical	3 (1%)	3 (1%)	0	2 (0.6%)	1 (0.6%)	0
Other	1 (0.2%)	0	1 (0.4%)	1 (0.3%)	0	0
Total	605	362	243	356	157	89

Figure 20 : Analyse des principales causes d'attrition réalisée auprès de 4 grands groupes pharmaceutiques entre 2000 et 2010 (Waring *et al.*, 2015)

Les progrès réalisés sont solides mais ne doivent pas réduire les efforts d'innovation car de nombreux défis restent à relever. Par exemple, le développement de molécules biologiques (anticorps monoclonaux, protéines, siRNA...) est en plein essor mais leur devenir dans l'organisme est encore mal connu. La pharmacocinétique de ces molécules de haut poids moléculaire est en effet différente des petites molécules sur lesquelles s'est construite toute cette expertise. Les professionnels doivent s'adapter à ces thérapeutiques et développer leurs connaissances dans ce domaine. La médecine personnalisée est également un énorme défi pour l'industrie pharmaceutique, adapter les doses à chaque patient est désormais devenu

courant, notamment en oncologie. La pharmacogénomique et toutes les connaissances autour de la clairance peuvent participer au développement d'outils et d'applications qui aideront les praticiens (Benet, 2018).

Dans cette partie nous allons décrire les différentes études DMPK menées tout au long du processus de découverte d'un médicament et qui ont pour la plupart un lien avec la clairance métabolique.

1. Les études exploratoires (ou de recherche) et précliniques en lien avec la clairance métabolique

- a) *Détermination de la clairance intrinsèque en vue de prédire la clairance métabolique in vivo chez l'homme*

La clairance hépatique d'un composé est un paramètre essentiel dans la sélection des candidats au développement. La bonne stabilité métabolique d'un composé permet de s'assurer de l'obtention de concentrations plasmatiques suffisantes en principe actif. La clairance hépatique intrinsèque *in vitro* (Clint) est déterminée sur hépatocytes humains en incubant le substrat pendant plusieurs heures et en quantifiant la disparition du produit inchangé aux différents temps de la cinétique. En recherche, ces études visent à classer les composés selon leur stabilité afin de sélectionner les candidats les plus prometteurs. Dans les phases plus avancées, la prédiction de la clairance hépatique participe au choix de la première dose à administrer chez l'Homme. L'étude de la stabilité métabolique est le thème central de ce projet de thèse, ainsi nous y reviendrons beaucoup plus longuement dans la partie résultats.

- b) *Identification des voies métaboliques*

Dans des phases encore précoces, l'identification des métabolites permet d'identifier les sites de métabolisation sur une molécule trop fortement métabolisée afin d'orienter les chimistes dans leurs futures synthèses. Le but est de rendre le principe actif plus stable sur le plan métabolique. A un stade plus avancé, les études d'identification des métabolites ont pour but de détecter de potentiels métabolites actifs, toxiques pro-mutagènes ou pro-carcinogènes.

L'identification des métabolites permet également de réaliser des comparaisons inter espèces et de sélectionner l'espèce animale appropriée pour les futures études pré-cliniques.

*c) Identification des enzymes impliquées dans le métabolisme d'une nouvelle entité chimique*

Lors des études d'identification on met en évidence la formation d'un certain nombre de métabolites à partir du produit parent. L'étape suivante consiste à identifier les isoformes de CYP450s ou d'UGTs responsables de la formation de ces métabolites ainsi que l'étendue de leur implication dans le métabolisme de la molécule.

L'étude quantitative permet de connaître dans quelle mesure une isoforme d'enzyme (le plus souvent un CYP) est impliquée dans la métabolisation d'un composé. Ces études peuvent se faire de manière précoce sur microsomes hépatiques humains mais l'outil de choix reste l'hépatocyte humain. La conduite de ce type d'expérience nécessite de disposer d'inhibiteurs spécifiques et puissants des principales enzymes du métabolisme.

Les enzymes recombinantes et les Silensomes™ peuvent être utilisés en complément des hépatocytes et des microsomes pour la détermination de l'implication des enzymes dans le métabolisme d'un composé. Elles permettent d'obtenir une réponse rapide quant à la capacité d'une ou plusieurs isoforme(s) testée(s) individuellement à métaboliser le produit (Parmentier *et al.*, 2017).

*d) Prédiction des interactions médicamenteuses*

Compte tenu du rôle central que jouent les cytochromes P450 dans le métabolisme des médicaments, une réduction (inhibition) ou une augmentation (induction) significative de l'activité de ces enzymes, et plus particulièrement du CYP3A4 peut avoir de sérieuses conséquences sur la clairance d'une molécule. Sur le plan clinique, l'importance des interactions médicamenteuses résultant de l'inhibition ou de l'induction dépendra de l'activité pharmacodynamique et de la toxicité relative de la molécule mère et de ses métabolites.

Les inhibitions de CYP, en particulier celles des isoformes 3A4 et 2D6, sont les causes les plus fréquentes d'interactions médicamenteuses (Dresser *et al.*, 2000). Les cas d'interactions par inhibition sont nombreux, on observe par exemple une diminution de la clairance orale du midazolam de près de 95 % après administration de kétoconazole. Pour réduire le risque d'intoxication, les molécules métabolisées par différents CYP ou par d'autres enzymes sont privilégiées lors des étapes de sélection. La connaissance des voies métaboliques et des enzymes impliquées dans la biotransformation d'un composé est donc essentielle.

L'induction de CYP va quant à elle entraîner une diminution de l'activité pharmacologique causée par l'augmentation du métabolisme. Si la molécule induit le gène responsable de son propre métabolisme, on parle d'un processus d'auto-induction. Ainsi, si par exemple le CYP3A4 est impliqué majoritairement dans le métabolisme de la molécule, l'induction aura pour conséquence une synthèse augmentée de la protéine et donc un métabolisme CYP3A4-dépendant accru. Par conséquent, on observera une diminution drastique des concentrations plasmatiques qui ne permettront plus d'atteindre les concentrations thérapeutiques entraînant ainsi la perte d'efficacité de la molécule. Les études d'induction consistent soit à mesurer l'augmentation de l'expression des gènes par la quantification des ARNs messagers, soit à mesurer l'augmentation de l'activité enzymatique d'un cytochrome vis-à-vis de son substrat spécifique.

Toutes ces études sont encadrées par différentes autorités réglementaires qui délivrent les autorisations de mises sur le marché (AMM). Pour conduire des études efficaces et pertinentes, les entreprises pharmaceutiques respectent par exemple les guidances proposées par la FDA (United States Food and Drug Administration), l'EMA (European Medicines Agency) et la PMDA (Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency). Le contenu de ces différents guides est souvent proche mais il n'existe pas encore d'harmonisation totale du fait des spécificités de chaque continent.

## 2. Exploitation des données générées *in vitro* et prédiction de la clairance métabolique

La prédiction de la clairance métabolique repose sur 3 grands piliers : les modèles hépatiques *in vitro*, les études de stabilité métabolique et les méthodes IVIVE (*in vitro to in vivo extrapolation*).

Les modèles hépatiques dont nous reparlerons en détail dans le prochain chapitre permettent de mimer l'action du foie sur le composé à tester. Les études de stabilité métabolique doivent quant à elles permettre de quantifier les biotransformations subies par le composé au travers de la mesure de la clairance intrinsèque (CLint).

Le design expérimental est très important car les données brutes générées au cours de ces études conditionnent la qualité des prédictions. La CLint est déterminée soit en quantifiant l'apparition de métabolite via le calcul des constantes Km et Vmax, soit en quantifiant la disparition du composé parent au cours du temps. La méthode visant à mesurer la déplétion du substrat au cours du temps est la plus simple et donc la plus utilisée. La vitesse de déplétion est convertie en CLint à l'aide de « Scaling Factor » correspondant à des valeurs physiologiques tels que le nombre d'hépatocytes par gramme de foie ou le poids du foie (Ring *et al.*, 2011).

Les méthodes IVIVE permettant de convertir les CLint en clairance métabolique se basent toutes sur les modèles mathématiques hépatiques (*Well stirred, Parallel Tube model* etc...). Selon la méthode choisie, les prédictions peuvent être empiriques ou mécanistiques et nécessiter des paramètres supplémentaires (fup, pKa etc...). Les stratégies de prédiction sont nombreuses et il n'existe pas encore de consensus clair sur la méthode à adopter (Wood *et al.*, 2017).

Les liens entre les modèles *in vitro*, le design expérimental et les méthodes IVIVE sont au cœur de ce projet de thèse et seront documentées et discutées tout au long de nos articles. Ainsi, afin d'éviter toute redondance avec la suite de ce manuscrit, nous n'allons pas détailler plus longuement les stratégies de prédiction dans cette introduction bibliographique.

## IV. Les modèles *in-vitro* hépatiques pour l'étude de la clairance

### 1. Les modèles de routines

Les études de DMPK reposent essentiellement sur trois modèles *in vitro* : les microsomes, les hépatocytes en suspension et les hépatocytes en monocouche.

#### a) *Les microsomes*

Les microsomes sont obtenus après la dernière centrifugation du broyat hépatique et constituent une fraction enrichie en membranes du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques. Les fractions microsomales hépatiques présentent différents avantages :

- Elles sont très riches en enzymes de phase I (toutes les isoformes de CYP, FMO, époxydes hydrolases membranaires, ...) mais contiennent également certaines enzymes membranaires de phase II comme les UDP-glucuronosyl-transférases
- La préparation est aisée et le coût raisonnable
- Elles présentent une bonne conservation à - 80°C pendant plusieurs années sans perte de leurs propriétés catalytiques
- Les microsomes offrent la possibilité de fabriquer des pools de différents donneurs de façon à s'affranchir de la variabilité inter-individuelle ou, au contraire, de constituer des banques de donneurs aux phénotypes divers et variés (métaboliseurs lents du CYP2D6, CYP3A4 induit, métaboliseurs lents CYP2C9, ...).
- Leur utilisation est facile et rapide et le modèle constitue un bon outil pour déterminer de façon primaire les différentes voies métaboliques pour un composé.

Le modèle présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients : Les réactions enzymatiques de phase I et de phase II ne peuvent pas être étudiées en séquence car elles nécessitent des conditions expérimentales différentes (cofacteur, tampon). De plus, les enzymes cytosoliques sont absentes et le profil métabolique peut, de ce fait, être incomplet. Enfin, le modèle reste très artificiel, il ne permet pas de tenir compte de la perméabilité et nécessite l'ajout de cofacteur pour initier les réactions enzymatiques (NADPH pour les CYP et FMO ; UDPGA pour les UGT).

## b) *Les hépatocytes utilisés en suspension ou en monocouche*

Les tissus hépatiques utilisés pour l'isolement des hépatocytes humains sont la plupart du temps obtenus après résection d'une tumeur hépatique primaire ou secondaire ou lorsqu'un foie de donneur n'est pas transplantable. Les hépatocytes sont isolés par perfusion du tissu hépatique avec une solution de collagénase suivie de différents lavages. Les cellules ainsi obtenues peuvent être utilisées soit immédiatement en suspension, soit dans les heures qui suivent, après immobilisation sur des supports prétraités au collagène I (monocouche).

Un approvisionnement restreint en tissu humain rend les hépatocytes humains relativement précieux. Grâce aux progrès de la cryopréservation, il est aujourd'hui possible de se fournir en hépatocytes humains ou animaux cryopréservés permettant l'utilisation de cultures primaires en routine (Guillouzo *et al.*, 1999; Li, 1999; Hengstler *et al.*, 2000). En raison du prix élevé des ampoules d'hépatocytes cryopréservés ( $\approx 500\text{€}$ /ampoule contenant entre 5 et 10 millions d'hépatocytes), leur utilisation reste globalement confinée aux industries pharmaceutiques. L'avantage des cellules cryopréservées réside sans conteste dans leur facilité d'utilisation et la liberté qu'elles offrent dans la planification des études sans être tributaire de l'approvisionnement en tissu frais. En outre, la disponibilité constante des cellules permet de répéter les expériences sur un même donneur ou sur plusieurs donneurs en fonction du phénotype de ceux-ci.

Les hépatocytes humains présentent de nombreux avantages par rapport aux microsomes. Ils contiennent un système enzymatique complet (phase I, II et III), et des concentrations physiologiques en cofacteurs. Il s'agit du modèle « Gold standard » pour les études DMPK puisqu'il permet l'étude de la distribution intra- et extracellulaire d'un composé. Les hépatocytes en suspension ou en monocouche sont très utilisés pour la caractérisation DMPK et notamment pour l'identification des voies métaboliques, la détermination de la clairance intrinsèque *in vitro* et l'étude des interactions médicamenteuses (Godoy *et al.*, 2013).

Ces modèles sont donc utilisés depuis plusieurs décennies, mais ils souffrent toute de même de plusieurs limitations. La perte de contact avec la matrice extracellulaire et les autres types cellulaires occasionne une dédifférenciation des cellules et une perte de leur polarisation (Dalet *et al.*, 1982) qui pourront néanmoins être rétablies dans des systèmes de cultures plus évolués. Ainsi, les hépatocytes en suspension sont soumis à une agitation et peuvent être

utilisés pour des incubations courtes comprises entre 4 et 6h (Elaut *et al.*, 2006; Stringer *et al.*, 2008). Les hépatocytes en monocouche peuvent être utilisés sur une plus longue période (48h). Ces hépatocytes sont cependant sujets à une dédifférenciation rapide qui entraîne une modification significative de l'expression génique et de l'activité des enzymes au cours du temps. Le métabolisme de phase I / II, les systèmes de transport basolatéraux et canaliculaires, le métabolisme des acides gras et des lipides sont effectivement impactés au cours de la culture (Richert *et al.*, 2006).

L'un des facteurs impliqués dans la détérioration fonctionnelle des hépatocytes en monocouche est le manque d'interactions appropriées entre les hépatocytes et la matrice extracellulaire. L'utilisation de ce modèle peut être prolongée grâce à la culture dite en « sandwich » qui consiste à déposer un gel de type Matrigel™ ou Geltrex™ composé d'un mélange de protéines d'origines animales retrouvées dans la matrice extracellulaire. La polarisation des hépatocytes pris en « sandwich » entre le collagène des plaques de culture et cette matrice est améliorée (transporteurs et canalicules biliaires fonctionnels) et leur compétence métabolique est prolongée de plusieurs jours (Mathijs *et al.*, 2009; Keemink *et al.*, 2015).

## 2. Les modèles plus physiologiques

La matrice extracellulaire, les contacts intercellulaires, l'organisation multicellulaire et les échanges métaboliques au sein du microenvironnement sont essentiels pour l'organisation fonctionnelle des cellules hépatiques (Tetsuka *et al.*, 2017). Les cultures 2D en monocouche ne peuvent évidemment pas reproduire cet environnement complexe et dynamique. En ce sens, la culture en 3 dimensions (3D), la culture sous flux et la co-culture peuvent participer à améliorer les compétences des modèles hépatiques.

### a) Co-culture et Modèles hépatiques en 3D

Les progrès dans le domaine des biomatériaux, des micro-technologies et de l'ingénierie tissulaire ont fortement profité aux modèles hépatiques.

Les interactions hétérotypiques et homotypiques sont connues pour créer un microenvironnement favorable et des conditions propices à la culture long terme. La co-culture d'hépatocytes avec différents types cellulaires est donc une solution pour prolonger les fonctions hépatocytaires (exemple : sécrétion d'albumine, activité des CYP, production d'urée...) grâce aux contacts physique cellule-cellule ou via la sécrétion de molécules bénéfiques aux activités cellulaires. Ainsi, la co-culture d'hépatocytes avec des fibroblastes, des cellules endothéliales et épithéliales, des HSCs, des Kupffers ou des cellules souches mésenchymateuses humaines ont démontré leurs capacités à prolonger les fonctions hépatocytaires (Khetani and Bhatia, 2008; Krause *et al.*, 2009; Rose *et al.*, 2016). Nous reviendrons en détail sur la co-culture au cours de nos études expérimentales.

La culture des hépatocytes en sphéroïdes est l'un des modèles 3D le plus utilisé. L'une des stratégies pour former des sphéroïdes consiste à prévenir ou à minimiser les interactions cellule-substrat tout en maximisant les interactions cellule-cellule. Avec cette procédure, les sphéroïdes sont générés par l'auto-assemblage de cellules en suspension, un processus qui comprend plusieurs étapes de réarrangement et de compactage d'agrégats cellulaires qui dépendent du réseau d'actine et de l'expression de molécules d'adhésion, telles que l'Integrine et la E-cadhérine (Tzanakakis *et al.*, 2001). Les sphéroïdes forment des structures qui ressemblent à certaines organisations du foie *in vivo*. Leur formation s'accompagne de la production de matrice extracellulaire constituée de laminine, de fibronectine et de collagène (Brophy *et al.*, 2009). Au sein des sphéroïdes, les hépatocytes sont bien polarisés et un vaste réseau de canalicules biliaires est formé (Tostões *et al.*, 2012). Plusieurs modèles de sphéroïdes sont commercialisés pour répondre au besoin de l'industrie pharmaceutique. La société Insphero (Schlieren/Suisse) propose par exemple des plaques au format 96- ou 384-puits contenant chacun un sphéroïde. Leurs modèles sont principalement utilisés pour des études d'hépatotoxicité mais ils ont récemment développé un modèle pour étudier la fibrose et la stéatohépatite non alcoolique (Proctor *et al.*, 2017).

Les fonctions hépatocytaires peuvent être encore améliorées lorsque les sphéroïdes sont co-cultivés avec des fibroblastes (Lu *et al.*, 2005), des cellules pancréatiques (Lee *et al.*, 2004), des cellules stellaires (Abu-Absi *et al.*, 2004) ou des cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse (Alzebdeh and Matthew, 2017). Les sphéroïdes peuvent être formés grâce à des systèmes statiques contenant des surfaces « low binding » qui obligent les

hépatocytes à s'auto assembler ; ou encore par des méthodes plus dynamiques telles que l'agitation à faible vitesse ou la perfusion pulsatile (Brophy *et al.*, 2009; Goral *et al.*, 2010).

En raison de leur capacité à simuler la structure des tissus mous, les hydrogels tels que l'alginate, le collagène, le chitosane, l'acide hyaluronique et le polyéthylène glycol (PEG) représentent des alternatives aux matrices extracellulaires classiques. Ces composés peuvent absorber une grande quantité de liquide et être utilisés comme des scaffolds (échafaudages). Les sphéroïdes peuvent par exemple être encapsulés dans des billes d'alginate pour prolonger l'activité des enzymes du métabolisme et les fonctions hépatocytaires (Capone *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2014; Cyprio.fr)

La bio-impression est également en plein essor dans le domaine de l'hépatologie. Ces méthodes ont l'ambition de produire des tissus biologiques de manière artificielle. Le développement de tissus vivants voire d'organes serait effectivement une avancée extraordinaire pour la médecine régénérative, la pharmacocinétique et plus globalement l'ingénierie tissulaire. La fabrication repose sur des imprimantes 3D capables de déposer couche par couche des cellules vivantes isolées ou en suspension dans des gels d'impression. L'impression d'organes complexes tels que le cœur, le pancréas, le foie ou les reins fait l'objet d'intenses recherches de par le monde. Ces recherches sont pleines de promesses mais n'ont pas encore abouti à des transplantations. En attendant, les tissus imprimés en 3D peuvent s'avérer utiles pour des études *in vitro* telles que la prédiction de l'hépatotoxicité ou la modélisation de maladie stéatosique. La société Organovo (San Diego, Californie, Etats Unis) peut imprimer de petits tissus hépatiques (3mm<sup>2</sup> sur 0.5 mm d'épaisseur) directement en plaques 24-puits et à partir de différents types cellulaires (Neff, 2017). Leur modèle qui est viable sur plus de 4 semaines est principalement utilisé pour étudier les effets d'une exposition chronique de molécules au potentiel hépatotoxique (Nguyen *et al.*, 2016). En fonction des cellules qui le compose (Hépatocytes, Kupffer, HUVEC, cellules stellaires...), le modèle peut également s'avérer intéressant dans l'étude de la fibrose et de la pathogénèse de la NASH (Norona *et al.*, 2016).

## b) Modèles de culture en flux

Afin de créer un environnement plus physiologique pour les hépatocytes et de lutter contre les problèmes de diffusion de l'oxygène et des nutriments, différents systèmes de perfusion ont été développés. L'objectif commun des nombreux travaux portant sur la culture dynamique est de stabiliser les fonctions hépatocytaires en imitant le stress de cisaillement présent *in vivo* dans les sinusoides hépatiques. Le plus gros challenge est de développer un système accessible et simple à utiliser.

L'augmentation des contraintes de cisaillement est bénéfique mais elle doit néanmoins être parfaitement contrôlée au risque de faire diminuer la viabilité (Tanaka *et al.*, 2006; Catapano *et al.*, 2009). Les premières tentatives ont abouti à des bioréacteurs imposants, complexes à manipuler et qui demandaient un grand nombre de cellules ce qui engendrait des coûts élevés. Ces aspects pratiques et économiques empêchent encore leur application systématique dans la recherche et le développement de médicaments (Bachmann *et al.*, 2015). Les efforts déployés par les scientifiques ont longtemps été dilués par le manque d'interactions entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée. L'amélioration des relations entre les laboratoires publics et privés observée depuis quelques années a été profitable et des initiatives pour produire des systèmes plus pertinents ont récemment vu le jour. Par exemple, les projets français « *Hepatinov* » ou plus récemment « *CellSpace* » ont été créés pour développer des approches thérapeutiques innovantes et construire une plateforme de dimension internationale dédiée à la construction de tissus et d'organes par bio-ingénierie. Dans ce type de projets transversaux, les connaissances et expertises de médecins, des CHU, des instituts de recherche et de sociétés privées sont mises en commun pour accélérer l'innovation et créer des solutions concrètes et pertinentes.

Actuellement, plusieurs modèles dynamiques sont commercialisés pour des applications de DMPK et de toxicologie prédictive. Le système Liverchip™ proposé par la société CnBio (Hertfordshire/Angleterre) propose par exemple des plaques pouvant atteindre 36-puits qui intègrent chacun une micro-pompe pneumatique. La perfusion se fait au travers d'un scaffold dans lequel les hépatocytes forment des structures 3D. Les hépatocytes peuvent être cultivés jusqu'à 40 jours sans perte significative des fonctions hépatiques (Tsamandouras *et al.*, 2017; Rowe *et al.*, 2018). Le système a également été utilisé pour l'étude de maladies hépatiques

comme l'hépatite B et la stéatose (Kostrzewski *et al.*, 2017; Ortega-Prieto *et al.*, 2018). L'une des premières versions de ce système avait été testée par Sanofi et avait fourni des résultats intéressants (Vivares *et al.*, 2015). Un problème de fixation non spécifique des composés sur le système était toutefois problématique notamment pour les composés très lipophiles. Ce problème est observé sur beaucoup de systèmes fluidiques en raison de la nature du matériel (pompe, membrane, tubes...). D'autres sociétés tels que Hurel, HemoShear, Emulate, Kirkstall proposent également des systèmes fluidiques ou micro-fluidiques destinés à stabiliser les hépatocytes (Novik *et al.*, 2010; Dash *et al.*, 2013; Rashidi *et al.*, 2016).

Les bioréacteurs à fibres creuses (*hollow-fiber*) sont un autre exemple de culture en perfusion. Dans ce type de système, les cellules se fixent à la surface des fibres et se réorganisent pour générer un micro-environnement proche de la situation physiologique *in vivo* tandis que d'autres fibres (creuses) conduisent l'oxygène et les nutriments (De Bartolo *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010). Les dispositifs originaux qui nécessitaient plus de 800 mL de milieu et plusieurs centaines de millions de cellules ont été réduits à 0.5 mL de milieu et 20 millions de cellules (Hoffmann *et al.*, 2012). Dans ce système les hépatocytes ont maintenu l'activité enzymatique et l'expression mRNA des enzymes de phase I (CYP1A2, CYP3A4 / 5, CYP2C9, CYP2D6, CYP2B6), de phases II et des transporteurs jusqu'à trois semaines (Lübberstedt *et al.*, 2015).

Nous continuerons à discuter de la culture dynamique dans la partie « résultats ».

## II. Résultats

## A. Evaluation du kit TRANSIL pour la détermination du fup, fomic et fuhep

### 1. Introduction

Le développement d'un médicament nécessite l'optimisation simultanée de plusieurs propriétés. Il est depuis longtemps reconnu que l'activité et la puissance d'une molécule ne sont pas les seuls maillons d'un programme de découverte réussi. Le profil de sécurité est tout aussi important mais n'est pas le seul obstacle à surmonter. Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, le succès d'un médicament est également lié à son profil pharmacocinétique. Ainsi, la capacité de prédire précocement le devenir d'une molécule dans l'organisme est un outil stratégique puissant. Les scientifiques impliqués dans la découverte de nouveaux médicaments utilisent ces moyens pour sélectionner les composés présentant le plus fort potentiel pour devenir des agents thérapeutiques efficaces.

La fraction libre plasmatique notée fup (*fraction unbound in plasma*) est un paramètre impliqué dans beaucoup de processus pharmacocinétiques dont notamment la prédiction de la clairance métabolique qui est au cœur de cette thèse. Les trois méthodes expérimentales les plus répandues pour mesurer le fup sont décrites sur la fig 21 (Bowman & Benet, 2018) :

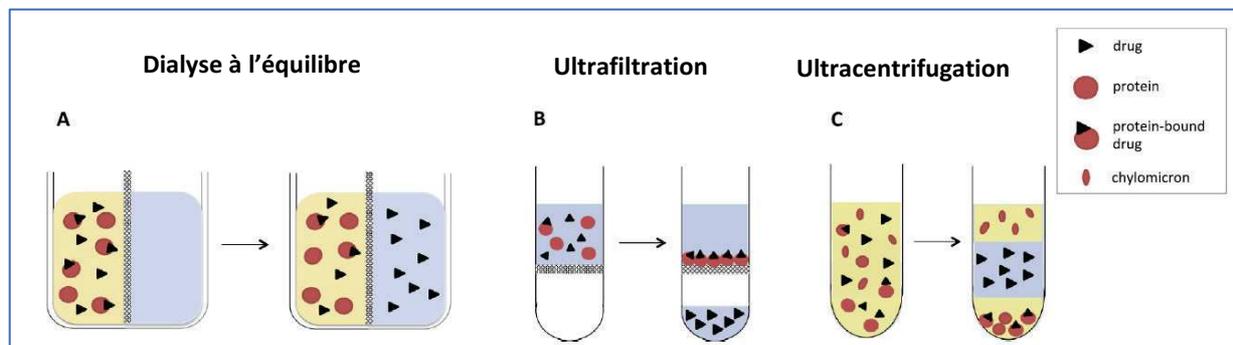


Figure 21 : Méthodes *in vitro* utilisées pour déterminer la fraction libre plasmatique

- (A) : **La dialyse à l'équilibre** est la méthode la plus utilisée. Il s'agit d'un dispositif à deux chambres séparées par une membrane semi perméable. Le plasma contenant le médicament est ajouté d'un côté tandis que du tampon PBS est ajouté dans l'autre chambre. Lorsque l'équilibre est atteint, la comparaison des concentrations mesurées entre les deux chambres permet de déterminer la quantité de molécules qui n'a pas été retenue par les protéines plasmatiques.
- (B) : **L'ultrafiltration** combine la force centrifuge à une membrane semi-perméable qui ne laisse pas passer les protéines. Avec cette méthode, le plasma contenant le médicament est d'abord placé dans la chambre supérieure du dispositif puis la centrifugation est utilisée pour récupérer la fraction libre dans la chambre inférieure.
- (C) : **L'ultracentrifugation** permet de séparer le plasma en plusieurs phases en utilisant une force centrifuge élevée (500 000 g) pendant une longue période (10 à 24 heures). Après centrifugation, trois couches sont formées : le surnageant contient des lipoprotéines et des chylomicrons, la phase intermédiaire contient le médicament libre et le culot contient les molécules à haute densité (protéines, lipoprotéines...).

La dialyse à l'équilibre et l'ultrafiltration sont simples à utiliser mais présentent quelques inconvénients qu'il est important de considérer (Howard et al., 2010) : (1) fixation non spécifique sur la membrane semi perméable, (2) variation de volume due à l'évaporation ou à la pression oncotique, (3) possibilité de fuite de protéines si la membrane est abimée (ex : par un tips). L'ultracentrifugation n'utilise pas de membrane et permet de s'affranchir de certains de ces inconvénients mais nécessite toutefois beaucoup plus de minutie. Il est effectivement très difficile de récupérer la couche intermédiaire prise en sandwich sans toucher les phases lipidiques et protéiques (Bohnert and Gan, 2013). Malgré les progrès de la technologie, les valeurs de fup générées par ces méthodes standard demeurent incertaines lorsque le fup est inférieur à 0.01 (Di et al., 2017).

La considération du fup lors de la prédiction de la clairance hépatique est discutée depuis plusieurs décennies. De nombreuses publications suggèrent qu'il est également nécessaire de considérer la fixation non spécifique des composés sur la matrice utilisée dans les études de stabilité métabolique (Obach, 1997; Ito and Houston, 2005; Venkatakrisnan et al., 2010; Ring et al., 2011). La liaison du composé sur les membranes microsomales ou hépatocytaires suggère en effet que le substrat, retenu par la matrice, n'est pas entièrement disponible pour être métabolisé par les enzymes. Les paramètres fumic et fuhep peuvent ainsi être utilisés pour décrire la fraction libre d'un composé mélangé à des microsomes ou à des hépatocytes inactivés. Dans cet article, nous allons investiguer ces différents paramètres (fup, fumic et fuhep) qui ont un lien important avec la prédiction de clairance.

a) *La fraction libre plasmatique : fup (« Unbound Plasmatic Fraction »)*

Il est habituellement admis que seule la fraction libre (fu) et donc non liée d'un médicament peut traverser les membranes cellulaires pour y exercer son effet pharmacologique ou y être transformée. De nombreux médicaments, en particulier les composés lipophiles, se lient aux protéines plasmatiques circulantes, telles que la sérum albumine humaine (HSA), la glycoprotéine  $\alpha$ 1-acide (AGP), les globulines et les lipoprotéines. Parmi ces protéines, la HSA et l'AGP sont les plus impliquées dans la réduction de l'exposition aux xénobiotiques en raison de leur capacité à se lier à un large éventail de médicaments structurellement très différents et via des sites de liaison distincts (Kremer et al., 1988; Peters, 1995).

La HSA est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin. Elle est synthétisée dans le foie et les concentrations chez les sujets sains se situent entre 35 et 60 g/L avec une moyenne de 42 g/L (Peters, 1995). L'albumine compte pour près de 60% des protéines plasmatiques totales. Sa principale fonction physiologique est de se lier et de transporter des anions endogènes et des acides gras à longue chaîne. Deux sites de liaison de haute affinité ont été proposés dans les sous-domaines IIA (également connu sous le nom de « Site I » ou site warfarine) et IIIA (« Site II » ou site benzodiazépine) de l'albumine. Ceux-ci comprennent des poches hydrophobes très allongées avec des résidus de lysine et d'arginine chargés en surface qui peuvent interagir avec les parties de ligand polaire. Contrairement à l'AGP, les taux sanguins de HSA sont beaucoup plus stables. L'hyperalbuminémie (HSA > 55 g/L) est rarement observée en l'absence de déshydratation tandis que l'hypoalbuminémie est beaucoup plus fréquente : certains cas de malnutrition ou de maladie hépatique peuvent entraîner une baisse importante des taux sériques d'albumine à 20-23 g/L (Peters, 1995).

L'AGP, également appelée orosomucoïde, est une petite glycoprotéine de la phase aiguë de l'inflammation (environ 40 kD), synthétisée principalement par les hépatocytes et présente dans le plasma des sujets sains à des concentrations allant de 0,36 à 1,46 g/L avec une moyenne de 0,77 g/L (Luo et al., 2015). L'AGP représente environ 1% à 3% des protéines plasmatiques totales. Elle présente une homologie de séquence de 75% avec les immunoglobulines (Schmid *et al.*, 2002) et joue le rôle de protéine porteuse pour les composés endogènes lipophiles basiques et neutres comme les hormones stéroïdiennes ou les xénobiotiques (Kremer *et al.*, 1988). Les taux d'AGP peuvent considérablement varier en réponse à des maladies, notamment chez les patients infectés par des virus ou des bactéries ou les valeurs peuvent monter jusqu'à 2,8 g/L (Voulgari *et al.*, 1982). De plus, l'alpha-1-glycoprotéine acide est exprimée à des taux plus bas chez le fœtus (0,15 g/L) que chez la mère (0,5 g/L), ce qui donne par exemple une fraction libre plus élevée du Propranolol et de la Lidocaïne, dans le sang néonatal que dans le sang maternel (Wood and Wood, 1981). Il a été montré que les taux plasmatiques d'AGP sont inversement corrélés avec le fu de l'Alprénolol (Piafsky and Borgå, 1977), le Docétaxel (Loos *et al.*, 2003), le Disopyramide (Bredesen and Kierulf, 1986), l'Imipramine et le Propranolol (Piafsky *et al.*, 1978). Des différences significatives dans le fu de Disopyramide entre les populations noir (Johnson and Livingston, 1997), chinoise (Zhou *et al.*, 1990) et blanche suggèrent des variations du niveau d'AGP au sein

de ces populations (Huang and Ung, 2013). Selon une étude clinique menée en 2003, l'AGP pourrait être utilisée comme un biomarqueur prédictif de survie chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules traités par Docétaxel (Bruno *et al.*, 2003).

Compte tenu de la pertinence clinique et de l'impact du fu sur la disposition des médicaments (Summerfield *et al.*, 2006), le transport actif (Bow *et al.*, 2006), les interactions médicamenteuses (Christensen *et al.*, 2006) et l'efficacité du médicament, notamment dans le domaine de la chimiothérapie et des maladies infectieuses (Boffito *et al.*, 2003; F Zhang *et al.*, 2012), il est évident que la liaison des composés aux protéines plasmatiques doit être étudiée dans les premières étapes du processus de découverte de médicaments. Les méthodes existantes pour la détermination de la liaison aux protéines plasmatiques ont pour la plupart une faible capacité de débit, un coût élevé et manquent de procédures d'évaluation harmonisées (Di *et al.*, 2017). Les méthodes conventionnelles utilisées pour déterminer la liaison aux protéines plasmatiques comprennent la dialyse à l'équilibre, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation (Bowman and Benet, 2018). Dans la grande majorité des cas, ces expérimentations utilisent des pools de plasma récoltés sur des donneurs sains où les niveaux d'albumine et d'AGP ne sont pas contrôlés. Des méthodes à haut débit ont été décrites utilisant la dialyse à l'équilibre combinée à une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) (Wan and Rehngrén, 2006; Singh *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2017). Même si ces techniques analytiques sont aujourd'hui extrêmement sensibles, la résolution de ces méthodes est limitée par les biais inévitables générés au cours de l'expérimentation : évaporation, fixation non spécifique aux membranes/matériel et nombreuses étapes de pipetage. Ces biais sont particulièrement gênants lors de l'étude de molécules fortement liées aux protéines plasmatiques et présentant des *fup* inférieurs à 0.1%. Pour ce type de molécules très liées, une faible variation dans la détermination du fu a un impact très important sur les prédictions pharmacocinétiques. L'utilisation de composés radiomarqués est une alternative qui permet d'évaluer les biais expérimentaux, si l'entreprise en a la possibilité et les moyens.

En raison des contraintes évoquées ci-dessus, des équipes basées en Allemagne ont développé une technologie plus flexible permettant d'atteindre une résolution plus importante. Leurs kits commercialisés par la société Sovicell utilisent la technologie brevetée « TRANSIL ». Ce nom dérivant de « transition silica » réfère à des billes de silice poreuses et

modifiées en surface, aptes à servir de support pour des molécules ou structures biologiques telles que des protéines, des enzymes et des membranes. Concernant la détermination du fup, les billes sont recouvertes soit d'albumine (HSA) soit d'AGP ou d'un mélange de ces deux protéines. Ainsi trois variantes de kits sont proposées par Sovicell :

1- Le « TRANSIL<sup>XL</sup> PPB Binding kit » est utilisé pour prédire le fup en mesurant l'affinité du médicament pour la HSA et l'AGP de manière simultanée et en un seul essai. Dans ce kit, chaque bille est fonctionnalisée au ratio ALB/AGP physiologique (24 :1). C'est le plus utilisé des trois.

2- Les kits « TRANSIL<sup>XL</sup> HSA » et « TRANSIL<sup>XL</sup> AGP » sont particulièrement utiles pour modéliser la liaison plasmatique sous différents états physiologiques ou pathologiques. Ces kits génèrent des « inputs » (constantes de dissociation) utilisables dans les logiciels PBPK pour étudier par exemple l'impact de la variation des taux plasmatiques en AGP et HSA sur les populations. Les billes sont ici coatées avec une seule protéine : soit avec l'albumine soit avec l'AGP.

3- Enfin le « TRANSIL<sup>XL</sup> High Sensitivity Binding kit », conçu pour les molécules fortement liées aux protéines plasmatiques et présentant des fup inférieures à 0.1%. Il est particulièrement adapté aux médicaments hautement lipophiles et aux molécules qui ont tendance à se lier de manière non spécifique aux membranes de dialyse. Les problèmes de solubilité semblent également être moins nombreux avec ce kit en comparaison des méthodes conventionnelles dont la dialyse à l'équilibre.

*b) La liaison aux microsomes ou aux hépatocytes : fumic et fuhep*

Lors des études de stabilité métabolique utilisant des microsomes ou des hépatocytes, la disparition du composé parent est mesurée au cours du temps afin d'estimer la clairance intrinsèque. La vitesse de déplétion dérivée de ces expériences reflète totalement la clairance intrinsèque seulement si le composé est entièrement libre pour interagir avec les enzymes du métabolisme. Ce n'est cependant pas toujours le cas. Les composés tendent en effet à se lier aux membranes microsomales ou hépatocytaires, ce qui peut réduire considérablement la concentration disponible, jusqu'à 1/100<sup>ème</sup> de la concentration totale dans l'incubation pour les molécules très liées (Obach, 1999; McLure *et al.*, 2000; Austin *et al.*, 2002; Hallifax and

Houston, 2006). Par conséquent, il peut être important d'estimer la liaison des molécules aux microsomes (fumic) ou aux hépatocytes (fuhep) dans les incubations dans le but de corriger les clairances déterminées *in vitro*. Les fumic) ou fuhep sont le plus souvent déterminées dans des systèmes de dialyse. Sur le même principe que la détermination du fup, ces dispositifs permettent d'estimer la fraction de la molécule non liée aux microsomes ou aux hépatocytes et donc apte à traverser la membrane de dialyse. Afin de prévenir le métabolisme et de maintenir les microsomes ou les hépatocytes sous forme inactives, l'expérimentation se déroule sans co-facteur et/ou en présence d'inhibiteurs des CYP et des UGT. Pour atteindre un équilibre, la dialyse exige des incubations longues parfois problématiques pour les composés instables (hydrolyse) ou peu solubles (précipitation). De plus, les fumic ou les fuhep sont spécifiques de la concentration en microsomes ou en hépatocytes utilisée dans le dispositif de dialyse et peuvent s'avérer inutiles si le design des études de stabilité métabolique est modifié en aval de leur détermination.

De plus, la liaison aux hépatocytes ou aux microsomes lors des études *in vitro* réduit non seulement la concentration de médicament libre et disponible pour être métabolisée par les enzymes (CYP ou UGT), mais elle minimise également de fait la concentration disponible pour inhiber ces enzymes. Il a été démontré que l'affinité pour le système *in vitro* peut entraîner la sous-estimation de la puissance d'un inhibiteur (et donc une surestimation des valeurs IC50 ou Ki), en particulier pour les médicaments basiques lipophiles (Obach *et al.*, 2007). Cela peut ainsi conduire à une sous-estimation du risque d'interactions médicamenteuses. La détermination du fumic et fuhep sera alors utile pour affiner les études portant sur l'évaluation du potentiel inhibiteur d'un produit en développement.

Afin de tester une alternative aux systèmes de dialyse utilisés en interne, nous avons choisi d'étudier le kit « TRANSIL<sup>XL</sup> Microsomal Binding assay » qui permet d'évaluer l'affinité des molécules pour les membranes microsomales. Dans ce kit, l'affinité est définie comme le coefficient de distribution de la molécule entre la phase lipidique (billes recouvertes d'une bicouche lipidique) et la seconde phase représentée par le tampon. A partir d'une feuille de calcul et de l'algorithme fourni, le coefficient de distribution qui est une constante physico-chimique, offre la flexibilité de pouvoir estimer la liaison des médicaments en fonction de n'importe quelle concentration en microsomes ou hépatocytes.

### *c) Objectif :*

L'objectif de ce travail était de tester la méthode Transil<sup>XL</sup> pour la première fois et de l'évaluer en la comparant à la méthode « gold standard » représentée par la dialyse à l'équilibre. La fraction libre plasmatique (fup) a ainsi été déterminée et comparée entre ces deux méthodes (TRANSIL<sup>XL</sup> PPB et dialyse) tandis que la fraction libre microsomale (f<sub>mic</sub>) a été déterminée par le kit « TRANSIL<sup>XL</sup> Microsomal Binding assay » et comparée aux données de la littérature.

Cette étude a mis en évidence les avantages et limitations de chacune des méthodes et nous a apporté de nouvelles connaissances permettant d'orienter de manière plus pertinente les composés difficiles à étudier. Les molécules testées ont des structures diverses et présentent un large éventail de propriétés physico-chimiques. Elles ont été judicieusement sélectionnées en raison de leur métabolisme car elles composeront également le « dataset » des études suivantes (prédiction de la clairance).

## 2. Matériels et Méthodes

### *a) Molécules et réactifs*

Un total de 34 molécules commandées chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) a été testé dans cette étude. Leurs caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le tableau 1.

Les kits Transil<sup>XL</sup> ont été obtenus chez Sovicell (Leipzig, Allemagne) et les systèmes « RED Device » permettant de réaliser les dialyses à l'équilibre proviennent de chez Thermo Fisher Scientific. Tous les autres produits chimiques et réactifs (PBS, DMSO, solvants, etc...) utilisés ont été commandés à partir de sources commerciales usuelles, distribués par Thermofisher (Waltham, MA) et commandés sous le plus haut grade de pureté disponible.

b) Détermination du fup et fomic avec les kits Transil<sup>XL</sup>

Le kit « TRANSIL<sup>XL</sup> PPB Binding kit » et le kit « TRANSIL<sup>XL</sup> Microsomal Binding assay » traités dans ce paragraphe reposent sur le même principe :

La fraction libre plasmatique ou microsomale est déterminée en incubant une concentration fixe de composé dans des concentrations variables de lipides (fomic) ou de protéines plasmatiques (fup) immobilisés sur des billes de silice. Une rangée de 8 puits est nécessaire pour déterminer le fomic ou le fup (Figure 22). Six puits contiennent une quantité croissante de billes fonctionnalisées alors que les deux puits restants ne contiennent que du tampon et sont utilisés comme références pour tenir compte d'une éventuelle fixation non spécifique. En utilisant la feuille de calcul et l'algorithme fournis avec le kit, les valeurs de fup ou de fomic sont calculées à partir des concentrations de composé libre (non lié aux billes) mesurées dans le surnageant de chacun des 8 puits.

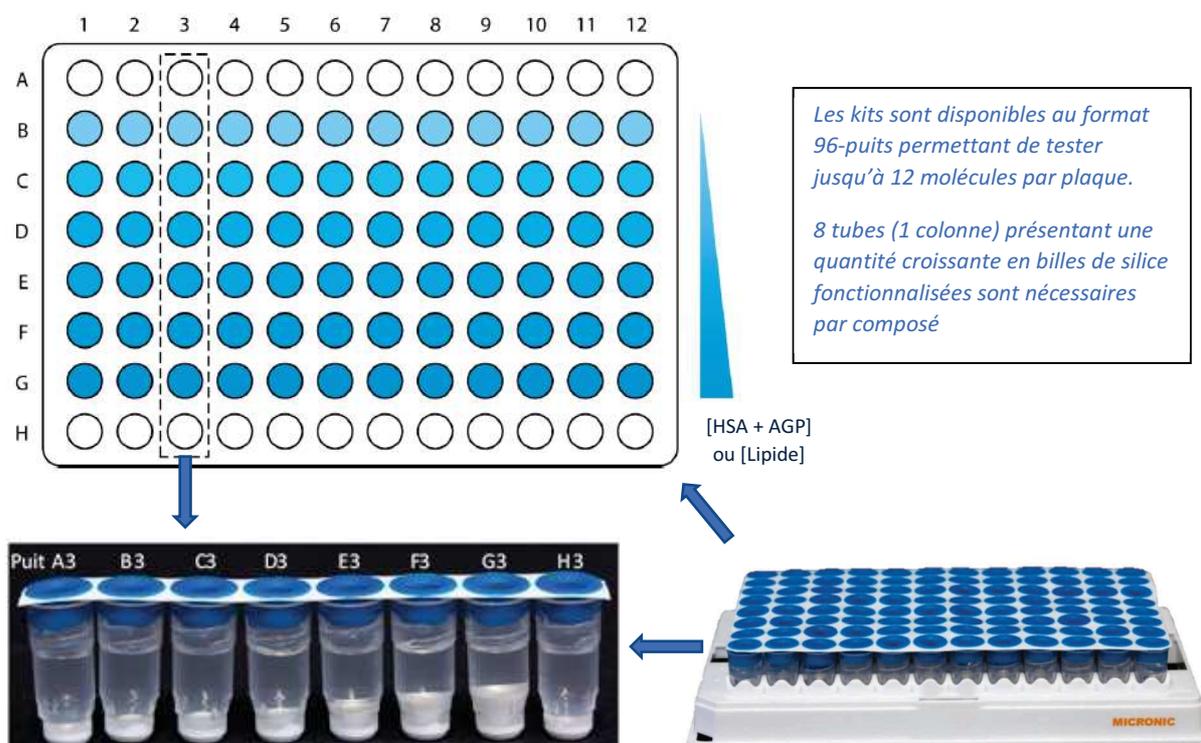


Figure 22 : Illustration des kits et de la technologie Transil<sup>XL</sup>.

Les billes du kit PPB destiné à estimer le fup sont recouvertes d'un mélange d'albumine humaine et d'AGP. Les billes ont été fonctionnalisées avec ces protéines en respectant un ratio de coating de 24 molécules d'HSA pour 1 molécule d'AGP, correspondant aux concentrations physiologiques.

Le kit « *TRANSIL<sup>XL</sup> Microsomal Binding assay* » estime quant à lui l'affinité des molécules pour les membranes des microsomes. Les billes sont recouvertes d'une bicouche de phospholipides reconstituée artificiellement pour mimer la composition naturelle des microsomes humains. L'algorithme utilise la quantité de phospholipides présente dans 1 mg de microsomes humains pour estimer le fup.

Bien que la composition des billes diffère, le protocole est identique entre les deux kits. La méthodologie est donc décrite conjointement dans ce paragraphe.

### **Protocole :**

***Préparation des plaques.*** Au minimum 3h avant leur utilisation, les kits ont été décongelés à température ambiante afin d'atteindre une température de travail comprise entre 20 et 25°C. Les plaques ont ensuite été centrifugées 10 secondes à 750g pour s'assurer de récolter tout le liquide et toutes les billes de silice au fond des tubes.

***Préparation et ajout des composés à tester.*** Afin de concorder avec les futures études de stabilité métabolique et de prédiction de clairance, la fraction libre de tous les composés a été déterminée pour une concentration finale de 1µM. Une solution stock à 16µM (16x) dans du PBS contenant 32% de DMSO a d'abord été préparée pour chaque molécule. Quinze µL de cette solution ont ensuite été ajoutés dans chacun des 8 tubes pour atteindre un volume final de 240µL. Ainsi, la concentration finale en composé est de 1µM avec une teneur en DMSO ne dépassant pas 2%.

***Incubation et prélèvement des surnageants.*** Après agitation manuelle pour s'assurer que toutes les billes étaient en suspension, les plaques 96 puits contenant les colonnes de tubes ont été placées sur un agitateur de plaque (référence 88880023 ThermoFisher Scientific) et incubées 12 minutes à 1000 RPM (température ambiante). Les plaques sont ensuite centrifugées 10 minutes à 750g pour sédimenter les billes qui étaient en suspension. Le

surnageant contenant la fraction libre du composé (non liée aux billes de silice) est ensuite récolté pour être dosé.

**Quantification.** Après dilution de 50µL de surnageant avec 600µL d'acétonitrile, 40µL d'étalon interne (du Triflupéridol pour le dosage en électrospray positif et du Chloramphenicol pour le dosage en électrospray négatif) ont été ajoutés. Après centrifugation à 3000g pendant 20 minutes, le dosage a été réalisé par chromatographie liquide (UPLC Acquity I-Class – Waters, Milford, MA) couplée à la spectrométrie de masse (Xevo TQ-S mass spectrometer - Waters, Milford, MA). Le débit utilisé était de 0.45 mL/min dans une colonne BEH C18 (2.1mm x 100mm et particules de 1.7µm). La phase A est composée d'eau distillée et 0.1% d'acide formique et la phase B d'un mélange acétonitrile/méthanol (80/20, v/v) supplémenté de 0.1% d'acide formique.

**Remarque sur les réplicats :** Les kits Transil<sup>XL</sup> ont été conçus de telle sorte que la mesure de la fraction libre d'un composé puisse être réalisée sur une seule colonne de 8 puits : 2 puits témoins et 6 puits contenant une quantité croissante de protéines (HSA+AGP) ou de phospholipides. Par conséquent, la fraction libre est en fait mesurée 6 fois par composé. Il n'est donc pas nécessaire de réaliser de duplicate pour obtenir une validité statistique.

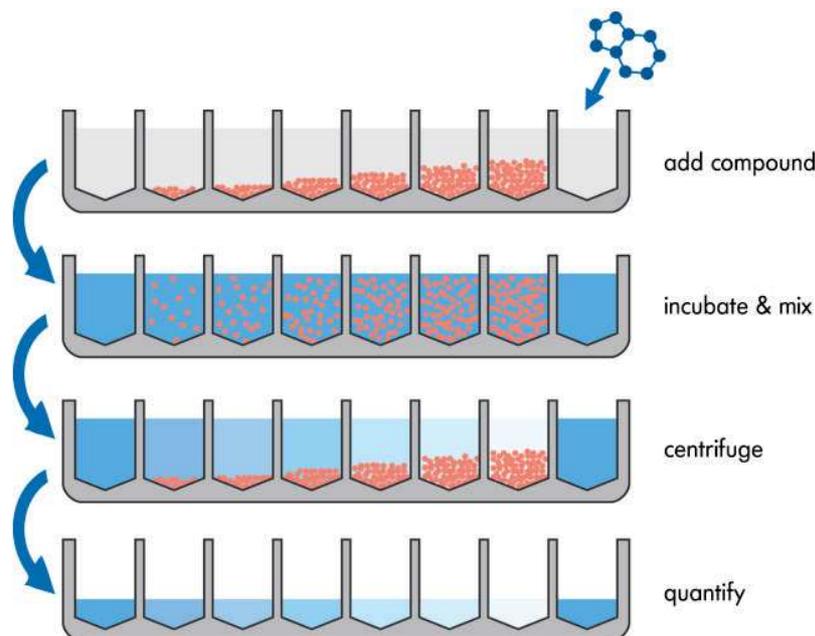


Figure 23 : Kit Transil<sup>XL</sup> workflow : Une même quantité de molécule est ajoutée dans tous les puits avant l'étape d'agitation. Après 12 minutes d'incubation, les billes sont séparées du tampon par centrifugation et le surnageant est ensuite prélevé pour être quantifié.

**Analyses.** Afin de faciliter le calcul de la fraction libre plasmatique ou microsomale, le fabricant des kits Transil<sup>XL</sup> met à disposition un fichier Excel simple à manipuler comprenant toutes les équations nécessaires.

(1) Estimation du fup à partir des données Transil<sup>XL</sup> :

La liaison aux protéines plasmatiques est estimée via la constante de dissociation  $K_D$  :

$$K_D = \frac{[A] \cdot [P]}{[AP]} \quad (1)$$

Où  $[AP]$  est la concentration du composé A liée à la protéine P,  $[A]$  la concentration libre du médicament et  $[P]$  la concentration libre de protéine. Dans le kit *TRANSIL<sup>XL</sup> PPB*, un pseudo  $K_D$  est calculé pour la liaison du composé au mélange d'HSA et d'AGP recouvrant les billes. La concentration libre en médicament peut alors être exprimée comme cela :

$$[A] = f_u \cdot ([A] + [AP]) \quad (2)$$

En réarrangeant les équations (1) et (2), nous obtenons un modèle linéaire permettant d'exploiter les données générées avec le kit Transil<sup>XL</sup> :

$$\frac{f_b}{f_u} = \frac{1}{K_D} \cdot P \quad (3)$$

La fraction plasmatique liée ( $f_b$ ) peut ainsi être prédite à partir des  $K_D$  de l'albumine et de l'AGP en intégrant les concentrations physiologiques de ces protéines plasmatiques dans le calcul :

$$f_b = 1 - \frac{1}{1 + \frac{[HSA]}{K_D^{HSA}} + \frac{[AGP]}{K_D^{AGP}}} \quad (4)$$

La fraction libre plasmatique ( $f_{up}$ ) peut alors être calculée ainsi :  $f_{up} = 1 - f_b$

(2) Estimation du fomic à partir des données Transil<sup>XL</sup> :

L'estimation du fomic par la technologie *TRANSIL<sup>XL</sup>* repose sur un paramètre central : l'affinité membranaire (MA). Il s'agit d'un coefficient de partage défini comme le rapport entre la concentration de composé dans la membrane lipidique ( $C_1$ ) et la concentration de composé dans le tampon/surnageant ( $C_b$ ) :

$$MA = \frac{C_1}{C_b} \quad (1)$$

Cette affinité membranaire peut être calculée à partir des données générées par le kit et en appliquant ce bilan de matière :

$$n_t = c_b \cdot V_b + c_1 \cdot V_1 \quad (2)$$

Où  $V_b$  est le volume de tampon,  $V_1$  le volume de lipide et  $n_t$  la quantité totale de composé.

L'équation (2) peut être réarrangée pour que l'affinité membranaire (MA) puisse être dérivée de la pente obtenue sur la courbe représentant le ratio de la quantité totale de composé sur la concentration mesurée dans le surnageant en fonction de la quantité de lipide présente dans chaque puits:

$$\frac{n_t}{c_b} = \frac{c_1}{c_b} \cdot V_1 + V_b = MA \cdot V_1 + V_b \quad (3)$$

La fraction libre ( $f_u$ ) en présence de microsomes hépatiques est définie comme la quantité de composé libre dans le tampon ( $n_b$ ) sur la quantité totale de composé dans le puits ( $n_t$ ) :

$$f_u = \frac{n_b}{n_t} = \frac{c_b \cdot (V_t - V_1)}{n_t} \quad (4)$$

$V_t$  est le volume total dans le puits de tampon et  $V_1$  le volume de lipides dans la préparation microsomale. De manière similaire à l'équation (2), la quantité totale de produit dans le puits ( $n_t$ ), peut être décrite par ce bilan de matière :

$$n_t = c_b \cdot V_b + c_1 \cdot V_1 = c_b \cdot (V_t - V_1) + c_1 \cdot V_1 \quad (5)$$

L'équation (1) peut être réarranger ainsi :

$$c_1 = c_b \cdot MA \quad (6)$$

En insérant maintenant l'équation (5) et (6) dans l'équation (4), nous obtenons la relation entre l'affinité membranaire et la fraction libre du composé testé :

$$f_u(\text{mic}) = \frac{1}{1 + MA \cdot \frac{V_1}{V_t - V_1}} \quad (7)$$

Le ratio lipides sur protéines dénoté CLP est utilisé pour estimer le fumic dans ce kit. Sa valeur déterminée expérimentalement sur des microsomaux hépatiques humains est de 0.581 $\mu\text{L}$  de lipides par mg de protéines :

$$CLP_{\text{human mic}} = \frac{c_1}{c_p} = 0.581 \frac{\mu\text{l}_{\text{lipid}}}{\text{mg}_{\text{protein}}} \quad (8)$$

Cette donnée physiologique est utilisée pour calculer le volume de lipides  $V_1$  à partir du volume total de l'essai  $V_t$  et de la quantité de microsomes utilisée  $C_p$  lors des études de stabilité :

$$V_1 = CLP \cdot c_p \cdot V_t \quad (9)$$

La constante expérimentale CLP est ainsi utilisée pour extrapoler le fumic en fonction de la concentration de microsomes réellement utilisée lors des études de stabilité.

En utilisant une pipette automatique multicanaux, la durée moyenne de l'expérimentation sur les kits *TRANSIL<sup>XL</sup>* est de 1h30 environ par run (jusqu'à 12 composés analysés simultanément), hors temps de quantification. L'étape la plus délicate est la récolte des surnageants après centrifugation. Il faut effectivement rester vigilant et prendre beaucoup de précautions pour ne pas toucher les billes présentes dans le culot.

Après quantification, les données sont transférées sur la matrice de calcul afin de déterminer la fraction libre plasmatique ou microsomale.

### c) Détermination du *fup* par la dialyse à l'équilibre

Afin de comparer les kits *TRANSIL<sup>XL</sup>* avec une méthode de référence, nous avons parallèlement déterminé la fraction libre plasmatique de 11 molécules par la méthode de dialyse à l'équilibre.

Cette méthode est basée sur une mesure de la diffusion de la fraction libre à travers une membrane semi-perméable. La membrane est caractérisée par une limite d'exclusion permettant de ne laisser passer que les molécules de tailles inférieures à ce « Cut-Off » et de bloquer par exemple les protéines beaucoup plus imposantes. Les systèmes de dialyses ont donc deux compartiments séparés physiquement par une membrane. Le 1er compartiment « plasma chamber » va recevoir le plasma contenant la molécule d'intérêt alors que le second « buffer chamber » contiendra uniquement du tampon dans lequel les molécules libres aptes à diffuser seront quantifiées.

**Protocole.** Pour nos expérimentations, nous avons utilisé les dispositifs de dialyse jetables commercialisés par Thermofisher (Waltham, MA) sous le nom de « RED Device » (référence 99006 MWCO 8K) et avons suivi la procédure décrite par le distributeur. Brièvement, un pool de plasma de 10 donneurs obtenu chez Biopredic International (St Gregoire, France) a d'abord été décongelé puis centrifugé à 2000g pendant 20min. Le plasma (surnageant) a ensuite été aliquoté et les molécules à tester inoculées. À partir de solutions stocks (10mM ou 5mM en DMSO), chaque molécule a été préparée à 1 $\mu$ M finale dans le plasma. Trois cents  $\mu$ L de ce plasma « spiké » ou surchargé ont ensuite été ajoutés dans le compartiment « sample » signalé par un anneau rouge sur les inserts RED device versus 500 $\mu$ L de tampon (PBS pH 7,4) dans le compartiment voisin (Figure 24). Les plaques ont ensuite été scellées d'un film pour prévenir l'évaporation puis placées sur un agitateur réglé sur 300 rpm. L'incubation a été réalisée dans une enceinte thermostatée à 37°C durant 6h. Un temps de 4h est généralement suffisant pour atteindre l'équilibre entre les deux compartiments mais peut différer en fonction des composés ou de la méthode d'agitation utilisée.

Après incubation, le contenu de chaque compartiment a été soigneusement mélangé en faisant des allers-retours à la pipette. Cinquante  $\mu$ L du compartiment contenant le plasma ont été prélevés, aliquotés puis dilués avec 50 $\mu$ L de PBS propre (dilution 1:1). Similairement, 50 $\mu$ L du

second compartiment ont été dilués avec 50µL de plasma frais afin d’obtenir une matrice similaire avant quantification.

Cette étape de « Matrix-matching » permet d’éliminer la nécessité de réaliser deux courbes de calibration séparées (une pour le PBS et l’autre pour le plasma).

Après dilution avec de l’acétonitrile et ajout des étalons internes, la concentration du composé d’intérêt a été déterminée dans les deux compartiments en suivant une procédure de quantification identique aux kits *TRANSIL<sup>XL</sup>* (LC-MS/MS).

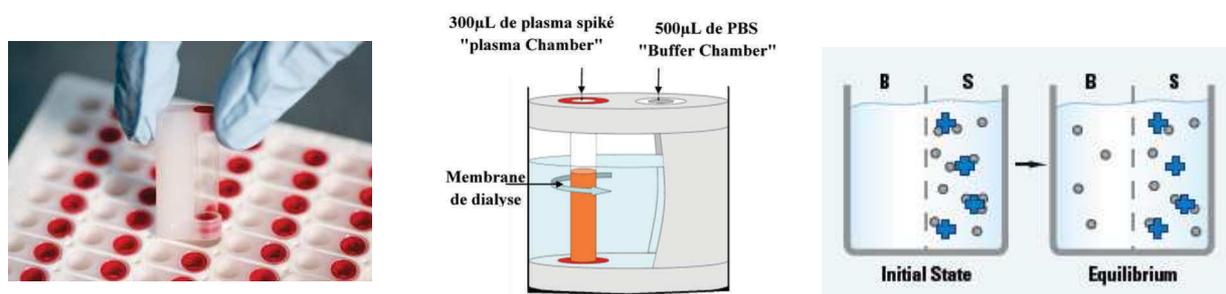


Figure 24 : Illustrations du dispositif de dialyse à l'équilibre RED device (Rapid Equilibrium Dialysis) - B : « buffer chamber » et S : « plasma chamber »

**Analyses.** Contrairement au kit *TRANSIL<sup>XL</sup> PPB* qui se base sur la constante de dissociation  $K_D$  pour estimer le  $f_{up}$ , la dialyse à l'équilibre est une méthode de détermination directe. La quantification du composé dans la « buffer chamber » est une mesure de la fraction qui a pu diffuser à travers la membrane semi-perméable durant l'expérimentation. La fraction liée aux protéines plasmatiques ne peut en effet pas diffuser et demeure donc dans le compartiment contenant le plasma. Le  $f_{up}$  peut alors être déterminé par le calcul suivant :

$$f_{up} = \frac{\text{Concentration dans la "buffer chamber"}}{\text{Concentration dans la "plasma chamber"}}$$

Remarque : Les fractions libres plasmatiques déterminées in-house par la méthode de dialyse ont été mesurées à minima en duplicate. Le pourcentage de « recovery » a été vérifié et utilisé comme contrôle pour estimer la perte du produit (ex : fixation non spécifique au matériel) et l'évaporation.

### 3. Résultats

#### a) *Corrélation des valeurs de fraction libre plasmatique ou microsomale obtenue avec les technologies de dialyse à l'équilibre et Transil<sup>XL</sup>*

Un total de 34 composés a été testé pour évaluer et comparer la technologie Transil<sup>XL</sup> à la méthode de dialyse à l'équilibre citée comme référence. Le tableau 1 liste les molécules utilisées et leurs propriétés physico-chimique associées :

Nom du composé	PM	Classification	logP	Fraction libre plasmatique <b>fup</b>			Fraction libre microsomale <b>fumic</b> [1mg/mL]	
				Dialyse littérature	Dialyse in-house	Transil <sup>XL</sup>	Dialyse littérature	Transil <sup>XL</sup>
Diclofenac	296.1	Acide	4.49	0.005	0.003	0.002	0.87	0.741
Tolcapone	273.2	Acide	4	0.0012	-	0.003	0.67	0.656
Warfarine	308.3	Acide	3.03	0.015	0.005	0.006	0.925	0.991
Tolbutamide	270.3	Acide	2.82	0.05	-	0.035	0.97	0.981
Amiodarone	645.3	Base	7.6	0.04	-	0.030	0.002	0.043
Dronedarone	556.8	Base	7.3	0.003	-	0.021	-	-
Terfenadine	471,7	Base	7.1	0.03	-	0.047	0.015	0.023
Astemizole	458,6	Base	5.8	0.033	-	0.039	0.016	0.059
Mibefradil	495.6	Base	5.3	0.005	0.004	0.003	0.04	0.039
Chlorpromazine	318,9	Base	5.23	0.05	-	0.112	-	-
Loratidine	382,9	Base	5.2	0.02	-	0.006	-	-
Amitriptyline	277.4	Base	4.91	0.07	-	0.109	0.31	0.543
Aripiprazole	448.4	Base	4.55	0.01	-	0.014	-	-
Carvedilol	406.5	Base	4.19	0.02	-	0.011	0.11	0.084
Nicardipine	479.5	Base	3.8	0.01	-	0.012	0.04	0.105
Bosentan	551.6	Base	3.7	0.037	0.003	0.006	0.97	0.807
Propranolol	259.4	Base	3.44	0.13	0.144	0.088	0.45	0.413
Clozapine	326.8	Base	3.23	0.055	-	0.080	0.305	0.307
Pioglitazone	356,4	Base	2.3	0.01	-	0.004	-	-
Naloxone	327.4	Base	2.09	0.54	-	0.647	0.87	0.941
Aprepitant	534.4	Neutre	4.8	0.05	-	0.008	-	-
Ketoconazole	531,4	Neutre	4.35	0.006	-	0.018	0.235	0.303
Isradipine	371.4	Neutre	4.3	0.04	-	0.019	0.34	0.198
Lovastatin	404.5	Neutre	4.26	-	-	-	0.15	0.982
Triazolam	343.2	Neutre	3.87	0.1	0.120	0.058	0.795	0.850
Felodipine	384.3	Neutre	3.86	0.0048	-	0.044	0.07	0.024
Midazolam	325.8	Neutre	3.42	0.03	0.017	0.010	0.535	0.738
Diazepam	284.7	Neutre	2.82	0.023	0.013	0.007	0.625	0.761
Oxazepam	286.7	Neutre	2.24	0.04	0.057	0.050	0.62	0.627
Nifedipine	346.3	Neutre	2.2	0.044	-	0.021	0.705	0.273
Alprazolam	308.8	Neutre	2.12	0.29	0.251	0.149	0.845	0.906
Zolpidem	307.4	Neutre	1.2	0.08	0.063	0.078	0.87	0.970
Antipyrine	188.2	Neutre	0.38	0.93	-	0.787	-	-
Caféine	194.2	Neutre	-0.07	0.67	-	0.701	0.975	0.818

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques et fractions libres (fup et fumic) expérimentales

Les valeurs des fractions libres plasmatiques ou microsomaux mesurées à l'aide des kits Transil<sup>XL</sup> ou du RED Device (dialyse) sont également reportées sur le tableau 1. Une large gamme de propriétés physico-chimiques ont été représentées : leur poids moléculaire (PM) varie de 188 à 521 g/mol et le coefficient de partage (logP) reflétant le caractère lipophile des molécules se situe entre -0.07 et 7.6 (très lipophile). Les molécules ont également été classées en fonction de leur état d'ionisation à pH sanguin (pH 7.4) : 16 molécules sur 34 sont des bases, 4 sont acides et 14 composés sont neutres.

Les fup de 33 molécules ont été déterminées avec le kit Transil<sup>XL</sup> PPB alors que 11 composés ont été testés en dialyse à l'aide du RED Device. Pour le test de dialyse à l'équilibre, le « recovery » a été déterminé en comparant la concentration initiale (T0) à la somme des concentrations mesurées en fin d'expérimentation dans chacun des 2 compartiments du RED Device. Concernant les composés testés par nos soins, le « recovery » était toujours compris entre 80 à 120%, ce qui est accepté pour ce type d'étude. Les valeurs de fup des composés non testés en dialyse ont été collectées et compilées à partir de différentes sources (Obach *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2008; van Liempd *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2017). Lorsque celles-ci étaient disponibles, les données générées par nos expérimentations ont été préférées à celles de la littérature pour la comparaison des deux méthodes.

Les fractions libres microsomaux (f<sub>mic</sub>) ont quant à elles été estimées via le kit Transil<sup>XL</sup> pour 27 molécules et comparées aux données de la littérature obtenues par Dialyse (Nair *et al.*, 2016; Nagar and Korzekwa, 2017).

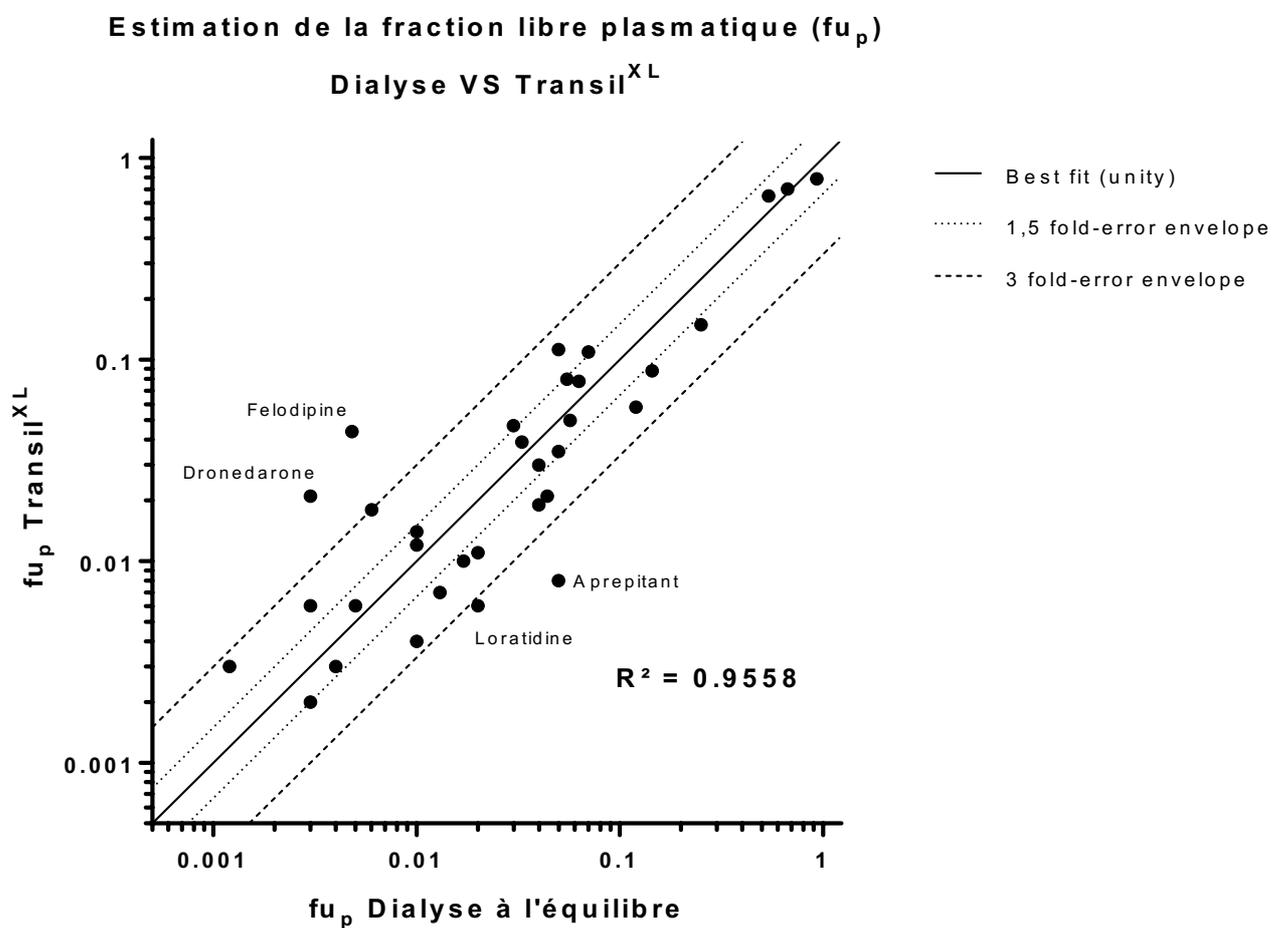
### **Détermination du fup et analyse comparative : Dialyse vs Transil<sup>XL</sup>.**

Les fup déterminés à l'aide du kit Transil<sup>XL</sup> varient de 0.002 à 0.79 tandis que les valeurs se situent entre 0.0012 et 0.93 lorsque la dialyse est utilisée. En d'autres termes, cela signifie que les molécules de notre dataset testées en dialyse sont liées pour le minimum à 7% (Antipyrine) aux protéines plasmatiques et à plus de 99.9% (Tolcapone) pour le composé possédant le plus d'affinité. Cet ordre de magnitude qui varie de près de 1000 fois confirme la diversité de notre panel en termes d'affinité pour les protéines plasmatiques.

Une forte corrélation ( $R^2 = 0.96$ ) a été observée entre les fractions libres plasmatiques obtenues par dialyse à l'équilibre et celles déterminées par la technologie Transil<sup>XL</sup> (Fig. 25).

Au total, 29 des 33 composés testés avec le kit Transil<sup>XL</sup> (soit 88%) ont donné des valeurs de  $f_{up}$  dans une enveloppe de 3 en comparaison des fractions libres mesurées en dialyse. Parmi les quatre composés présentant des écarts supérieurs à 3, les  $f_{up}$  de deux molécules (Loratidine et Aprepitant) étaient sous-estimées par le kit Transil<sup>XL</sup> tandis que l'affinité de deux molécules était surestimée (Dronedarone et Felodipine) par rapport à la dialyse. Il est intéressant de noter que ces quatre molécules qui présentent l'écart le plus important ont toutes un  $\log P$  supérieur à 3.5.

Figure 25 : Détermination de la fraction libre plasmatique : Comparaison Dialyse à l'équilibre vs Transil<sup>XL</sup>



L'analyse statistique a porté sur deux paramètres : l'AFE (Average Fold Error : si  $AFE > 1$  tendance à surestimer ; si  $AFE < 1$  tendance à la sous-estimation) et le AAFE (Absolute Average-Fold Error) qui permet d'évaluer le biais global entre deux méthodes. Sur notre dataset complet ( $n=33$ ), l'AFE de 0.991 est très proche de l'unité et signifie qu'il n'y a pas de tendance globale à la sur- ou sous-estimation. Enfin, nous obtenons un AAFE intéressant de 1.89

correspondant au biais moyen (fold-difference) entre la méthode Transil<sup>XL</sup> et la dialyse à l'équilibre. Ces données sont résumées dans le tableau suivant :

fup determination	% ≤ 1.5-fold change	% ≤ 2-fold change	% ≤ 3-fold change	AFE	AAFE	R <sup>2</sup>
<b>All predictions (n = 33 compounds)</b>						
Dialyse vs Transil <sup>XL</sup>	42	64	88	0.991	1.89	0.956

### Détermination du fup et analyse comparative : Dialyse vs Transil<sup>XL</sup>.

Les fup déterminées à l'aide du kit Transil<sup>XL</sup> varient de 0.023 à 0.99 tandis que les valeurs se situent entre 0.002 et 0.98 lorsque la dialyse est utilisée. Cette analyse qui a portée sur 27 composés montre tout d'abord que l'affinité pour les microsomes est bien inférieure à celle pour les protéines plasmatiques : seulement 7 composés se lient à plus de 10% aux microsomes (1mg/mL).

Une corrélation  $R^2 = 0.70$  a été observée entre les fractions libres microsomales obtenues par dialyse à l'équilibre et celles déterminées par la technologie Transil<sup>XL</sup> (Fig. 26 présentée sur la page suivante). Le coefficient de détermination  $R^2$  augmente et atteint 0.87 lorsque nous excluons la Lovastatine qui semble présenter des valeurs de fup très discordantes. Au total, 21 des 27 composés testés avec le kit Transil<sup>XL</sup> (soit 89%) ont donnés des valeurs de fup dans une enveloppe de 3 en comparaison des fractions libres microsomales mesurées en dialyse. De plus, les fup de 67% et 78% des composés sont respectivement estimées avec un écart inférieur à 1.5 et 2 fois à ceux déterminés par dialyse. Parmi les six composés présentant des écarts supérieurs à 3, l'Amiodarone est la molécule qui présente le plus grand écart : fup de 0.002 en dialyse versus fup de 0.04 via le kit Transil<sup>XL</sup>. Cette molécule très lipophile présente un logP très élevé, le plus haut du dataset (logP=7.4).

L'analyse statistique portant comme pour le fup sur l'AFE et l'AAFE (Absolute Average-Fold Error) révèle que le kit Transil surestime très légèrement (AFE= 1.246) les valeurs de fup par rapport à la technique de dialyse. Enfin, l'AAFE de 1.61 est proche de la valeur statistique observée pour les fup : la différence d'estimation du fup entre la méthode Transil<sup>XL</sup> et la dialyse à l'équilibre semble donc relativement faible :

fup determination	% ≤ 1.5-fold change	% ≤ 2-fold change	% ≤ 3-fold change	AFE	AAFE	R <sup>2</sup>
<b>All predictions (n = 33 compounds)</b>						
Dialyse vs Transil <sup>XL</sup>	67	78	89	1.246	1.61	0.703

## Estimation de la fraction libre microsomale ( $f_{u_{mic}}$ )

### Dialyse VS Transil<sup>XL</sup>

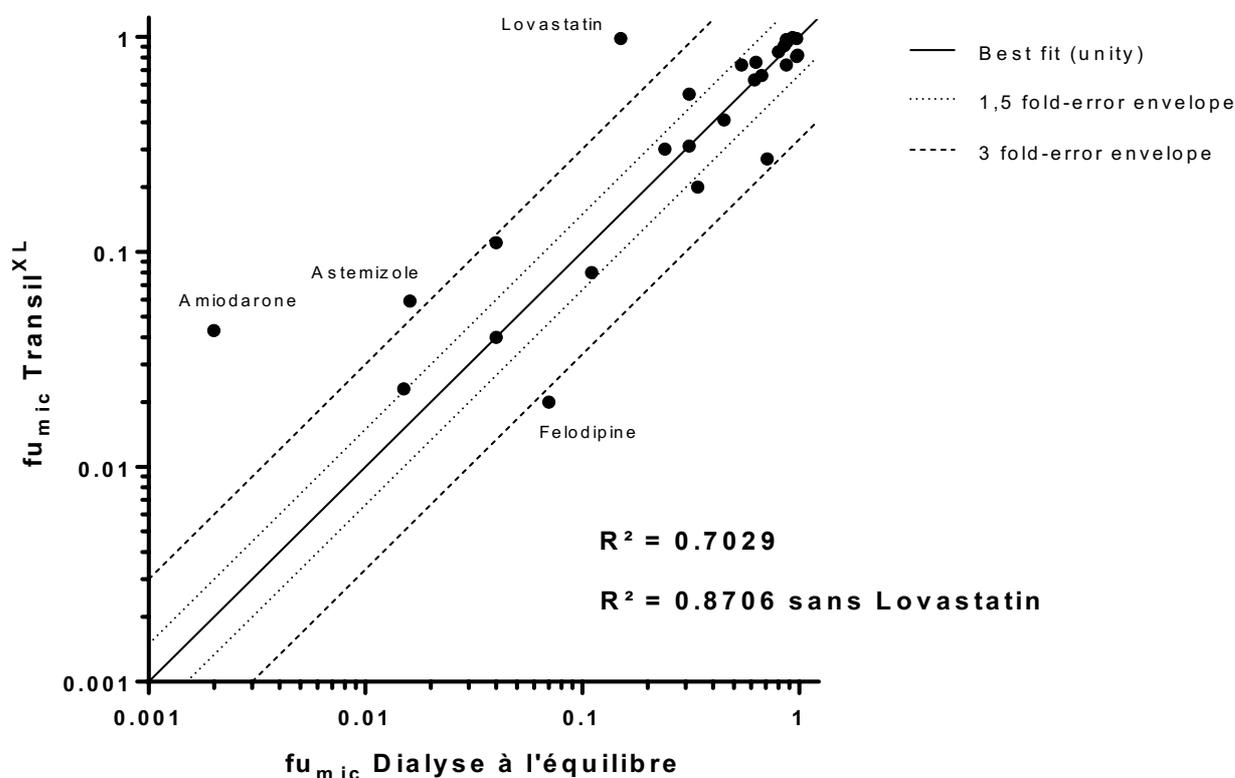


Figure 26 : Détermination de la fraction libre microsomale : Comparaison Dialyse vs Transil<sup>XL</sup>

#### 4. Discussion

L'importance de la détermination des fractions libres pour corriger les paramètres pharmacocinétiques générés *in vitro* en vue de les extrapoler à *in vivo* fait consensus au sein de la communauté scientifique. Cependant l'harmonisation des techniques et des protocoles reste un enjeu majeur tant les points de vue et les méthodologies pour considérer les  $f_u$  divergent encore.

Au cours de cette étude, nous nous sommes d'abord focalisés non pas sur l'utilisation mais sur l'estimation expérimentale de ces paramètres. Nous traiterons de l'exploitation des  $f_u$  dans les prochaines études. La détermination des valeurs de  $f_u$  traitée ici est toute aussi importante tant ces paramètres (et en particulier le  $f_{up}$ ) peuvent impacter les prédictions pharmacocinétiques. En impactant l'estimation de la clairance *in vitro* ou en conditionnant la diffusion tissulaire d'un médicament *in vivo*, ces fractions libres apparaissent comme des liens

mécanistiques essentiels en pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ces dernières années, on note une demande croissante pour la mesure de la liaison aux protéines plasmatiques (fup) durant les phases précoces de recherche ou « Discovery ». Cependant ces données sont encore majoritairement générées trop tardivement, sur un nombre restreint de molécules appelées « Lead ». Cette difficulté à démocratiser l'estimation précoce du fup est en partie due aux contraintes techniques et économiques reliées aux méthodes de référence: dialyse à l'équilibre, ultrafiltration et ultracentrifugation.

Dans cette étude, nous avons comparé la technologie Transil<sup>XL</sup> à la méthode de référence basée sur la dialyse à l'équilibre. L'une des caractéristiques des kits Transil<sup>XL</sup> est que l'estimation ne repose non pas sur une matrice biologique mais sur des billes synthétiques fonctionnalisées de manière parfaitement contrôlée. Par ce procédé nous pouvons espérer réduire la variabilité inter-laboratoire qui est parfois très importante avec la méthode de dialyse. La dialyse à l'équilibre nécessite effectivement des matrices biologiques (plasma ou microsomes) qui ne sont pas inépuisables et dont la composition varie inévitablement entre chaque lot. Ces matrices issues de tissus humains doivent également être contrôlées pour limiter le risque de contamination pour l'expérimentateur. Enfin le plasma et les microsomes ont un coût non négligeable qui s'ajoute au prix du dispositif de dialyse déjà onéreux. Cependant, l'estimation du fup et fup par la technologie Transil<sup>XL</sup> peut aussi soulever des incertitudes. Lorsque la valeur de fup obtenue par ce système synthétique (Transil<sup>XL</sup>) est comparée à la dialyse à l'équilibre qui utilise du plasma humain, nous pouvons effectivement nous attendre à des divergences en raison des différences suivantes :

Tout d'abord, les kits Transil<sup>XL</sup> PPB sont basés sur des protéines purifiées, par conséquent tous les sites de liaisons sont théoriquement disponibles. A l'inverse le plasma utilisé en dialyse a une composition beaucoup plus complexe et peut contenir des composés endogènes pouvant masquer certains sites de liaison. Par ce constat, le fup déterminé via le kit Transil peut être sous-estimé. Ensuite, le kit Transil<sup>XL</sup> est un essai combiné basé sur la mesure simultanée des  $K_D$  de l'albumine (HSA) et de l'AGP. L'estimation du fup repose donc sur un calcul basé sur l'abondance physiologique de ces protéines (24 molécules d'HSA pour 1 molécule d'AGP). Cependant ce ratio peut ne pas refléter la composition du plasma choisie pour l'expérience de dialyse. Ainsi des déviations dans les valeurs de fup peuvent être observées entre la technique de dialyse et le kit Transil<sup>XL</sup>, ceci en fonction des donneurs de plasma utilisés.

Enfin, et ceci rejoint les deux points précédents, les kits Transil<sup>XL</sup> PPB ne mesurent que la liaison à l'albumine humaine et à l'alpha-1-glycoprotéine acide (AGP). Ceci peut entraîner une sous-estimation du fup pour les composés aptes à se lier aux lipoprotéines ou à d'autres protéines de faible abondance comme la Transcortine (CBG) et/ou la SHBG (*Sex Hormone-Binding*) qui ne sont pas représentées.

Ces limitations et ces différences entre la dialyse et les kit Transil<sup>XL</sup> sont analogues lors de l'étude de la fraction libre microsomale fomic.

Via nos expérimentations, nous avons challengé la technologie Transil<sup>XL</sup> par l'étude d'un dataset conséquent dans l'objectif de répondre à certaines de ces interrogations. Les 34 composés testés couvrent un large éventail de lipophilicité (log P de -0.07 à 7.6) et une affinité pour les protéines plasmatiques (fup de 0.0012 à 0.93) ou les microsomes (fomic de 0.002 et 0.98) très diversifiée. Une bonne corrélation ( $R^2=0.96$ ) a été observée pour le fup déterminé à l'aide des deux méthodes tandis que le coefficient de détermination était plus faible pour le fomic ( $R^2=0.70$ ), en parti dû à deux « outliers » (Amiodarone et Lovastatine). Les statistiques sont satisfaisantes pour les deux paramètres : 88% des fup estimés par Transil<sup>XL</sup> sont compris dans une fenêtre inférieure ou égale à 3 fois le fup déterminé par dialyse contre 89% concernant le fomic. L'AAFE qui représente le facteur moyen de divergence entre les deux techniques est d'environ 1.9 pour le fup et 1.6 pour le fomic. Lorsque nous nous intéressons aux valeurs des fractions libres, cette statistique signifie par exemple, que pour un fup de 0.010 mesuré en dialyse, nous pouvons nous attendre à estimer un fup situé entre 0.005 ( $\times 1.9$ ) et 0.019 ( $/1.9$ ) avec le kit Transil<sup>XL</sup> PPB. Sachant que les données générées en dialyse et pour une même molécule divergent très souvent d'un facteur de 2 à 3 dans la littérature, la différence observée ici entre les deux méthodes est relativement faible.

Nous avons noté que la méthode Transil<sup>XL</sup> tend à surestimer très légèrement les fomic (AFE=1.25) alors qu'il n'y a pas de différence systématique concernant le fup. De plus, il ne semble pas y avoir de lien entre le fup et le fomic. En d'autres termes, une molécule présentant une forte affinité pour les protéines plasmatiques peut avoir une faible affinité pour les microsomes et inversement (ex : Warfarin, Tolcapone, Diclofenac...). Les figures 27 et 28 présentées sur la page suivante décrivent les fup et fomic de toutes les molécules testées ainsi que le « fold-change » observé entre la dialyse et Transil<sup>XL</sup>. Les molécules sont classées en fonction de leur log P, de la plus lipophile (à gauche) à la plus polaire (à droite).

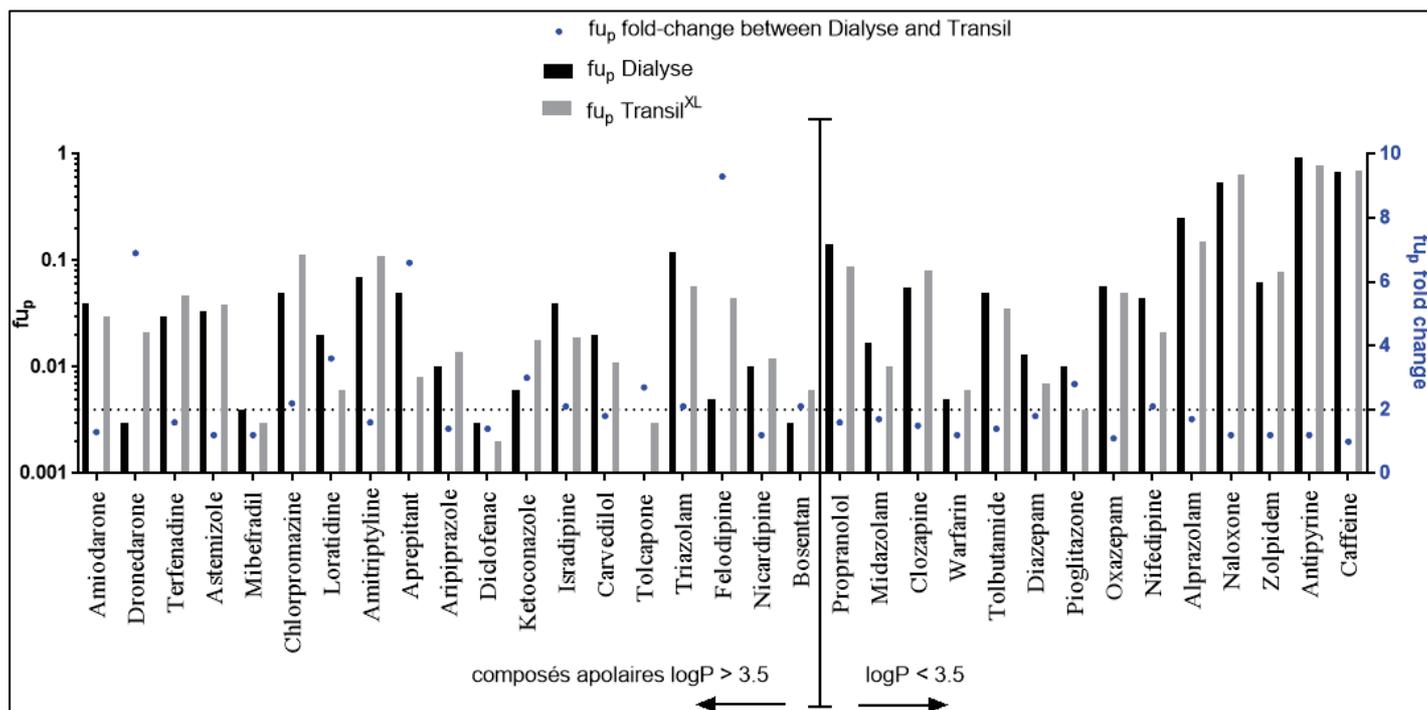


Figure 27 : Comparaison des fractions libres plasmatiques ( $f_{up}$ ) obtenues par Dialyse vs Transil<sup>XL</sup> et indication de l'écart par le fold-change (en bleu) La ligne en pointillée représente un seuil de 2 pour le fold-change

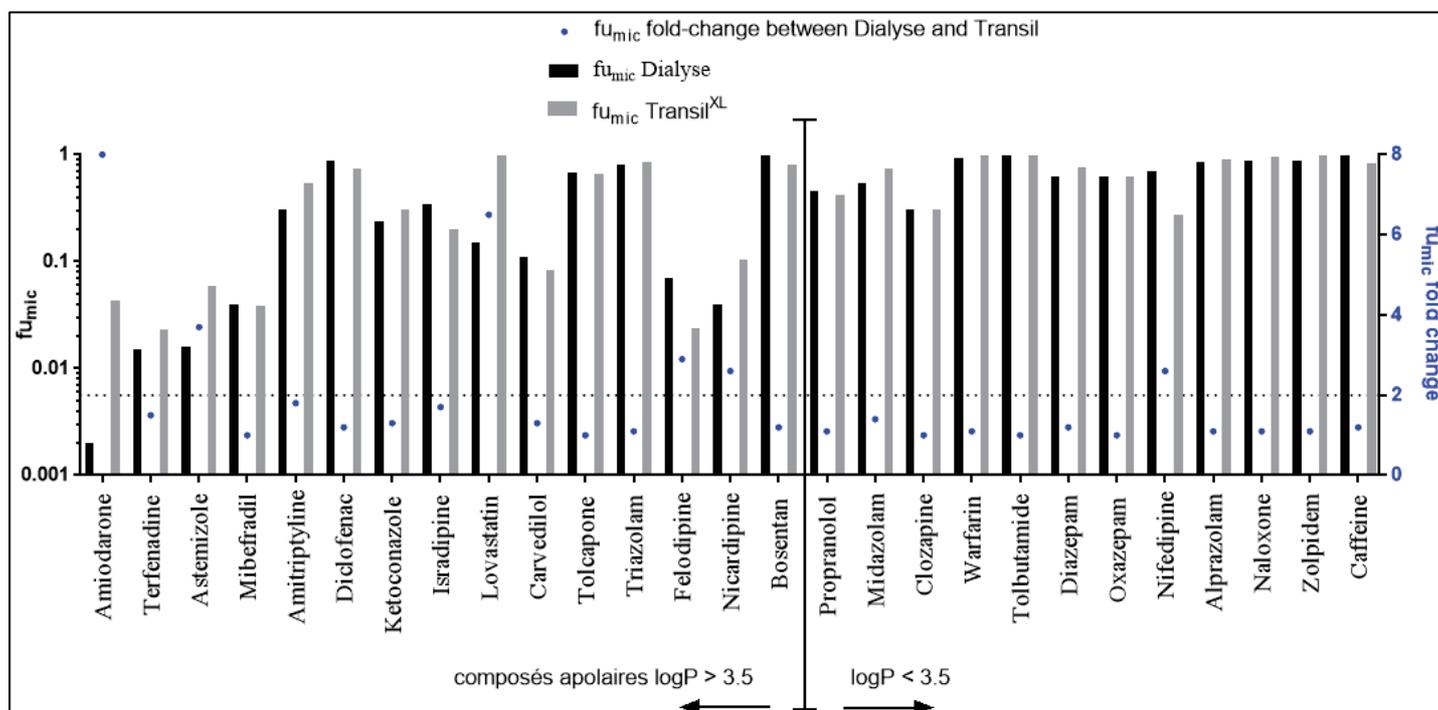


Figure 28 : Comparaison des fractions libres microsomales ( $f_{mic}$ ) obtenues par Dialyse vs Transil<sup>XL</sup> et indication de l'écart par le fold-change (en bleu) La ligne en pointillée représente un seuil de 2 pour le fold-change. Les  $f_{mic}$  ont été obtenu pour une concentration de microsomes à 1mg/mL

Même si les molécules très polaires, peu lipophiles, semblent globalement avoir une affinité moins importante que les molécules fortement lipophiles, la figure 27 souligne que le lien entre le logP et le fup n'est pas si évident. Par exemple, la Warfarine et le Diazepam ont un logP plus faible (logP de 3.0 et 2.8, respectivement) mais une affinité pour les protéines plasmatiques bien plus importante que le Triazolam et l'Amitriptyline (logP de 3.9 et 4.9, respectivement). En revanche, nous pouvons aisément observer que les discordances entre la technologie Transil<sup>XL</sup> et la dialyse à l'équilibre sont plus marquées chez les composés lipophiles : les fup de 10 molécules possédant un logP > 3.5 sont discordants d'un facteur supérieur à 2 (fold-change > 2) contre seulement deux composés lorsque que le logP est inférieur à 3.5. En utilisant le kit Transil<sup>XL</sup> les utilisateurs doivent être conscients que la composition du kit reste artificielle et n'est pas aussi riche que le plasma. Il est cependant difficile d'identifier la méthode la plus appropriée car certains auteurs rapportent un phénomène de fixation non spécifique des composés très lipophile sur la membrane de dialyse (Di *et al.*, 2017).

Concernant la fraction libre microsomale, une tendance plus nette semble se dégager : les 7 molécules sur 27 qui se lient à plus de 90% aux microsomes (f<sub>mic</sub> < 0.1 pour une concentration de microsomes à 1mg/mL) possèdent toutes un logP supérieur à 3.5 (fig. 28). Ainsi, nous pouvons présumer que les composés ayant des logP élevés ont plus d'affinité pour les microsomes que les molécules plus polaires. Toutefois, ceci ne semble pas être une règle absolue car des molécules très lipophiles n'ont pas forcément eu une forte affinité pour les microsomes. C'est le cas du Diclofenac qui avec un logP de 4.5 ne se lie qu'à environ 20% aux microsomes (f<sub>mic</sub> ≈ 0.8 pour 1mg/mL). Même si elles ne sont pas nombreuses, il est également intéressant de noter que la totalité des quatre molécules acides testées dans notre dataset présentent une fraction libre microsomale élevée. Ce qui est en accord avec les observations reportées dans la littérature.

Discutons maintenant des outliers : l'Amiodarone, présente un caractère extrêmement lipophile (logP > 7), a un f<sub>mic</sub> de 0.043 mesuré avec le kit Transil<sup>XL</sup> versus 0.002 en dialyse. L'Amiodarone étant difficile à étudier en raison de sa forte adsorption non spécifique au matériel et des problèmes de LOQ (limite de quantification), cette seule valeur a été reportée chez le rat (Austin *et al.*, 2002). Il serait donc intéressant de mesurer le f<sub>mic</sub> de l'Amiodarone

sur microsomes humains et à l'aide des outils analytiques actuels qui n'était pas aussi performants en 2002. Malgré leur écart, le Transil<sup>XL</sup> et la dialyse permettent tous deux de caractériser l'Amiodarone comme très fortement liée aux microsomes. Enfin, très peu de données sont disponibles concernant la liaison de la Lovastatine aux microsomes. L'unique valeur expérimentale de fumic récoltée par Nagar & Korzekwa (2016) était de 0.15 versus 0.98 dans notre expérimentation avec Transil<sup>XL</sup>. Tout comme l'Amiodarone il serait intéressant de reproduire l'expérimentation à l'aide d'un dispositif de dialyse afin de confirmer ou non cette discordance.

## 5. Conclusion

La dialyse à l'équilibre est la méthode la plus largement acceptée pour évaluer la liaison aux protéines plasmatiques ou aux microsomes, notamment car les effets de liaison non spécifiques sont minimisés par rapport à d'autres méthodes telles que l'ultrafiltration. D'un point de vue technique, il s'agit cependant d'une méthode relativement contraignante. La durée des expérimentations est importante (entre 6 et 24h) et la consommation de matrice biologique est élevée. De plus, les données de fu générées sont propres à la concentration utilisée lors de la dialyse et qui diffère très souvent des concentrations utilisées lors des études de stabilité métabolique. Enfin, les composés très peu solubles et/ou fortement liés et/ou instables dans le plasma peuvent également donner des résultats discordants. Il est ainsi important que la communauté scientifique puisse développer des alternatives pour surpasser ces limitations.

La technologie Transil<sup>XL</sup> testée dans cette étude a démontré son efficacité pour générer des données robustes et comparables à celles obtenues par les méthodes de référence. Le déroulement de l'expérimentation est simple, rapide (1h30 hors dosage) et ne nécessite pas de matériels autres (hors kit) que les molécules à tester. Techniquement, l'étape la plus délicate des kits Transil<sup>XL</sup> est la récolte du surnageant où il faut rester extrêmement vigilant pour ne pas toucher les billes (culot). Il est toutefois possible d'imaginer l'automatisation du test et l'utilisation d'un robot à détection de liquide afin de faciliter cette étape critique. Le principal inconvénient des kits Transil<sup>XL</sup> réside sur la nature artificielle du test qui diverge des matrices biologiques plus complexes (plasma et microsomes) utilisées en dialyse. En utilisant les kits Transil<sup>XL</sup>, il est donc nécessaire d'assumer l'absence de protéines peu abondantes et

peu impliquées dans la liaison des médicaments. Comme l'indiquent nos statistiques, les différences d'estimation ont tendance à être faibles et semble être d'un ordre de grandeur comparable aux variabilités observées inter-laboratoires pour la dialyse.

La fonctionnalisation des billes tout comme la production des kits Transil<sup>XL</sup> suivent un processus robuste et bien rodé qui permet de réduire la variabilité inter-laboratoires. De plus, les effets matrices engendrés par le plasma et les protéines microsomales lors de la quantification par LC-MS/MS ne sont plus observés avec les kits.

Par sa simplicité, son coût et ses performances, nous avons présenté via cette étude, une alternative à la dialyse pouvant être utilisée de façon pertinente dans les phases précoces de recherche en vue de réaliser du criblage haut débit ou « screening ». Au cours des prochains chapitres, nous verrons que l'estimation du  $f_{up}$  en parallèle des études de stabilité métabolique est un outil efficace pour améliorer les prédictions de clairance. La détermination précoce des  $f_u$  peut ainsi participer à générer des prédictions de qualité utilisables pour sélectionner de manière plus efficace les candidats médicaments.

Pour les phases plus tardives, la détermination des fractions libres par dialyse reste essentielle afin de prendre en compte toute la complexité des matrices biologiques. Durant ces phases critiques où toute information est importante, de nouvelles technologies plus flexibles tel que Transil<sup>XL</sup> peuvent être utilisées en complément des méthodes de référence pour surmonter certaines limitations. Les composés lipophiles et/ou extrêmement liés aux protéines plasmatiques ( $f_u < 0.01$ ) peuvent être étudiés plus facilement grâce à ce type d'alternatives (par exemple le « TRANSIL<sup>XL</sup> High Sensitivity Binding kit »). De plus, l'impact de certaines pathologies sur la pharmacocinétique des candidats médicament intéresse de plus en plus les autorités réglementaires. Ces nouvelles méthodes peuvent de ce fait participer à générer des données utilisables dans les modèles PBPK pour modéliser l'impact de la variation des taux plasmatique en AGP et HSA sur la pharmacocinétique des populations.

## 6. Perspectives : Prédiction in silico du fuinc et fuhep

### a) Introduction du rapport de collaboration :

Dans cette dernière partie, nous évoquerons souvent le terme « fuinc » désignant la fraction libre d'un composé durant l'incubation *in vitro*. Ce terme englobe et se réfère simultanément au fuhep et fuinc. Les liens manifestes entre les caractéristiques physico-chimiques des molécules et le fuinc ont permis aux spécialistes de développer des modèles *in silico* permettant de prédire ces fractions libres. En 2002, Austin et ses collaborateurs étaient les premiers à développer un modèle linéaire mettant en relation le fuinc avec le logP ou le logD. Quelques années plus tard, en 2006, Halifax et Houston ont amélioré l'équation en établissant une relation quadratique et non linéaire entre logP/D et fuinc. Plus récemment, Poulin et al., ont développé des modèles mathématiques plus complexes se basant sur la composition biochimique des microsomes et des hépatocytes pour prédire les fuinc (Poulin and Haddad, 2011, 2013a). Puisqu'ils sont dérivés d'hypothèses sur la teneur en lipides microsomaux (ou hépatocytaires) pour prédire les interactions entre les médicaments et ces lipides, les auteurs considèrent ces modèles comme mécanistiques. Comme de nombreuses approches PBPK (Rodgers and Rowland, 2006; Peyret *et al.*, 2010), ce modèle suppose que seules les molécules basiques pourront interagir avec les phospholipides acides et que seuls les composés neutres pourront se lier aux lipides neutres. Ce modèle qui repose sur des composantes physiologiques est plus complexe et nécessite davantage d'inputs que les modèles empiriques d'Austin et d'Halifax. Ainsi, pour l'utiliser, il faudra disposer des valeurs de logP et des pKa de la molécule en plus du fu<sub>p</sub> et du RBP (Blood to Plasma Ratio ou Ratio Sang sur Plasma) pour les bases fortes. Dans un autre registre, Robin Smith, expert DMPK chez AstraZeneca, a récemment présenté une méthode permettant d'estimer le fuhep à partir des données générées sur le kit « TRANSIL<sup>XL</sup> Microsomal Binding assay ». L'astuce consiste à ajuster la quantité de phospholipides lors du calcul final de la fraction libre afin d'utiliser la teneur rapportée dans les hépatocytes qui diffère des microsomes. Le kit Transil<sup>XL</sup> peut ainsi être utilisé pour déterminer le fuinc et le fuhep à partir d'une seule expérimentation. Les modèles *in silico* se basent sur des relations mathématiques parfois très complexes qui sortent de notre champ de compétence. Ainsi, il nous a paru intéressant de nouer une collaboration avec le Dr. Patrick Poulin afin de lui envoyer les données générées avec les kits Transil<sup>XL</sup>. L'objectif étant

de comparer nos résultats expérimentaux aux approches de prédiction *in silico* et de situer les différentes méthodes dans un contexte de prédiction de clairance. Le Dr P. Poulin est l'auteur d'un des modèles *in silico* décrits ci-dessus mais aussi d'une méthode d'extrapolation *In Vitro-InVivo* (IVIVE) en lien avec la clairance dont nous discuterons dans les prochaines études. La synthèse (en anglais) de notre collaboration concernant le fuinc est présentée dans les pages suivantes.

2016



# Prediction of $f_{u,inc}$

## Human PK Prediction Report – Version 1.0

The first objective of this present study was to investigate the prediction of the unbound fraction in the incubation medium ( $f_{u,inc}$ ) for the human microsomes and hepatocytes. The second objective was to compare different prediction models of  $f_{u,inc}$ , whereas the third objective was to compare the  $f_{u,inc}$  determined in the Kit transil (Sovicell kit) and dialysis system (literature data). The method consisted of predicting  $f_{u,inc}$  that were determined in the Kit transil by using different prediction models, namely, the microsome-composition-based model (MCM) as well as the empirical models of Turner, Halifax and Austin. The values of  $f_{u,inc}$  for the Kit transil and the dialysis systems were also compared when possible. The datasets were obtained from Sanofi and the literature. The results indicate that all prediction models of  $f_{u,inc}$  are comparable; however, the model of MCM and Turner are slightly more accurate compared to the other models. The prediction accuracy is the highest for the ionized acids and relatively hydrophilic drugs, whereas the prediction accuracy is the lowest for the strong bases and lipophilic drugs ( $\log P > 4$ ). Therefore, the impact of lipid binding was investigated further. Accordingly, it is remarked that the Kit transil contained much less lipids (phospholipids) compared to the microsomal lipid data obtained from the literature. This discrepancy cannot be explained. However, a discrepancy in the amount of lipids between the Kit transil and the literature may explain why the  $f_{u,inc}$  in the Kit transil are lower than the  $f_{u,inc}$  obtained in the literature particularly for the lipophilic drugs. Similarly, this could also explain why the predicted  $f_{u,inc}$  values are lower than the  $f_{u,inc}$  value of the Kit transil since the studied prediction models were developed based on  $f_{u,inc}$  literature data only. Hence, the MCM model cannot be fully evaluated due to a discrepancy in the lipid content and also because the amount of triglycerides (which are also of relevance) in the Kit transil is not known. Overall, this work would help the understanding of the data generated from the Kit transil.

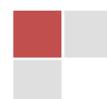


## OUTLINES

<b>Overview and Highlights</b>	<b>page 3.</b>
<b>Section 1:</b> <i>Problem Statement;</i>	<b>page 4.</b>
<b>Section 2:</b> <i>Objectives;</i>	<b>page 4.</b>
<b>Section 3:</b> <i>Overall Benefit;</i>	<b>page 4.</b>
<b>Section 4:</b> <i>Method;</i>	<b>page 5.</b>
<b>Section 5:</b> <i>Results and Discussion;</i>	<b>page 6.</b>
<b>Section 6:</b> <i>Recommendations that may improve the predictions;</i>	<b>page 8.</b>
<b>Section 7:</b> <i>Consultant Informations and Signature;</i>	<b>page 15.</b>

### Abbreviations:

fu<sub>inc</sub>: unbound fraction in microsomes, fu<sub>p</sub>: unbound fraction in plasma, **MCM**: microsome composition-based model, **Log P**: log octanol:buffer ratio, **pKa**: ionization constant.



## TABLES AND FIGURES

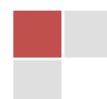
**TABLE 1.** Comparison of the human  $f_{u_{inc}}$  in microsomes determined in the Kit transil and from the literature (dialysis system) for the current datasets of drugs (page 9).

**TABLE 2.** Comparison of the human  $f_{u_{inc}}$  in hepatocytes determined in the Kit transil and from the literature (dialysis system) for the current datasets of drugs (page 9).

**TABLE 3.** Comparative assessment of four calculation methods used to predict human  $f_{u_{inc}}$  in microsomes determined in the Kit transil for the current datasets of drugs (page 10).

**TABLE 4.** Comparative assessment of four calculation methods used to predict human  $f_{u_{inc}}$  in hepatocytes determined in the Kit transil for the current datasets of drugs (page 11).

**TABLE A1.** Drug dataset used for the prediction of the human microsomal  $f_{u_{inc}}^A$ . (page 12).



## Human PK Prediction Report

# Prediction of fu<sub>inc</sub>

## OVERVIEW

### HISTORY

- Prediction of human fu<sub>inc</sub> was investigated.
- Microsomal and hepatocytes data were investigated.
- Datasets of Sanofi and the literature were considered.
- Four prediction models were challenged.
- Data were analyzed and understood.
- Results are presented and discussed.
- Recommendations are provided.
- A complete report was provided to Sanofi.

## HIGHLIGHTS

### COMPOUND NUMBERS

SANOFI AND PUBLISHED  
COMPOUNDS.

### PREDICTION OF FUINC

THE MCM AND TURNER MODELS ARE  
SLIGHTLY MORE ACCURATE.

### OUTCOMES

MOST ACCURATE PREDICTIONS FOR  
THE IONIZED ACIDS.

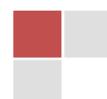
LESS ACURATE PREDICTIONS FOR  
BASES AND LIPOPHILIC DRUGS.

IN GENERAL, THE PREDICTED FUINC  
ARE LOWER THAN FUINC IN KIT  
TRANSIL.

FUINC IN THE LITERATURE ARE ALSO  
LOWER TKAN IN THE KIT TRANSIL.

A DISCREPANCY IN THE LIPID  
CONTENT OF THE MICROSOMES  
BETWEEN THE KIT TRANSIL AND THE  
LITERATURE COULD BE AN  
EXPLANATION OF THE DISCREPANCY  
FOR THE LIPOPHILIC DRUGS.

MICROSOMAL VERSUS HEPATOCYTE DATA  
SAME OUTCOMES



## SECTION 1

### Problem Statement

---

**Problem statement:** Kit transil is designed as a new system to measure the  $f_{u_{inc}}$  in microsomal and hepatocyte incubations. However, there accuracy has not been fully investigated.

---

## SECTION 2

### Objectives

---

- Main objective:** The first objective of this present study was to investigate the prediction of the unbound fraction in the incubation medium ( $f_{u_{inc}}$ ) for the human microsomes and hepatocytes.
- Second objective:** The second objective was to compare different prediction models of  $f_{u_{inc}}$ .
- Third objective:** The third objective was to compare the  $f_{u_{inc}}$  determined in the Kit transil (Sovicell kit) and dialysis system (literature data).
- 

## SECTION 3

### Overall benefit

---

**Overall benefit:** This work predicted the  $f_{u_{inc}}$  in humans, which has the potential to understand the data generated in the Kit transil obtained from Sovicell.

---



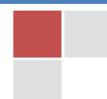
## SECTION 4

### Method

---

**Strategy:** The method consisted of predicting  $f_{u_{inc}}$  that were determined in the Kit transil by using different prediction models, namely, the microsome-composition-based model (MCM) as well as the empirical models of Turner, Halifax and Austin. The values of  $f_{u_{inc}}$  for the Kit transil and the dialysis systems were also compared when possible. The datasets were obtained from Sanofi and the literature.

- (1) Datasets:** the main dataset was provided by Sanofi and other  $f_{u_{inc}}$  data were obtained from a review of the literature (Poulin and Haddad, *J. Pharm. Sci.* 100:4501-17, 2011 and 102:2806-18, 2013) (Appendix).
- (2) Prediction models:** four prediction models were investigated, namely the microsome composition-based model (MCM) and the models of Austin, Halifax and Turner. These models were previously detailed in the literature. (Poulin and Haddad, *J. Pharm. Sci.* 100:4501-17, 2011 and 102:2806-18, 2013).
- (3) Prediction of  $f_{u_{inc}}$ :** the predictions were made separately for the ionized acids, ionized bases, neutral compounds as well as lipophilic drugs ( $\log P > 4$ ) to verify whether there are problematic properties. Microsomal and hepatocyte human data were investigated.



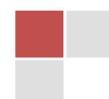
## SECTION 4

### Results and Discussion (1)

The results are presented in the Tables 1, 2, 3 and 4, and are also detailed just below.

#### Main outcomes:

- The  $f_{u_{inc}}$  values of the Kit transil seem to accurately predict the  $f_{u_{inc}}$  values that were measured in a dialysis system from the literature but the datasets are small (Tables 2 and 3). However, some relevant discrepancies were observed. Further discussions are provided just below.
- All predictions models of  $f_{u_{inc}}$  of human microsomes that were determined in the Kit transil are comparable; however, the microsome composition-based model (MCM) and the model of Turner are slightly more accurate compared to the other models (Table 3).
- Prediction accuracy is the highest for the ionized acids and hydrophilic compounds since the binding to lipids had no impact compared to the more lipophilic compounds.
- Therefore, prediction accuracy is the lowest for the strong bases and lipophilic compounds which might be explained as follows:
  - It is observed that the phospholipid content reported for the Kit transil (Smith et al., Poster from AstraZeneca and Sovicell) is much lower than the phospholipid content obtained from the literature for the human microsomes (Poulin and Haddad, J. Pharm. Sci. 100:4501-17, 2011) (deviation by about 3-fold for human, and by about 3.5 fold for the rat). This discrepancy in the phospholipid content cannot be explained.
  - However, such a discrepancy in the phospholipid content between the Kit transil and the literature could explain why all predictions models predicted lower values of  $f_{u_{inc}}$  compared to the observed  $f_{u_{inc}}$  values of the Kit transil particularly for the lipophilic drugs (i.e., AFE values are lower than unity in most cases) (Table 3). All of these prediction models have been developed based on the published values of  $f_{u_{inc}}$ , which might better reflect the real microsomal composition. This is also confirmed by the correlation coefficients that are relatively close to unity; hence, there is just a loss of precision to explain the inaccurate predictions. Accordingly, in Table 3, it is demonstrated that the values of  $f_{u_{inc}}$  obtained from the literature are lower than the  $f_{u_{inc}}$  obtained from the kit transil particularly for the most lipophilic drug. This conform that there is a potential discrepancy in the lipid composition of micorosmes between the Kit transil and the literature.
  - Accordingly, the MCM model cannot adequately be tested since the composition in phospholipids significantly differs from the poster (kit transil) and the literature (human microsomes). And the total amount of neutral lipids (e.g., triglycerides) is not known for the Kit transil. The amount of triglycerides is as important as the phospholipid content according to the literature, and, hence, the amount of triglycerides cannot be neglected. At present, the MCM model was based on the microsomal composition obtained from the literature only.



## SECTION 5

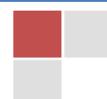
### Results and Discussions (2)

---

- Furthermore, the use of a calculated log P instead of a measured value will also increase the prediction inaccuracy as observed with the dataset of lipophilic drugs. For example, a drug had a calculated log P of 10.34, which provided very low predicted values of  $f_{u_{inc}}$  with all prediction models because each model is based on log P, which might not be the case in reality as confirmed by much higher  $f_{u_{inc}}$  values in the Kit transil.
- If you also look at the Poster from Sovicell and AstraZeneca, it is remarked that for almost all lipophilic compounds the  $f_{u_{inc}}$  determined in the dialysis system are relatively lower to the  $f_{u_{inc}}$  determined in the Kit transil, which follows the current theory.
- The same is true when the  $f_{u_{inc}}$  in the Kit transil were predicted by the model of Kilford or Halifax; the predicted  $f_{u_{inc}}$  values are lower than the  $f_{u_{inc}}$  values measured in the Kit transil (particularly in the lower range of  $f_{u_{inc}}$  values probably the most lipophilic) (see the Poster). This agrees with the results of this present study.
- At present, the conclusion for the predictions of  $f_{u_{inc}}$  in the hepatocytes is the same as for the prediction of  $f_{u_{inc}}$  in the microsomes (Table 4).

#### Conclusion

Overall, the  $f_{u_{inc}}$  determined in the Kit transil was the most accurate method to estimate the published  $f_{u_{inc}}$  values compared to calculation methods. However, the  $f_{u_{inc}}$  values that were determined in the kit transil are generally superior to the published and predicted  $f_{u_{inc}}$  values particularly for the more lipophilic drugs and basic drugs, as proved in this present study and a previous Poster by AstraZeneca. This could be explained by a discrepancy in the amount of lipids between the kit transil and microsomes *in vivo*. Note that the prediction models tested in this present study were developed based on published data, which may explain their tendency to provide lower  $f_{u_{inc}}$  values. Therefore, more a compound will be lipophilic and/or basic, greater the deviation between the  $f_{u_{inc}}$  observed in the kit transil and the literature (dialysis system) would deviate. Thus, for the ionized acids and hydrophilic compounds, all prediction models provided a similar and higher degree of prediction accuracy. Finally, the MCM model cannot be fully investigated due to a potential discrepancy in the lipid content in the Kit transil and microsomes *in vivo* (at present the MCM model is based on the lipid content determined in microsomes that were previously published in the literature).

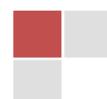


## SECTION 6

### Recommendations that may Improve the Prediction

The recommendations are provided below.

Recommendations	Priority
Compare $f_{u_{inc}}$ values measured in the Kit transil with $f_{u_{inc}}$ values determined in the dialysis system for more lipophilic drugs to confirm whether the $f_{u_{inc}}$ values in the Kit transil could be higher compared to the $f_{u_{inc}}$ in the dialysis cells.	High
Verify the amount of lipids (triglycerides, phospholipid neutrals and acidics) between the current Kit transil and the microsomes used at Sanofi to confirm whether the microsomal composition could be much lower in the transil kit.	High



**Table 1.** Comparison of the human  $f_{u_{inc}}$  in microsomes determined in the Kit transil and from the literature (dialysis system) for the current datasets of drugs.

PREDICTION OF $f_{u_{inc}}$										
	% ≤ 1.5 -FOLD	% ≤ 2 -FOLD	% ≤ 3 -FOLD	% ≤ 5 -FOLD	% ≤ 10 -FOLD	AFE	AAFE	RMSE	r	CCC
<b>ALL DATASETS (n=20)<sup>A</sup></b>										
Fu <sub>inc</sub> in literature versus Kit transil	90	95	95	100	100	0.90	1.21	0.17	0.71	0.44
<b>WITHOUT THE ACIDS (n=14)</b>										
	79	93	93	100	100	0.83	1.27	0.20	0.72	0.40

<sup>A</sup>: There is only one lipophilic compounds in this dataset (e.g., Amitriptyline) and for this compounds the discrepancy between the Kit transil and the literature is maximal (0.7 in the kit versus 0.15 from the literature for a Cp of 0.5 mg/mL, and 0.543 in the kit versus 0.35 from the literature for a Cp of 1 mg/mL).

**Table 2.** Comparison of the human  $f_{u_{inc}}$  in hepatocytes determined in the Kit transil and from the literature (dialysis system) for the current datasets of drugs.

PREDICTION OF $f_{u_{inc}}$										
	% ≤ 1.5 -FOLD	% ≤ 2 -FOLD	% ≤ 3 -FOLD	% ≤ 5 -FOLD	% ≤ 10 -FOLD	AFE	AAFE	RMSE	r	CCC
<b>ALL DATASETS (n=11)<sup>A</sup></b>										
Fu <sub>inc</sub> in literature versus Kit transil	100	100	100	100	100	0.86	1.16	0.08	0.48	0.16

<sup>A</sup>: This dataset is limited in lipophilic drugs but for those that are lipophilics  $f_{u_{inc}}$  of the literature are lower than the  $f_{u_{inc}}$  in the Kit transil.

**Table 3.** Comparative assessment of four calculation methods used to predict human fu<sub>inc</sub> in microsomes determined in the Kit transil for the current datasets of drugs.

PREDICTION OF fu <sub>inc</sub>											
	% ≤ 1.5 -FOLD	% ≤ 2 -FOLD	% ≤ 3 -FOLD	% ≤ 5 -FOLD	% ≤ 10 -FOLD	AFE	AAFE	RMSE	r	CCC	
<b>ALL DATASETS (n=96)</b>											
MCM	62	72	78	83	93	0.66	2.34	0.74	0.88	0.54	
Halifax and Houston	68	74	79	80	82	0.53	3.23	1.27	low	0.33	
Turner <i>et al.</i>	65	80	85	91	92	0.71	1.89	0.62	0.90	0.61	
Austin <i>et al.</i>	53	65	72	79	89	0.42	2.67	0.79	0.87	0.56	
<b>NEUTRALS + WEAK BASES (n=42)</b>											
MCM	69	79	79	88	93	0.63	2.04	0.68	0.94	0.62	
Halifax and Houston	74	83	86	86	88	0.89	1.76	0.50	0.92	0.67	
Turner <i>et al.</i>	74	88	93	93	95	1.11	1.46	0.32	0.88	0.75	
Austin <i>et al.</i>	60	69	79	91	93	0.68	1.85	0.40	0.86	0.76	
<b>ACIDS (n=18)</b>											
MCM	94	100	100	100	100	1.11	1.11	0.07	Low	low	
Halifax and Houston	100	100	100	100	100	1.05	1.09	0.05	0.29	0.13	
Turner <i>et al.</i>	100	100	100	100	100	1.02	1.09	0.05	0.37	0.28	
Austin <i>et al.</i>	100	100	100	100	100	1.03	1.11	0.06	Low	low	
<b>STRONG BASES (n=36)</b>											
MCM	36	50	67	69	89	0.53	3.98	0.97	0.72	0.35	
Halifax and Houston	44	50	61	64	67	0.20	11.3	2.0	Low	0.20	
Turner <i>et al.</i>	36	61	69	83	83	0.35	3.36	0.95	0.88	0.48	
Austin <i>et al.</i>	22	39	50	56	78	0.16	6.33	1.21	0.85	0.39	
<b>LIPOPHILICS (log P &gt; 4) (n=39)</b>											
MCM	28	39	46	59	82	0.34	6.11	1.16	0.86	0.28	
Halifax and Houston	28	41	49	51	56	0.10	15.6	2.03	0.82	0.18	
Turner <i>et al.</i>	23	56	64	77	80	0.45	3.95	0.97	0.82	0.38	
Austin <i>et al.</i>	21	31	33	51	72	0.17	7.28	1.22	0.81	0.33	

**AFE** - average fold-error; **AAFE** - absolute average fold-error; **RMSE** - root-mean-square-error; **r** - correlation coefficient; **CCC** - concordance correlation coefficient; **MCM** – microsome composition-based model.

**Table 4.** Comparative assessment of four calculation methods used to predict human fu<sub>inc</sub> in hepatocytes determined in the Kit transil for the current datasets of drugs.

	PREDICTION OF fu <sub>inc</sub>					AFE	AAFE	RMSE	r	CCC	
	% ≤ 1.5 -FOLD	% ≤ 2 -FOLD	% ≤ 3 -FOLD	% ≤ 5 -FOLD	% ≤ 10 -FOLD						
<b>ALL DATASETS (n=62)</b>											
MCM		58	63	74	82	87	0.33	3.18	1.06	0.78	0.23
Austin <i>et al.</i>		65	76	84	95	98	0.76	1.63	0.34	0.68	0.55
<b>NEUTRALS + WEAK BASES (n=38)</b>											
MCM		68	76	84	87	92	0.52	2.10	0.79	0.80	0.32
Austin <i>et al.</i>		66	82	87	100	100	0.75	1.52	0.26	0.71	0.64
<b>ACIDS (n=14)</b>											
MCM		86	93	100	100	100	1.14	1.14	0.14	0.97	0.77
Austin <i>et al.</i>		64	86	86	100	100	0.68	1.58	0.26	0.53	0.52
<b>STRONG BASES (n=24)</b>											
MCM		42	42	58	75	79	0.16	6.13	1.39	0.73	0.15
Austin <i>et al.</i>		63	66	79	88	96	0.77	1.82	0.44	0.67	0.44
<b>LIPOPHILICS (log P &gt; 4) (n=28)</b>											
MCM		19	27	46	62	69	0.10	11.8	1.62	0.58	0.10
Austin <i>et al.</i>		39	46	64	89	96	0.67	2.39	0.49	0.45	0.34

**AFE** - average fold-error; **AAFE** - absolute average fold-error; **RMSE** - root-mean-square-error; **r** - correlation coefficient; **CCC**

## APPENDIX

Table A1. Drug dataset used for the prediction of the human microsomal Fu<sub>inc</sub><sup>A</sup>.

Drugs	Input Parameters						Microsomal Fu <sub>inc</sub>						
	Class	Log P	pka	fu <sub>p</sub>	Pea	Cp (mg/mL)	Measured Fu <sub>inc</sub>		Predicted FU <sub>inc</sub>				
							Fu <sub>inc</sub> Kit transil	Fu <sub>inc</sub> literatur e	MCM	Austin	Halifax	Turner	
<b>ACIDS</b>													
Warfarin	Acid	3.15	4.96	0.015	nn	0.25	0.998	-	0.999	0.973	0.977	0.969	
						0.5	0.995	-	0.998	0.947	0.955	0.939	
						1	0.991	0.93	0.997	0.900	0.913	0.886	
Tolbutamide	Acid	3.13	5.21	0.05	nn	0.25	0.995	-	0.999	0.964	0.974	0.969	
						0.5	0.99	-	0.997	0.930	0.950	0.940	
						1	0.979	0.98	0.995	0.870	0.905	0.886	
Tolcapone	Acid	2.6	4.83	0.001 2	nn	0.25	0.88	-	1.000	0.989	0.981	0.976	
						0.5	0.79	-	1.000	0.977	0.963	0.952	
						1	0.656	0.67	0.999	0.956	0.929	0.909	
Bosentan	Acid	3.1	4.58	0.037	nn	0.25	0.94	-	1.000	0.984	0.980	0.969	
						0.5	0.89	-	0.999	0.969	0.961	0.941	
						1	0.807	0.97	0.999	0.940	0.925	0.888	
Irbesartan	Acid	4.5	4.37	0.1	nn	0.25	0.97	-	0.996	0.931	0.965	0.943	
						0.5	0.94	-	0.991	0.871	0.933	0.893	
						1	0.886	-	0.982	0.771	0.874	0.806	
Diclofenac	Acid	4.49	4	0.005	nn	0.25	0.92	0.97	0.998	0.956	0.972	0.943	
						0.5	0.85	-	0.996	0.916	0.946	0.893	
						1	0.741	0.88	0.993	0.846	0.898	0.807	
SAR1	Acid		5.6	0.015	nn	0.25	0.077	-	0.727	0.099	0.181	0.923	
						0.5	0.04	-	0.571	0.052	0.099	0.858	
						1	0.02	-	0.399	0.027	0.052	0.751	
<b>BASES</b>													
Amiodarone	Base	7.57	8.78	0.04	25	0.25	0.3	-	0.03	0.005	0.001	0.015	
						0.5	0.17	-			0.000		
						1	0.096	-	0.01	0.003	0.000	0.007	
Mibefradil	Base	5.34	9.86	0.005	200	0.25	0.14	-	0.11	0.084	0.144	0.225	
						0.5	0.075	-	0.06	0.044	0.078	0.127	
						1	0.039	-	0.03	0.022	0.040	0.068	
Alfuzosine	Base	1.51	8.07	0.15	10.4	0.25	0.99	-	0.72	0.927	0.964	0.980	
						0.5	0.97	-	0.56	0.865	0.931	0.960	
						1	0.944	-	0.39	0.761	0.871	0.923	
Amitriptyline	Base	4.9	8.74	0.07	13	0.25	0.83	-	0.63	0.139	0.279	0.343	

						0.5 1	0.7 0.543	0.15 0.35	0.46 0.30	0.075 0.039	0.162 0.088	0.207 0.115	
Propranolol	Base	3.65	9.13	0.13	4.22	0.25 0.5 1	0.74 0.58 0.413	- - 0.44	0.88 0.78 0.64	0.447 0.288 0.168	0.742 0.590 0.419	0.735 0.581 0.409	
Diltiazem	Base	2.67	7.57	0.18	5.33	0.25 0.5 2	- - -	0.86 - 0.76	0.84 0.72 0.39	0.741 0.588 0.263	0.906 0.829 0.548	0.911 0.837 0.562	
Dextromethorphan	Base	3.36	9.2	0.5	5.38	0.25 0.5	- -	- -	0.84 0.73	0.540 0.370	0.810 0.681	0.803 0.671	
Naloxone	Base	2.1	7.31	0.54	2.52	0.25 0.5 1	0.985 0.969 0.941	- - 0.87	0.93 0.87 0.77	0.856 0.749 0.599	0.944 0.894 0.809	0.956 0.916 0.846	
Dronedaron	Base	7.35	9.8	0.02	1.11	0.25 0.5 1	0.037 0.019 0.01	- - -	0.32 0.19 0.10	0.007 0.003 0.002	0.002 0.000 4	0.019 0.010 0.005	
Eplivanserin	Base	3.63	9	0.2	5	0.25 0.5 1	0.74 0.59 0.42	- - -	0.85 0.75 0.99	0.453 0.293 0.172	0.748 0.597 0.425	0.740 0.587 0.416	
Terfenadine	Base	7.1	9.5	0.03	33.3	0.25 0.5 1	0.087 0.045 0.023	- - -	0.21 0.12 0.06	0.009 0.005 0.002	0.003 0.002 0.001	0.027 0.014 0.007	
SAR2	Base		9.7	0.048	7.9	0.25 0.5 1	0.24 0.14 0.073	- - -	0.00038 0.00019 0.0001	0.0001 0.00007 0.00004	1.5e-7 7e-8 4-8	0.0005 0.0002 0.0001	
SAR2	Base		8	0.005	44	0.25 0.5 1	0.67 0.50 0.332	- - -	0.17 0.09 0.05	0.180 0.099 0.052	0.372 0.228 0.129	0.418 0.264 0.152	
SAR3	Base		8.15	0.136	5.55	0.25 0.5 1	0.56 0.39 0.239	- - -	0.83 0.71 0.55	0.514 0.346 0.21	0.793 0.657 0.49	0.786 0.647 0.48	
Diazepam	Neutral	2.25	-	0.023	nn	0.25 0.5 1	0.93 0.86 0.761	- 0.781 -	0.974 0.949 0.902	0.83 0.71 0.55	0.94 0.88 0.79	0.91 0.84 0.73	
Antipyrine	Neutral	0.23	-	0.93	nn	0.25 0.5 1	0.996 0.992 0.985	- - -	1.000 0.999 0.999	0.99 0.97 0.94	0.98 0.96 0.93	0.99 0.98 0.96	
Alprazolam	Neutral	1.84	-	0.29	nn	0.25 0.5 1	0.975 0.95 0.906	- - 0.82	0.990 0.979 0.960	0.89 0.81 0.68	0.95 0.91 0.84	0.94 0.89 0.80	
Theophylline	Neutral	-0.14	-	0.61	nn	0.25 0.5	- -	- -	1.000 1.000	0.99 0.98	0.98 0.96	0.99 0.99	

Lorazepam	Neutral	2.4	-	0.09	nn	0.25 0.5	- -	- -	0.963 0.929	0.80 0.67	0.93 0.86	0.90 0.82
Oxazepam	Neutral	2.23	-	0.04	nn	0.1 0.25 0.5 1	0.944 0.87 0.77 0.627	0.83 - - 0.72	0.990 0.975 0.951 0.906	0.93 0.83 0.72 0.56	0.97 0.94 0.88 0.79	0.96 0.92 0.84 0.73
Caffeine	Neutral	-0.09	-	0.64	nn	0.25 0.5 1	0.947 0.90 0.818	- - 0.96	1.000 1.000 1.000	0.99 0.98 0.96	0.98 0.96 0.93	0.99 0.98 0.97
Triazolam	Neutral	2.4	-	0.1	nn	0.1 0.25 0.5 1	0.983 0.96 0.92 0.85	1 - - 0.78	0.985 0.963 0.929 0.868	0.91 0.80 0.67 0.50	0.97 0.93 0.86 0.76	0.96 0.90 0.82 0.69
Phenacetin	Neutral	1.41	-	0.47	nn	0.25 0.5	- -	- -	0.996 0.992	0.94 0.88	0.97 0.94	0.96 0.93
Midazolam	Neutral	3.27	-	0.017	nn	0.1 0.25 0.5 1	0.966 0.92 0.95 0.738	0.97 - - 0.71	0.898 0.779 0.639 0.469	0.77 0.57 0.40 0.25	0.92 0.83 0.71 0.54	0.90 0.78 0.64 0.47
Zolpidem	Neutral	2.42	-	0.08	nn	0.25 0.5 5	0.99 0.98 0.866	- 0.94 0.58	0.962 0.926 0.556	0.80 0.66 0.16	0.93 0.86 0.39	0.90 0.82 0.31
SAR4	Neutral		-	0.000 5	nn	0.25 0.5 1	0.32 0.19 0.107	- - -	0.219 0.123 0.066	0.24 0.14 0.07	0.49 0.33 0.19	0.53 0.36 0.22
SAR5	Neutral		-	0.004	nn	0.25 0.5 1	0.051 0.026 0.013	- - -	0.172 0.094 0.049	0.21 0.12 0.06	0.44 0.28 0.16	0.50 0.33 0.20
SAR6	Neutral		-	0.081	nn	0.25 0.5 1	0.94 0.89 0.799	- - -	0.876 0.779 0.638	0.66 0.49 0.33	0.87 0.78 0.63	0.83 0.71 0.55
SAR7	Neutral		-	0.001	nn	0.25 0.5 1	0.11 0.055 0.029	- - -	0.0005 0.0003 0.0001	0.0094 0.0047 0.0024	0.0032 0.0016 0.0008	0.0589 0.0303 0.0154
SAR8	Neutral		-	0.05	nn	0.25 0.5 1	0.44 0.28 0.165	- - -	0.103 0.054 0.028	0.16 0.09 0.05	0.33 0.20 0.11	0.43 0.27 0.16

A.  $P_{ea}$ : red blood cells:aqueous phase ratio.

nn: not necessary. OBS: observed / measured.

b) *Bilan et conclusion du rapport :*

En conclusion de ce rapport, la prédiction *in silico* des fuinc apparait pertinente pour les raisons suivantes :

1. Les molécules extrêmement liées aux microsomes ou aux hépatocytes sont rares. D'après nos résultats et les données compilées à partir de la littérature, cette forte affinité se cantonne aux composés fortement hydrophobes et le plus souvent basiques. Les performances des modèles *in silico* permettent ainsi de nous questionner sur le bénéfice concret que peut ou non nous apporter la détermination expérimentale des fuinc.
2. Les performances des méthodes *in silico* concernant la prédiction des fuinc nous permettent d'identifier efficacement les composés pour lesquels une attention doit être portée. Ainsi, une certaine vigilance pourra être portée aux molécules très liées et pour lesquelles la prédiction de clairance est plus complexe.
3. Enfin, les évolutions technologiques et stratégiques tendent à permettre l'utilisation de concentrations en microsomes ou en hépatocytes de plus en plus faibles. Les quantités de microsomes dans les études de stabilité métabolique peuvent désormais être abaissées à 0.5mg/mL (ou moins) et le nombre d'hépatocytes est généralement réduit dans les modèles hépatiques les plus performants. Ainsi et comme nous l'avons compris au cours de nos travaux, la fraction libre d'un composé apte à se lier sera d'autant plus faible que la concentration en matrice biologique sera élevée.

En résumé, la performance des méthodes *in silico* est satisfaisante et nous incite à utiliser ces approches en premières intention lorsque nous en aurons besoin. Dans les études qui suivront, nous privilégierons les méthodes ne nécessitant que le logP pour prédire le fuinc qui semblent plus simples à utiliser et tout aussi performantes que les méthodes mécanistiques plus complexes.

A l'inverse, nous recommandons une estimation expérimentale du  $f_{up}$ , qui comme nous le verrons dans les prochains chapitres, est un paramètre ayant une plus forte incidence sur la prédiction des clairances.

## B. Prédiction de la clairance métabolique

### 1. Introduction

#### a) Contexte :

L'évaluation des paramètres ADME (Absorption Distribution, Métabolisme et Excrétion) est d'une importance critique, aussi bien lors des phases précoces de recherche que plus tard en phase de développement. La sélection des meilleures molécules se base sur des choix multiparamétriques réunissant l'efficacité potentielle, les caractéristiques ADME et le profil de sécurité des candidats médicaments. En ce sens, la prédiction précoce de la pharmacocinétique est élémentaire pour orienter les prises de décision et donner un cap pertinent aux projets. En raison de son rôle central sur la disposition et la pharmacocinétique (PK) des médicaments, la clairance est l'un des paramètres PK le plus important. Une attention particulière est ainsi portée tout le long du processus R&D sur les biotransformations que les composés pourront possiblement subir lorsqu'ils seront administrés.

Les études de clairance métabolique sont réalisées dès les phases de recherche pour classer les molécules en fonction de leur vitesse d'élimination mesurée dans des systèmes *in vitro*. La classification relative à ces premières données de métabolisme est généralement organisée en trois clusters : clairance faible, intermédiaire ou forte. Les seuils limites entre chaque classe sont déterminés par expérience et peuvent différer entre laboratoires. Ces informations sont ensuite combinées avec d'autres études (ADME, TOX, efficacité sur la cible, etc...) pour dresser une vision globale de chaque composé et constituer un outil d'aide à la prise de décision. Les chefs de projet pourront ainsi sélectionner, parmi les centaines voire les milliers de molécules testées, les composés présentant le plus fort potentiel de réussite. A ce stade et si les prédictions sont erronées, les laboratoires courent le risque d'écarter de bon candidats médicaments ou à l'inverse de continuer avec des molécules qui n'auront pas de profils pharmacocinétiques adéquats.

Dans les phases suivantes et lorsque le nombre de composés a été fortement réduit, les prédictions doivent être affinées pour obtenir des informations beaucoup plus précises sur la vitesse d'élimination. Durant les phases précliniques, de nombreuses informations ont été acquises sur le candidat médicament, avec notamment : les cytochromes P450 et autres

enzymes impliqués dans le métabolisme, les métabolites formés, et l'aptitude du composé à induire ou inhiber les CYP. Les investigations complémentaires menées à ce stade doivent permettre de sélectionner la dose à administrer pour la première fois chez l'homme. La prédiction de clairance aura donc une importance cruciale sur le design des études cliniques. La dose choisie pour la phase 1 doit permettre d'étudier de manière optimale le devenir du composé et son impact dans l'organisme tout en prévenant le risque de toxicité.

*b) Modèles in vitro de routine :*

**Les Microsomes.** Le foie est impliqué dans le métabolisme de près de 70% des médicaments mis sur le marché (Wienkers and Heath, 2005). Parmi les systèmes *in vitro* destinés aux études de métabolisme, les microsomes constituent le modèle le plus simple après les enzymes recombinantes. Les microsomes sont des fractions sub-cellulaires des hépatocytes constituées du réticulum endoplasmique lisse qui concentre les enzymes de phase I et quelques enzymes de phase II. Les microsomes sont faciles à préparer et à stocker (-80°C), ce qui contribue à assurer une reproductibilité satisfaisante entre différentes expérimentations. De plus, l'existence de pools de microsomes regroupant plusieurs centaines de donneurs peut offrir une bonne représentation de la variabilité inter-individuelle. Les microsomes sont utilisés par les industries pharmaceutiques pour estimer les  $K_m/V_{max}$  et la clairance intrinsèque dans le but de prédire la clairance hépatique *in vivo*. Bien que la pertinence et l'efficacité de ce système *in vitro* ne soient pas remises en cause par les services DMPK, de nombreuses tentatives infructueuses concernant la prédiction de clairances *vivo* ont été rapportées dans la littérature (Naritomi *et al.*, 2001; Bowman and Benet, 2016; Wood *et al.*, 2017). Les discordances entre les clairances prédites *in vitro* versus celles mesurées *in vivo* peuvent en partie être expliquées par le caractère peu physiologique des microsomes. En effet, le fait que les membranes hépatocytaires et les transporteurs hépatiques ne soient pas représentés, l'absence des enzymes cytosoliques peut biaiser les prédictions.

**Les Hépatocytes.** Les hépatocytes qui ont un rôle majeur dans les fonctions hépatiques ont ainsi gagné une importance croissante et sont devenus une composante essentielle des modèles *in vitro* utilisés pour prédire le métabolisme ou la toxicité des molécules (Sahi *et al.*, 2010). L'utilisation d'hépatocytes cryopréservés s'est démocratisé et permet de mener des

expériences de routine sans dépendre de la disponibilité de cellules fraîches isolées à partir de foie de donneurs. Des cellules provenant d'un même lot peuvent alors être utilisées entre différentes études et des expériences peuvent être répétées à l'identique lorsque cela est nécessaire. Grâce aux nombreuses expériences acquises au fil des années, les hépatocytes utilisés en suspension ou en monocouche sont devenus les deux modèles cellulaires les plus utilisés par les industries pharmaceutiques pour prédire le métabolisme (Li, 1999).

- **Les Hépatocytes en suspension.** La plupart des protocoles permettant l'isolement des hépatocytes utilisent une digestion à la collagénase afin de rompre les jonctions entre les cellules et obtenir une suspension cellulaire homogène. Les hépatocytes isolés de cette manière peuvent directement être utilisés en suspension pour caractériser le métabolisme des molécules étudiées. Il s'agit d'un système *in vitro* facile à utiliser et à mettre en place pour des études à moyen et haut débit (Andria *et al.*, 2010; Soldatow *et al.*, 2013). Les hépatocytes en suspension forment un système cellulaire complet qui contrairement aux microsomes, offre l'avantage de considérer la notion de perméabilité membranaire. De plus, l'agitateur mécanique utilisé pour tenir les cellules en suspension et éviter leur agrégation permet d'entretenir une certaine dynamique entre le milieu de culture et la membrane hépatocytaire. Cependant, il est parfois reporté que les protocoles d'isolement, de congélation ou d'agitation peuvent engendrer des dommages sur les récepteurs des cellules, les jonctions et les membranes cellulaires, ou encore le contenu cytosolique (Jauregui *et al.*, 1988; Lerche-Langrand and Toutain, 2000). La digestion à la collagénase induit également un stress oxydatif dont les effets sont observés 4 à 8h après l'isolement des hépatocytes (Duval *et al.*, 1995; Tirmenstein *et al.*, 2000). La perte de contact avec la matrice extracellulaire et les autres types cellulaires occasionne une dédifférenciation des cellules et une perte de leur polarisation (Dalet *et al.*, 1982) qui pourront néanmoins être rétablies dans des systèmes de culture plus évolués. Ainsi, les hépatocytes en suspension peuvent être utilisés pour des incubations courtes comprises entre 1 et 6h (Elaut *et al.*, 2006; Stringer *et al.*, 2008). Cependant, ce temps limité n'est pas suffisant pour déterminer de manière précise la clairance intrinsèque des composés stables et faiblement métabolisés.

- **Les Hépatocytes cultivés en monocouche.** Il est possible de prolonger le temps d'incubation des composés en cultivant les hépatocytes en monocouche. Ces cellules ont effectivement la capacité d'adhérer et de s'étaler sur des plaques de culture cellulaire coatées avec certaines matrices. En fonction des protocoles et de la qualité de la cryopréservation, la faculté de former une monocouche homogène n'est cependant assurée pour toutes les préparations d'hépatocytes. Les fabricants d'ampoules cryopréservées proposent en conséquence des lots certifiés « plateable » ou adhérents et prêts à l'emploi pour les études de métabolisme ou de toxicologie. En cultivant les hépatocytes sur du collagène, la durée d'étude d'un composé peut dépasser les 24h d'incubation soit le quadruple des capacités de la méthode en suspension. Il est néanmoins difficile de conduire des expérimentations plus longues en raison de la modification significative de l'expression génique et de la diminution de l'activité des enzymes au cours du temps. Le métabolisme de phase I / II, les systèmes de transport basolatéraux et canaliculaires, le métabolisme des acides gras et des lipides sont effectivement impactés au cours de la culture (Richert *et al.*, 2006).

Malgré l'existence d'alternatives efficaces dont nous discuterons plus loin, les microsomes, les hépatocytes en suspension et la culture d'hépatocytes en monocouche sont encore aujourd'hui les systèmes *in vitro* les plus utilisés dans les études de métabolisme.

### c) *Extrapolation des données vitro et Prédiction de la clairance*

Dans un contexte de prédiction de clairance, les modèles *in vitro* cités dans le chapitre précédents sont utilisés pour mesurer la vitesse de disparition du composé au cours du temps. La métabolisation est alors observée en quantifiant le composé « parent » à différents intervalles. Ainsi, plus la clairance intrinsèque sera forte, plus la concentration du composé sera faible en fin de cinétique. S'il est évident que les modèles *in vitro* sont d'une importance cruciale pour produire des données de qualité, il est tout aussi évident que la fiabilité des prédictions repose sur la façon dont ces données sont exploitées. Notons qu'outre le métabolisme que nous traitons dans cette thèse, le rôle des transporteurs (uptake et efflux) et l'impact de la perméabilité peuvent également être pris en compte pour considérer tous

les processus impliqués dans le mécanisme de clairance (Sirianni and Pang, 1997; Shitara *et al.*, 2006; Varma *et al.*, 2015).

Bien que complexe, une exploitation correcte des données *in vitro* est capitale pour obtenir des prédictions de clairance précise et fiable. En pratique, les prédictions reposent sur les méthodes IVIVE (« *In Vitro to In Vivo* Extrapolation ») qui modélisent l'écart entre le *vitro* et le *vivo* afin de pouvoir convertir la constante d'élimination mesurée expérimentalement en une valeur de clairance. En tenant compte des différences de concentration du médicament dans le foie et en considérant des facteurs physiologiques, il est effectivement possible de décrire le processus d'élimination par des modèles mathématiques. Les trois modèles les plus décrits dans la littérature sont le « well stirred », le « parallel tube » et le « dispersion model ». Le « well stirred model » qui signifie « modèle bien agité » est de loin le plus utilisé, c'est celui que nous utiliserons au cours de nos travaux. Il a été établi en 1973 (Rowland *et al.*, 1973) et est depuis en constante évolution grâce à l'implémentation de nouvelles connaissances physiologiques. Les différentes variantes du modèle « well stirred » développées au fil du temps se distinguent essentiellement par le niveau de considération de la fraction libre plasmatique. La variante la plus simple ne fait intervenir que le débit hépatique ( $Q_{liver}$ ) et la clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ) dans le calcul : cette méthode est surnommée « méthode directe » et n'intègre donc pas la liaison aux protéines plasmatiques. La seconde variante surnommée « méthode conventionnelle » intègre quant à elle la fraction libre plasmatique ( $f_{up}$ ) en plus des deux autres paramètres cités précédemment ( $Q_{liver}$  et  $CL_{int}$ ). Elle repose ainsi sur l'hypothèse que seule la fraction libre plasmatique du médicament peut être métabolisée par le foie. Plus récemment, la considération du gradient de pH et de la charge des molécules (qui diffère entre l'espace intra- et extracellulaire) a été proposée pour améliorer la prédiction de clairance des composés acides et basiques (Berezhkovskiy, 2011). Peu de temps après, les travaux menés par Poulin et ses collaborateurs ont permis d'introduire une nouvelle hypothèse physiologique baptisée « the albumin-facilitated uptake mechanism ». En raison d'une différence notable entre l'albuminémie et la concentration d'albumine autour des hépatocytes, ces auteurs considèrent que la fraction libre d'un composé diffère entre le plasma et le foie. Cette nouvelle hypothèse introduit un nouveau paramètre dans l'équation : le PLR (pour « plasma to liver ratio ») correspondant au rapport de concentration plasmatique / hépatique de l'albumine. La valeur du PLR utilisée dans la méthode « Poulin et al. » est de

13.33. Cette approche qui se veut plus physiologique a démontré son efficacité dans la prédiction de clairance, en particulier pour les composés fortement liés à l'albumine (Poulin, Hop, *et al.*, 2012; Poulin, Kenny, *et al.*, 2012; Poulin and Haddad, 2013b; Kratochwil *et al.*, 2017; Yamagata *et al.*, 2017; Poulin and Haddad, 2018; Bounakta *et al.*, 2018).

#### d) *Objectif :*

Dans cette étude nous allons challenger les techniques et les méthodes les plus couramment utilisés pour prédire la clairance. Pour ce faire nous avons déterminé les clairances intrinsèques de 24 molécules sur 3 modèles *in vitro* : microsomes, hépatocytes en suspension et hépatocytes en monocouche. Nous avons ensuite procédé à la prédiction des clairances en extrapolant ces données *in vitro* à l'aide de 3 méthodes IVIVE : la « méthode directe », la « méthode conventionnelle » et enfin la méthode « Poulin et al. ». Au travers de ce travail, l'objectif est de réaliser une évaluation globale des modèles de routine. Nous souhaitons ainsi situer les performances des modèles *in vitro* et mathématiques les uns par rapport aux autres afin d'identifier des points d'amélioration. En fonction de la réponse des composés vis à vis de chaque méthode, nous espérons découvrir des tendances qui nous permettront peut-être d'affiner notre stratégie de prédiction.

## 2. Matériels et Méthodes

#### a) *Molécules et réactifs*

Au total, 24 molécules ont été testées dans cette étude. L'Irbesartan, l'Amiodarone, le Zolpidem et l'Alfuzosin ont été obtenus et synthétisés par Sanofi tandis que les autres composés ont été commandés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Leurs caractéristiques physico-chimiques ainsi que les différents paramètres pharmacocinétiques nécessaires à la réalisation de l'étude sont résumés dans le tableau 3. Les composés tout comme les autres réactifs utilisés (PBS, DMSO, solvants, etc...) ont été commandés sous le plus haut grade de pureté disponible.

b) *Modèles in vitro et conduite des cinétiques*

**Microsomes.** La clairance intrinsèque a été déterminée en utilisant des microsomes hépatiques humains obtenus chez BD Biosciences. Le lot #HLM150 a été utilisé, il s'agit d'un pool de 150 donneurs.

Les expérimentations ont été menées dans ces conditions d'incubation : le milieu réactionnel (300µL) était composé de tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.05 M, pH 7.4), de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), d'EDTA (1 mM), de NADPH (1 mM), de microsomes (0.5mg de protéine/mL) et du composé à tester (1µM). Les incubations ont été réalisées en tubes à hémolyse (verre) et dans un bain agité thermostaté à 37°C. Les microsomes ont été pré-incubés pendant 5 minutes avant que la réaction ne soit initiée par l'addition du NADPH (sauf pour le contrôle pour lequel ce cofacteur a été remplacé par du tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Le métabolisme des composés a été quantifié par une approche fondée sur la déplétion du substrat. Ainsi, les cinétiques ont été conduites pendant 45min et au cours de laquelle 7 points ont été réalisés (0, 5, 10, 15, 20, 30 et 45min). Pour chaque point, la réaction a été stoppée par l'ajout de 1250µL d'Acétonitrile puis la déplétion a pu être observée en quantifiant la disparition du composé au cours du temps par LC-MS/MS.

**Hépatocytes.** Ce paragraphe décrit l'étape de décongélation des hépatocytes qui s'avère commune entre les deux modèles : suspension et monocouche. Nous traiterons ensuite la mise en culture de façon distincte pour chacun des modèles.

Décongélation : Les ampoules contenant les hépatocytes ont été retirées de l'azote liquide puis immédiatement décongelées dans un bain-marie préchauffé à 37°C. Après 1 à 2min d'incubation, le contenu de l'ampoule est transféré et mis en suspension dans un Falcon contenant du milieu CHRM (Cryopreserved Hepatocyte Recovery Medium, CM7000, life technologies) préchauffé à 37°C. Le tube est ensuite centrifugé 10min à 100g puis le surnageant est aspiré pour être éliminé. Le culot concentrant les hépatocytes est ensuite repris soit dans du milieu de culture pour les hépatocytes en suspension, soit dans du milieu d'ensemencement pour les hépatocytes en monocouche. La composition des milieux sera décrite dans la page suivante. La numération ainsi que la viabilité cellulaire sont ensuite déterminées en cellule de Malassez par la méthode de coloration au Bleu Trypan : les cellules

mortes apparaissent avec un cytoplasme bleu. Avant d'être ensemencées en plaques, les cellules ont été diluées à la densité souhaitée à l'aide du milieu utilisé pour la reprise du culot.

Les supports de culture utilisés pour cette étude sont :

- Pour la monocouche : plaques 48 puits coatées au collagène I: BioCoat Collagen I
- Pour la suspension : plaque 96 puits « Ultra Low Attachment » Corning™ #7007

Composition des milieux :

1) Préparation du **milieu d'ensemencement** :

Produit	Volume
Ham F12	250 mL
Williams E	250 mL
SVF (décomplémenté 30 minute à 56 °C)	50 mL
Cocktail 1*	4,55 mL

\*Composition du **cocktail 1**

Stock	Produit	Solution mère	Volume prélevé
-20°C	Streptomycine-pénicilline	10 mg/mL Strepto/10000 U/mL Penic	20 mL
4°C	Glucagon	1 mg / mL	8 mL
-20°C	Insuline	165 mg / 100 mL+ quelques gouttes NaOH 1 N	63 mL
4°C	Dexamethasone <i>Dans DMSO 0.1 µM en final</i>	5 mM	200 µL

2) Préparation du **milieu de culture** :

Produit	Volume
Ham F12	250 mL
Williams E	250 mL
Cocktail 2*	23.5 mL

\*Composition du **cocktail 2**

Stock	Produit	Solution mère	Volume
4°C	Hépès		150 mL
-20°C	Streptomycine-penicilline		20 mL
4°C	Ethanolamine	40 mg (à peser) / 10 mL	10 mL
-20°C	Transferrine	100 mg / 10 mL	10 mL
-20°C	Insuline	165 mg / 100 mL + quelques gouttes NaOH 1 N	63 mL
4°C	Glucagon	10 mg / 10 mL ou Kit injectable	8 mL
4°C	Acide Linoléique	14 mg / 14 mL	14 mL

TA	Glucose	2,52 g / 20 mL	20 mL
4°C	Pyruvate de Sodium	---	40 mL
4°C	Acide Ascorbique	500 mg / 10 mL	10 mL
4°C	L-Arginine	1,04 g / 10 mL	10 mL
-20°C	Glutamine		100 mL
TA	NaOH 1N		15 mL
4°C	Dexamethasone (0.1 $\mu$ M en final)	5 mM	200 $\mu$ L

Hépatocytes en suspension : Le lot #IVT-VRR regroupant un pool de 50 donneurs a été utilisé pour les expérimentations en suspension. Après les étapes de décongélation et de numération décrites précédemment, 50 $\mu$ L d'une suspension à 0.60.10<sup>6</sup> cellules/mL ont été distribués dans les plaques 96, soit une densité finale de 30 000 hépatocytes par puits. Les cinétiques débutent lors de l'ajout de 50 $\mu$ L de produit à 2X (soit 1 $\mu$ M final) dans les puits contenant déjà les cellules. Les plaques ont ensuite été mises sur un agitateur de microplaques réglé sur 600RPM et placées dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Tout comme les expérimentations avec les microsomes, l'approche de déplétion du substrat a été utilisée pour mesurer la clairance intrinsèque. Pour chaque composé, 8 points ont été réalisés au cours des cinétiques : T<sub>0</sub>, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 et 4h. L'arrêt de la réaction pour chaque point s'est faite par l'addition de 7 volumes d'une solution acétonitrile / eau (ACN/H<sub>2</sub>O, 40/30, v/v) provoquant la précipitation des protéines. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'au dosage par LC-MS/MS.

Hépatocytes en monocouche : La détermination de la clairance intrinsèque par la technique en monocouche a été réalisée sur un total de 4 lots d'hépatocytes humains : #Hum4055 & #Hum4019 (TRL Lonza), #S1255T (Kaly Cell) et #IVT-JGM (BioIVT). Après l'étape de numération décrite précédemment, 160 000 cellules/puits ont étéensemencées dans les plaques 48 puits. Après une période de 3 à 5 heures, pendant lesquelles les cellules ont adhéré au collagène, le milieu d'ensemencement est changé pour du milieu de culture. Après une nuit d'incubation, ce milieu est aspiré puis remplacé par 100 $\mu$ L de milieu de culture contenant le produit à tester. La cinétique est ainsi initiée pour une durée de 24h et au cours de laquelle 8 points ont été réalisés : T<sub>0</sub>, 1, 2, 3, 4, 6, 8 et 24h. Toutes les incubations ont été menées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans des incubateurs Heracell™. Pour stopper la réaction, 700  $\mu$ L d'une solution acétonitrile / eau (40/30) sont ajoutés à chaque temps. Les cellules ont été grattées et le mélange stocké à -20°C en attendant le dosage.

### c) *Quantification*

Les dosages ont été réalisés par Chromatographie Liquide Ultra Performance (ACQUITY UPLC I-Class WATERS) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (XEVO TQ-S de chez WATERS). Les échantillons ont d'abord été soniqués puis dilués au robot (Microlab STAR d'Hamilton) en parallèle de la gamme d'étalonnage. Cette dilution en plaque 96 puits a pour objectif d'atteindre la gamme de sensibilité du XEVO TQ-S et de ne pas saturer le détecteur quadripôle. Ensuite, 500µL d'acétonitrile ont été ajoutés à 200 µL d'échantillon. Pour compléter l'étape de dilution, 50 µL d'étalon externe (Triflupéridol et Chloramphénicol) par puits ont été distribués. Les plaques ont ensuite été centrifugées durant 20 minutes à 3000 tr/min. L'ordre de passage, les méthodes analytiques et les volumes d'injection sont programmés sur le logiciel MassLynx™ v4.1. Grâce à la sensibilité du détecteur et à la qualité de séparation offerte par l'UPLC, chaque échantillon a été analysée en 2 min 30 et avec un volume d'injection inférieur à 2µL. La phase stationnaire est une colonne ACQUITY UPLC HSS C18 (100Å, 1.8 µm, 2.1 mm X 100 mm). La séparation est menée sous gradient par association de 2 phases mobiles dont la composition a déjà été décrite dans l'étude consacrée à la méthode Transil<sup>XL</sup>. Les données générées ont été traitées via l'application TargetLynx™. La quantification des produits est obtenue après intégration des pics chromatographiques et extrapolation des aires. Les concentrations sont calculées en tenant compte de la gamme étalon et les éventuels écarts de linéarité ont été corrigés par l'étalon externe.

### d) *Détermination de la clairance intrinsèque in vitro et in vivo*

La première étape de traitement des données consiste à déterminer la valeur de la constante d'élimination ( $k_{10}$ ). L'étude de la déplétion du substrat que nous avons menée permet de tracer la courbe des concentrations en fonction du temps. Un modèle mono-compartmental a été appliqué à ces données grâce à un complément Excel développé sous le nom de « PKSolver » (Zhang *et al.*, 2010).

Ainsi, l'équation suivante nous a permis de déterminer la constante d'élimination :

$$Ct = C0 \times e^{-k_{10} \times t}$$

Où Ct est la concentration du composé à un temps t, C0 est la concentration en début de cinétique et k10 est la constante d'élimination.

Grâce au k10 nous pouvons calculer la clairance intrinsèque *in vitro* (CLint, invitro) qui considère aussi les conditions expérimentales :

$$CL_{int, invitro} = K_{10}(h) \times \frac{\text{volume d'incubation}}{\text{nombre d'hépatocytes OU quantité de microsome}}$$

La « CLint, *in vitro* » peut par exemple être exprimée en mL/min/mg de protéine pour les microsomes et en mL/min/millions de cellules pour les hépatocytes. La « CLint, *in vitro* » est ensuite convertie en clairance intrinsèque (« CLint ») grâce à l'utilisation d'un « scaling factor » prenant en compte les données physiologiques :

$$CL_{int} = CL_{int, invitro} \times PBSF$$

Ou le terme PBSF correspond à « Physiological-based scaling factor ». Les valeurs des données physiologiques utilisées sont résumées dans le tableau suivant (Ring *et al.*, 2011) :

Parameters	Mouse	Rat	Dog	Monkey	Human
Liver weight (kg) <sup>a,b</sup>	5.49% BW	3.66% BW	3.29% BW	2.48% BW	2.57% BW
Standard body weight (kg) <sup>b</sup>	0.02	0.25	10	5	70
PBSF (mg prot/g liver) <sup>c</sup>	47	47	58	32	32 (CI <sub>95%</sub> = 29–34)
PBSF (mg prot/kg BW) <sup>b</sup>	2580.3	1720.2	1908.2	793.6	822.4
PBSF (10 <sup>6</sup> cells/g liver) <sup>c</sup>	128	128	187.5	99	99 (CI <sub>95%</sub> = 74–131)
PBSF (10 <sup>6</sup> cells/kg BW) <sup>b</sup>	7027.20	4684.80	6168.75	2455.20	2544.3
Q <sub>liver</sub> (mL/min) <sup>a</sup>	2.4	16.9	309	218	1450

Tableau 2 : Physiological Based Scaling Factors (PBSF) utilisé pour convertir la « CLint, *in vitro* » en « CLint, *in vivo* »

Grâce à la considération de ces facteurs physiologiques, la « CLint » peut être maintenant exprimée en mL/min/kg quel que soit le modèle *in vitro* (microsomes et hépatocytes). La clairance intrinsèque est une mesure directe de la capacité des hépatocytes ou des microsomes à métaboliser une molécule sans influence de paramètres auxiliaires (débit hépatique, fixation protéique...).

e) Méthodes IVIVE et prédiction des clairances

Les « CL<sub>int</sub> » issues des données *in vitro* peuvent maintenant être exploitées dans les méthodes IVIVE. Pour résumer, 3 méthodes IVIVE seront challengées dans cette étude :

- La méthode directe qui ne considère aucun phénomène de liaison
- La méthode conventionnelle qui considère la fraction libre plasmatique : le  $f_{up}$
- La méthode Poulin qui corrige le  $f_{up}$  par « le  $f_{up}$ -adjusted » d'après l'hypothèse de l'uptake facilité par l'albumine.

Les équations correspondantes à ces trois méthodes IVIVE sont détaillées dans le tableau suivant :

IVIVE Methods	Model Equations of CL
Methode Conventiennelle	$CL = \frac{Q_{liver} R_{BP} CL_{int} f_{u_p}/f_{u_{hep}}}{Q_{liver} R_{BP} + CL_{int} f_{u_p}/f_{u_{hep}}}$
Méthode Directe de scaling	$CL = \frac{Q_{liver} R_{BP} CL_{int}}{Q_{liver} R_{BP} + CL_{int}}$
Méthode décrite par Poulin et al.	$CL = \frac{Q_{liver} R_{BP} CL_{int} f_{u_{p-adjusted}}/f_{u_{hep}}}{Q_{liver} R_{BP} + CL_{int} f_{u_{p-adjusted}}/f_{u_{hep}}}$

Où

$$f_{u_{p-adjusted}} = \frac{PLR-adjusted \times f_{u_p} \times \frac{f_{unionized-plasma}}{f_{unionized-liver,cells}}}{1 + (PLR-adjusted-1) \times f_{u_p} \times \frac{f_{unionized-plasma}}{f_{unionized-liver,cells}}}$$

CL, clairance hépatique ; CL<sub>int</sub>, CL intrinsèque ; Q<sub>liver</sub>, débit hépatique ; R<sub>BP</sub>, Ratio blood-to-plasma ; f<sub>u<sub>p</sub></sub>, fraction libre plasmatique; f<sub>u<sub>p</sub>-adjusted</sub>, f<sub>u<sub>p</sub></sub> ajusté pour considerer l'hypothèse de l'uptake facilité par l'albumine et l'effet du gradient de pH; f<sub>u<sub>hep</sub></sub>, fraction libre du composé mélangé à des hépatocytes inactivés; PLR-adjusted, rapport de concentration plasmatique/hépatique de l'albumine ajusté aux capacités de chaque donneur ; f<sub>unionized</sub>, fraction ionisée du composé calculée à partir de l'équation de Henderson-Hasselbalch et en utilisant le pKa de chaque molécule. Il est également assumé que le pH varie de part et d'autre de la membrane hépatocytaire (pH de 7.1 en intracellulaire vs 7.4 dans le milieu d'incubation et le plasma)

Dans la méthode Poulin et al., le PLR a été appliqué à toutes les molécules (bases, acides et neutres) y compris les molécules majoritairement liées à l'AAG.

Afin d'éviter une redondance dans ce manuscrit, il n'est pas à ce stade nécessaire de détailler plus longuement les méthodes IVIVE. Cette même méthodologie sera en effet décrite de manière exhaustive au cours de notre prochaine étude et dans la publication associée.

f) Détermination du fumic et fuhep :

Comme nous l'avons vu dans l'étude précédente, il est possible de prédire la fraction libre dans l'incubation (fumic et fuhep) par des méthodes *in silico*. Dans cette étude nous utiliserons la méthode d'estimation proposée par Austin et al. qui ne nécessite que le LogP (pour les molécules basiques) ou le LogD<sub>7.4</sub> (pour les molécules acides et neutres). Le calcul des fuinc est basé sur la concentration expérimentale en microsomes de 0.5mg/mL et sur une densité de 30 000 hépatocytes/puits en suspension et 160 000/puits en monocouche.

g) Evaluation de la performance de prédiction :

Les clairances prédites à l'aide de ces différentes méthodes IVIVE vont être comparées aux clairances mesurées chez l'homme après une administration intraveineuse (I.V). Pour évaluer le degré de corrélation, la précision et l'exactitude des prédictions, le coefficient de détermination (R<sup>2</sup>), l'Average Fold-Error (AFE) et l'Absolute Average Fold-Error (AAFE) ont été calculés pour chacune des méthodes et chacun des modèles *in vitro* testés. L'écart correspondant au « fold-error » entre les valeurs prédites et observées a également été calculé. Les équations de ces tests statistiques sont présentés ci-dessous :

$$AFE = 10 \frac{\sum \log(\text{fold} - \text{error})}{N} \quad AAFE = 10 \frac{\sum |\log(\text{fold} - \text{error})|}{N} \quad \text{Fold} - \text{error} = \frac{CL_{\text{predicted}}}{CL_{\text{observed}}}$$

### 3. Résultats

Dans cette étude, les clairances intrinsèques de 24 molécules ont été mesurées sur trois modèles *in vitro* différents : microsomes, hépatocytes en suspension et hépatocytes en monocouche. Pour évaluer la capacité de chaque modèle à métaboliser les molécules testées, nous avons à chaque fois utilisé une même approche consistant à mesurer la disparition du produit au cours du temps. Le tableau 3 présenté sur la page suivante résume les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les paramètres relatifs à la pharmacocinétique des molécules étudiées. Parmi les 24 médicaments, 5 sont des molécules acides, 9 sont basiques et 10 sont classifiées comme neutres. Les pKa et les logP montrent également un dataset diversifié. Les trois molécules les plus lipophiles de l'étude sont l'Amiodarone, le

Mibefradil et l'Amitriptyline.avec des logP/D respectifs de 6.3, 5.4 et 4.9. Afin que l'évaluation soit plus pertinente, nous avons choisi des molécules dont l'élimination est très majoritairement médiée par le foie via un processus de biotransformation. Les enzymes les plus impliquées dans le métabolisme de ces molécules sont en majorité des CYP450 sauf pour 5 composés où le métabolisme est dominé par des UGT. La fraction libre plasmatique étant centrale dans l'extrapolation des données *in vitro*, nous avons testé des molécules disposant d'un large éventail de *fup*, variant de 0.001 à 0.77. Les clairances prédites ont été comparées aux clairances plasmatiques déterminées après administration intra-veineuse des composés. Dans le contexte de cette thèse et de la stratégie dominante consistant à privilégier les composés stables sur le plan métabolique, nous avons étudié une majorité de composés à faible clairance.

Tableau 3 : Propriétés physico-chimiques et données pharmacocinétiques des composés testés

Composé	Enzymes Impliquées <sup>a</sup>	Classification <sup>a</sup>	logP <sup>a</sup>	pKa acide <sup>a</sup>	pKa base <sup>a</sup>	Fraction libre plasmatique <sup>a</sup>	Ratio sang/plasma Ratio (RBP) <sup>a</sup>	CLp observée <sup>a</sup> (mL/min/kg)	fumic <sup>c</sup> microsomes	fuhep <sup>c</sup> suspension	fuhep <sup>c</sup> monocouche
Warfarine	CYP2C9	Acide	3.1	4.8		0.013	0.55	0.1	0.95	0.88	0.98
Tolbutamide	CYP2C9, OAT2	Acide	3.1	5.2		0.05	0.65	0.2	0.93	0.88	0.98
Tolcapone	UGT	Acide	2.6	4.8		0.001	0.6	1.7	0.98	0.93	0.99
Bosentan	CYP3A4, OATP	Acide	3.1	4.6		0.037	0.58	2.1	0.97	0.89	0.98
Irbesartan	UGT, OATP	Acide	4.5	4.2		0.1	0.55	2.2	0.87	0.68	0.92
Amiodarone	CYP2C, 1A2, 3A4	Base	6.3 <sup>d</sup>		9.1	0.04	0.73	1.9	0.003	0.32	0.71
Mibefradil	CYP3A4	Base	5.34		9.86	0.005	1 <sup>b</sup>	4	0.04	0.91	0.98
Alfuzosine	CYP3A4	Base	1.5		8.1	0.13	0.82	5	0.87	0.99	1.00
Amitriptyline	CYP2C19, 2D6	Base	4.9		8.7	0.07	0.86	6.1	0.08	0.84	0.97
Diltiazem	CYP3A4	Base	2.8		8	0.18	0.924	13	0.55	0.94	0.99
Propranolol	CYP2D6	Base	3.6		9.1	0.13	0.83	14	0.29	0.96	0.99
Dextrométhorphan	CYP2D6	Base	3.3		9.2	0.77	1.76 (rat)	20.7 (~Q <sub>liver</sub> )	0.37	0.97	0.99
Naloxone	UGT	Base	2.09		7.31	0.54	1.22	20.7 (~Q <sub>liver</sub> )	0.75	0.96	0.99
Phénacétine	CYP1A2	Base	1.4		9.1	0.47	1 <sup>b</sup>	20.7 (~Q <sub>liver</sub> )	0.88	0.97	0.99
Diazepam	CYP3A4, 2C19	Neutre	2.2			0.023	0.63	0.4	0.71	0.94	0.99
Antipyrine	Several P450	Neutre	0.38			0.93	1 <sup>b</sup>	0.64	0.96	0.99	1.00
Alprazolam	CYP3A4	Neutre	2.12			0.29	0.78	0.74	0.74	0.95	0.99
Theophylline	CYP1A2	Neutre	-0.14			0.525	0.83	0.9	0.98	0.99	1.00
Lorazepam	UGT	Neutre	2.4			0.09	1 <sup>b</sup>	1.1	0.67	0.94	0.99
Oxazepam	UGT	Neutre	2.2			0.045	1.11	1.3	0.72	0.95	0.99
Caféine	CYP1A2	Neutre	-0.09			0.67	1.08	1.4	0.98	0.99	1.00
Triazolam	CYP3A4	Neutre	2.42			0.1	0.62	3	0.67	0.94	0.99
Zolpidem	CYP3A4	Neutre	1.3 <sup>d</sup>			0.08	0.76	4.3	0.91	0.94	0.99
Midazolam	CYP3A4	Neutre	3.3			0.03	0.54	6	0.40	0.87	0.97

<sup>a</sup>: Compilé du site [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) et données de la littérature<sup>41-43</sup>

<sup>b</sup>: la valeur de 1 a été utilisée lorsque le RBP n'était pas connu.

<sup>c</sup>: Valeurs prédites d'après Austin et al.

<sup>d</sup>: logD<sub>7.4</sub>

a) Classement des composés

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la performance des modèles et méthodes à classer correctement les molécules vis-à-vis de leur coefficient d'extraction. Le « ranking » des composés est effectivement une stratégie courante dans les entreprises pour identifier les composés présentant un profil métabolique favorable et écarter les molécules potentiellement instables. Cette pratique repose sur l'hypothèse d'une corrélation entre la clairance intrinsèque mesurée *in vitro* et le coefficient d'extraction hépatique humain. En se basant sur les critères ci-dessous, la clairance des composés a été classée en 3 catégories (faible, intermédiaire ou forte) en fonction de leur coefficient d'extraction hépatique :

Classification	Faible	Intermédiaire	Forte
Coefficient d'extraction (% du débit sanguin hépatique)	< 30%	entre 30 et 70%	> 70%
Clairance correspondante (mL/min/kg)	< 6.2	entre 6.2 et 14.5	> 14.5

Concernant les microsomes, la méthode IVIVE ayant permis de classer au mieux les molécules est la méthode conventionnelle : 83% des molécules ont été correctement classifiées contre 67% avec la méthode Poulin et al. (tableau 4). A l'inverse, avec 79% de succès, la méthode conventionnelle offre une performance inférieure avec les hépatocytes en monocouche. Il semblerait plus efficace d'associer ce modèle *in vitro* à la méthode directe (83%) ou mieux encore, la méthode Poulin (88%). Enfin, le modèle des hépatocytes en suspension associé à la méthode Poulin offrent les meilleures performances dans cette étude avec 22 composés sur 24 (92%) correctement classifiés :

Modèle <i>in vitro</i> \ Méthode IVIVE	Microsomes	Hépatocytes en suspension	Hépatocytes en monocouche
Méthode Directe	71%	75%	83%
Méthode Conventionnelle	83%	83%	79%
Méthode Poulin et al.	67%	92%	88%

Tableau 4 : : Résumé des performances de succès concernant la classification des molécules testées : % de succès dans la prédiction du classement des molécules en clairance faible, Intermédiaire ou forte en fonction du coefficient d'extraction hépatique

Dans le tableau 5 présenté à la page suivante sont compilés les résultats obtenus sur les différents systèmes *in vitro* avec les différentes méthodes de prédiction.

Composés	CL <sub>int</sub> Extrapolée à partir des données <i>in vitro</i> (mL/min/kg)			CL <sub>p</sub> Prédite à partir des 3 méthodes IVIVE (mL/min/kg)									CL <sub>p</sub> Observée (mL/min/kg)
	Microsomes	Suspension	Monocouche	Microsomes			Hépatocytes en suspension			Hépatocytes en monocouche			
				Directe	Conventionnelle	Poulin	Directe	Conventionnelle	Poulin	Directe	Conventionnelle	Poulin	
Warfarine	3.56	1.55	0.95	2.71	0.05	0.24	1.36	0.02	0.10	0.88	0.01	0.07	0.1
Tolbutamide	4.24	6.57	2.98	3.22	0.22	0.91	4.41	0.33	1.30	2.44	0.17	0.69	0.2
Tolcapone	27.87	102.39	5.19	8.59	0.03	0.15	11.08	0.10	0.53	3.66	0.01	0.03	1.7
Bosentan	11.43	17.55	1.44	5.86	0.42	1.69	7.13	0.63	2.39	1.29	0.06	0.26	2.1
Irbesartan	10.31	33.43	8.87	5.41	1.07	3.08	8.49	2.75	6.06	4.99	1.17	3.30	2.2
Amiodarone	37.73	7.02	4.86	10.79	14.67	15.08	4.79	0.38	4.23	3.68	0.59	5.70	1.9
Mibefradil	24.74	37.46	2.58	11.27	2.48	16.50	13.33	0.19	4.36	2.29	0.01	0.41	4
Alfuzosine	7.66	6.13	1.80	5.28	1.08	2.26	4.50	0.76	3.98	1.63	0.23	1.41	5
Amitriptyline	4.54	7.45	3.93	3.62	3.42	12.71	5.25	0.52	4.28	3.22	0.32	2.88	6.1
Diltiazem	55.46	16.49	5.35	14.22	9.34	15.81	8.86	2.60	8.41	4.18	0.98	4.04	13
Propranolol	25.21	16.89	14.55	10.22	6.85	14.00	8.52	1.96	7.93	7.88	1.77	7.43	14
Dextrométhorphan	39.76	37.88	2.65	19.01	25.29	27.21	18.57	16.29	18.66	2.47	1.99	2.54	20.7
Naloxone	3.04	47.53	46.81	2.71	2.02	3.47	16.49	12.77	16.49	16.40	12.88	16.59	20.7
Phénacétine	22.08	18.66	10.87	10.68	7.51	11.34	9.81	6.20	9.87	7.13	4.20	7.27	20.7
Diazepam	0.25	5.34	2.31	0.25	0.01	0.08	3.79	0.12	1.17	1.96	0.06	0.56	0.4
Antipyrine	0.28	0.92	0.05	0.28	0.27	0.29	0.88	0.82	0.88	0.05	0.05	0.05	0.64
Alprazolam	0.42	3.93	0.63	0.41	0.16	0.47	3.16	1.07	2.78	0.61	0.19	0.54	0.74
Theophylline	n.d	3.79	0.08	nd	nd	nd	3.11	1.78	2.94	0.08	0.04	0.08	0.9
Lorazepam	0.44	2.09	1.58	0.43	0.06	0.37	1.90	0.19	1.14	1.47	0.15	0.91	1.1
Oxazepam	1.47	6.12	3.30	1.38	0.09	0.76	4.83	0.28	2.16	2.89	0.16	1.27	1.3
Caféine	n.d	1.16	0.28	nd	nd	nd	1.10	0.75	1.07	0.28	0.19	0.27	1.4
Triazolam	20.99	6.96	3.37	7.96	2.52	7.61	4.51	0.67	3.17	2.67	0.35	1.84	3
Zolpidem	4.37	2.36	2.60	3.42	0.38	2.22	2.05	0.19	1.19	2.23	0.22	1.36	4.3
Midazolam	449.13	68.83	19.96	10.91	8.39	10.81	9.62	1.79	7.26	7.17	0.65	4.19	6

nd : pas de disparition du produit inchangé observée

Tableau 5 : Compilation des clairances prédites et observées

## b) Prédicativité des modèles de routine

Les clairances intrinsèques et plasmatiques, prédites et observées sont présentées dans le tableau 5 de la page précédente. Aucune déplétion de la Caféine et de la Théophylline n'a été observée lors des incubations sur microsomes. La clairance de ces deux molécules a donc été considérée comme nulle sur les microsomes. Plus globalement, les valeurs de  $CL_{int}$  montrent que la déplétion sur hépatocytes en monocouche est nettement plus faible que sur les deux autres modèles *in vitro*. La moyenne des  $CL_{int}$  était d'environ 6 mL/min/kg en monocouche contre respectivement 34 et 20 mL/min/kg pour sur les microsomes et les hépatocytes en suspension.

Les graphiques comparants les clairances plasmatiques observées aux clairances plasmatiques prédites pour chaque modèle *in vitro* et chaque méthode IVIVE sont compilés dans la figure 29. Tout d'abord, une observation rapide des 9 graphiques fait apparaître une sous-estimation des prédictions lorsque la méthode conventionnelle est appliquée à nos données (Figures 29B, E et H). Nous observons également que le coefficient de détermination ( $R^2$ ) n'est pas un indicateur suffisant pour juger de la qualité de nos prédictions. Par exemple, alors que le  $R^2$  est supérieur, la sous-estimation est nettement plus marquée avec les hépatocytes en monocouche qu'avec les microsomes ( $R^2=0.50$  pour les hépatocytes (Figure 29H) versus  $R^2=0.36$  pour les microsomes (Figure 29B)). Les statistiques présentées dans le tableau 6 viennent compléter l'analyse graphique : L'AFE (« average fold error ») permet de situer les prédictions (si  $AFE > 1$  : tendance à la surestimation et si  $AFE < 1$  : tendance à la sous-estimation) tandis que l'AAFE qui représente le facteur de différence moyen (« Absolute average fold error ») entre la valeur prédite et observée permet de juger de la précision des prédictions. Avec un AFE de 0.1 et un AAFE de 10.5, les hépatocytes en monocouche utilisés avec la méthode conventionnelle représentent le modèle *in vitro* le moins performant de l'étude. Toujours sur ce modèle, l'AFE (0.4) et l'AAFE (3.2) sont améliorés grâce à la méthode de Poulin et deviennent encore meilleurs lorsque la méthode directe est utilisée (0.79 et 2.87). Le profil de performance global est similaire sur les microsomes : 71% des clairances sont prédites avec un fold-error inférieur à 3 soit 17 molécules sur 24. Les données statistiques montrent un léger avantage pour la méthode Poulin. En corrigeant le fup par le PLR la méthode Poulin permet d'obtenir sur microsomes, un AAFE de 2.44 et un AFE de 0.9 signifiant une faible sous-estimation dans les prédictions.

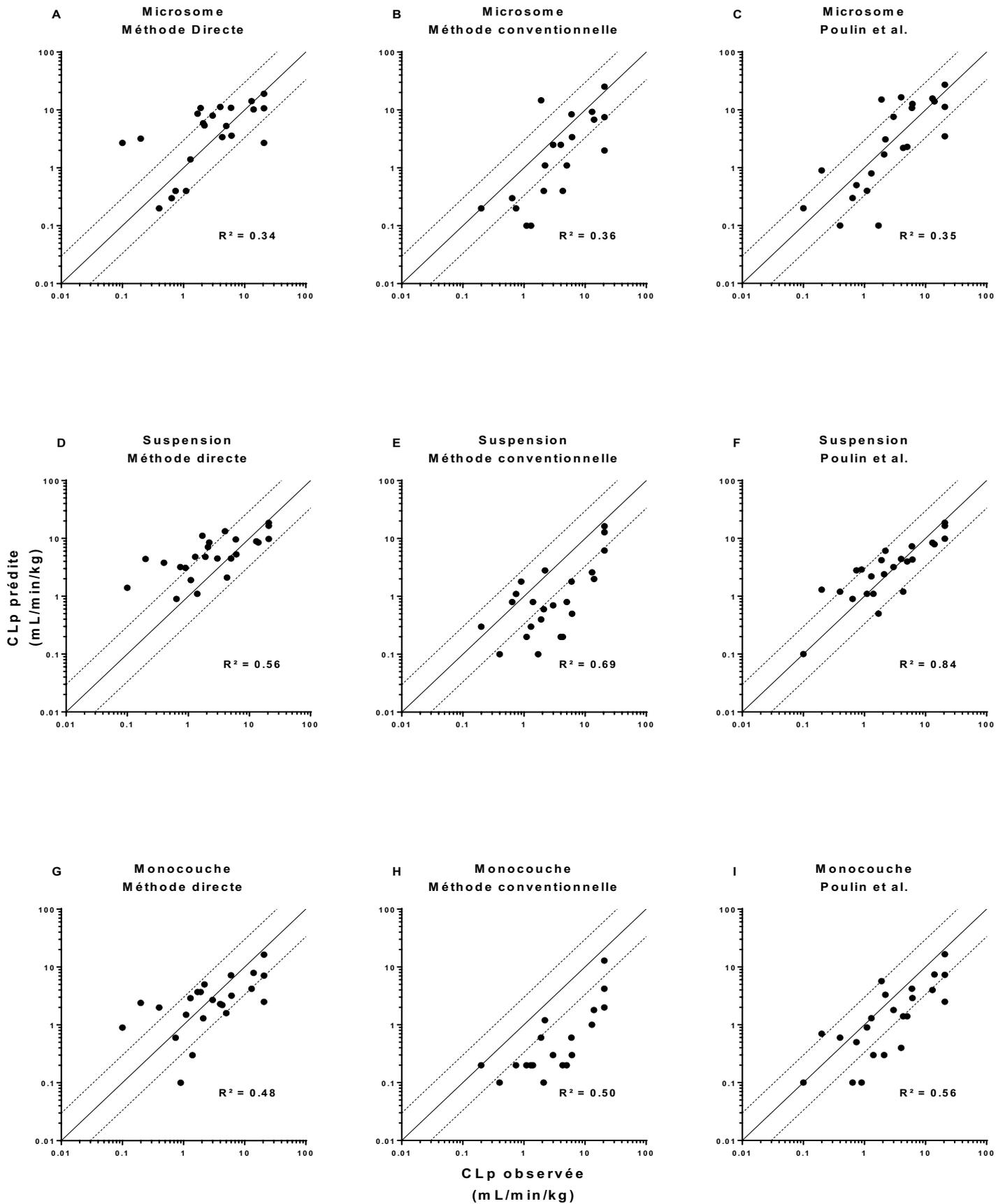


Figure 29 : Corrélation entre les clairances prédites et les clairances plasmatiques observées chez l'Homme

Comparaison entre la clairance plasmatique (CLp) prédite et observée chez l'homme appliquées aux 3 modèles *in vitro* avec les 3 méthodes d'extrapolation IVIV (n = 24 composés). (A, D, G) Méthode directe sans correction de liaison aux protéines. (B, E, H) Méthode conventionnelle prenant en compte le fup. (C, F, I) Méthode de Poulin, incluant le fup ajusté. La ligne continue indique le meilleur ajustement (unité) et les lignes pointillées de chaque côté de l'unité représentent l'enveloppe d'erreur à trois fois.

Concernant les hépatocytes en suspension, l'AFE de 2.04 signale une tendance à la surestimation lorsque les clairances sont prédites avec la méthode directe, et plus particulièrement pour les composés à très faible clairance (Warfarin, Tolbutamide et Diazepam qui ont une CL < 0.5mL/min/kg).

Les meilleures performances ont été obtenues lorsque les données générées sur les hépatocytes en suspension ont été extrapolées avec la méthode Poulin et le PLR de 13.33. Le gain de précision est considérable puisque 50% des clairances sont prédites avec un fold-error inférieur à 1.5 et jusqu'à 79% des molécule avec un fold-error inférieur ou égal à 3. De plus, 96% des clairances (soit 23 composés sur les 24) sont prédites dans une enveloppe de 4 fold-error (non montré), confirmant ainsi la fiabilité globale de cette méthodologie (hépatocytes en suspension + méthode Poulin). Enfin, les paramètres statistiques viennent également confirmer la supériorité de l'association de cette méthode et de ce modèle vis-à-vis de tous les autres scénarios évalués : R<sup>2</sup> :0.84, AFE de 1.1 et AAFE de 1.8.

Tableau 6 : Évaluation statistique des méthodes IVIVE et modèles in vitro utilisés en routine pour prédire la clairance plasmatique chez l'homme

Scénario et méthodes d'extrapolation IVIVE	% ≤ 1.5-fold Error	% ≤ 2-fold Error	% ≤ 3-fold Error	AFE	AAFE	R <sup>2</sup>
<b>Microsomes (n = 24 composés)</b>						
Méthode Directe	25	46	71	1.40	2.58	0.34
Méthode conventionnelle basée sur le Fup	21	29	50	0.31	4.11	0.36
Méthode de Poulin et al. incluant le PLR	21	42	67	0.90	2.44	0.35
<b>Hépatocytes en suspension (n = 24 composés)</b>						
Méthode Directe	29	46	58	2.04	2.66	0.56
Méthode conventionnelle basée sur le Fup	17	33	33	0.30	3.97	0.69
Méthode de Poulin et al. incluant le PLR	50	63	79	1.14	1.79	0.84
<b>Hépatocytes en monocouche (n = 24 composés)</b>						
Méthode Directe	21	46	63	0.79	2.87	0.48
Méthode conventionnelle basée sur le Fup	4	13	13	0.10	10.49	0.50
Méthode de Poulin et al. incluant le PLR	29	42	50	0.40	3.24	0.56

<sup>a</sup>: AFE, average-fold error; AAFE, absolute average-fold error; R<sup>2</sup>, coefficient of determination; PLR: Liver to Plasma Ratio

#### 4. Discussion

En pharmacocinétique, beaucoup de décisions reposent sur les données générées par des modèles *in vitro*. Les propriétés ADME d'un composé déterminent la durée de l'effet thérapeutique ainsi que la quantité de médicament qui pourra atteindre sa cible. L'évaluation de la stabilité d'une molécule et la prédiction de la clairance représentent ainsi une part importante dans l'orientation du projet en particulier dans ses stades précoces de développement où seules des données *in vivo* animales sont disponibles. Connaître les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (ADMET) et adapter la cascade de décision en conséquence est donc essentiel pour réduire les taux d'attrition et augmenter les taux de réussite dans le développement pharmaceutique.

Cette étude a nécessité un travail considérable tant au niveau expérimental que lors du traitement des données brutes. Plusieurs centaines de cinétiques et une dizaine de milliers d'échantillons ont été analysés afin de générer les CLint. Ainsi, trois des modèles *in vitro* les plus utilisés dans l'industrie pharmaceutique et trois des méthodes d'extrapolations les plus citées ont été challengés dans cette étude. Les données générées par les hépatocytes en suspension, en monocouche et les microsomes ont été exploitées soit par la méthode IVIVE directe ne considérant pas le fup, soit par la méthode conventionnelle faisant intervenir le fup, soit par la méthode de Poulin explorant le rôle potentiel de l'albumine dans la mise à disposition de la molécule pour la métabolisation.

Dans les entreprises, la clairance est étudiée en deux temps. Tout d'abord en phase de recherche, des études de stabilité métabolique sont menées sur des centaines, voire des milliers de composés dans le but d'écarter les molécules trop instables et incompatibles pour le développement. A ce stade, la précision n'est pas indispensable car la stratégie consiste souvent à classer (« ranking ») les molécules en fonction de leur clairance intrinsèque : faible, forte ou intermédiaire. Nos résultats montrent que les trois modèles *in vitro* testés sont capables de classer les composés avec un taux de réussite satisfaisant. Les hépatocytes en suspension et en monocouche qui renferment des enzymes de phases 2 actives (ex : UGT) ont eu un succès de ranking légèrement supérieur aux microsomes. La principale différence entre la CLint déterminée sur hépatocytes et celle déterminée sur microsomes se réfère à la perméabilité membranaire et à la présence de cofacteurs à des niveaux physiologiques dans

les hépatocytes (Lu *et al.*, 2006). Le Naloxone qui est principalement métabolisé *in vivo* par des UGT n'a pas pu être correctement étudié sur les microsomes car nous n'avons pas utilisé le cofacteur UDPGA nécessaire à l'activité de cette enzyme.

Dans cette analyse nous avons classé les molécules en fonction de leur coefficient d'extraction hépatique calculé à partir des clairances prédites. Nous avons inclus les clairances prédites par les méthodes conventionnelle et celle de P. Poulin dans l'analyse, ce qui n'est pas encore réalisé en pratique car les fup déterminés expérimentalement ne sont que très rarement connus en recherche. Le tableau 4 montre que l'utilisation du fup peut être bénéfique pour améliorer la classification des composés. Il est néanmoins important de noter qu'en raison du contexte de cette thèse, nos travaux se sont concentrés sur une majorité de composés à faible clairance, ce qui n'est pas représentatif de la réalité d'un programme de Drug Discovery. Ainsi, un plus large dataset doit être testé pour valider ou non l'utilité de disposer du fup dès l'étape de ranking.

Plus tard, lorsque que le produit se rapproche des phases cliniques, l'enjeu est tout autre et les prédictions doivent être affinées avant la première administration à l'Homme. Les ressources peuvent alors être concentrées sur le nombre très restreint de molécules capables d'atteindre ce stade de développement. Grâce à des modèles *in vitro* et des designs expérimentaux plus soignés, les études de métabolisme deviennent plus complètes. Il ne s'agit plus de savoir si la molécule sera stable mais de prédire au mieux la clairance *in vivo*.

Plusieurs publications indiquent que l'utilisation de la méthode conventionnelle entraîne une sous-estimation des prédictions de la clairance (Ito and Houston, 2004; Brown *et al.*, 2007; Stringer *et al.*, 2008). Le même constat a été dressé dans notre étude et ce, sur les trois modèles *in vitro* challengés. Des stratégies ont été proposées par certains auteurs pour réduire et corriger cette sous-estimation qui semble apparaître comme récurrente. La plus connue est une méthode de régression linéaire qui corrige le biais systématique en appliquant un facteur de correction empirique. Ce facteur de correction est dérivé d'une première analyse réalisée sur des composés de références dont les CL observées sont parfaitement connues (Sohlenius-Sternbeck *et al.*, 2012). Ces approches empiriques ont été appliquées à plusieurs reprises avec succès et sur une large gamme de molécules (Ito and Houston, 2005; Riley *et al.*, 2005; Sohlenius-Sternbeck *et al.*, 2012; Yamagata *et al.*, 2017).

Malgré les nombreuses discussions issues de publications ou de rencontres scientifiques, la cause de cette sous-estimation n'est pas encore élucidée. Les réflexions se concentrent très souvent autour de quelques questions fondamentales, à savoir :

1. Est-ce que le modèle *in vitro* génère une donnée correcte ou biaisée ?
2. L'équation du modèle hépatique (well-stirred ou autres) modélise-t-elle correctement la clairance ?
3. La diffusion d'un médicament est-elle vraiment limitée par sa liaison aux protéines (fup) ?
4. La fraction libre d'un médicament est-elle différente entre le plasma et le foie ?

Les travaux de P. Poulin ont surtout porté sur ces deux dernières questions. L'hypothèse de « l'albumine facilitated uptake » est basée sur la disparité entre la concentration d'albumine dans le foie et celle dans le plasma. Il est ainsi plausible que la valeur de la fraction libre mesurée dans le compartiment plasmatique soit différente aux abords des hépatocytes. Les auteurs corrigent le fup en se référant au PLR « *Plasma to liver ratio* » qui est un paramètre mesurable (valeur publiée par Poulin *et al.* : PLR=13.3). Pour étoffer l'hypothèse de l'uptake facilité, les auteurs invoquent d'autres facteurs physiologiques comme le pH et les possibles interactions ioniques entre la membrane cellulaire des hépatocytes et l'albumine. Par conséquent, la méthode Poulin *et al.* ne se revendique pas comme empirique. Cette approche semble particulièrement intéressante car elle est la seule qui tente de fournir une explication « physiologique » de la sous-estimation. Etant encore relativement récente, elle s'appuie également sur un nombre restreint de citations externes et est parfois controversée par nombre de scientifiques ne se basant que sur la dogmatique la « free-drug hypothesis » selon laquelle seule la fraction non liée d'une molécule peut être internalisée et métabolisée. Même s'il semble complexe de vérifier cette hypothèse par l'expérience, la théorie reste plausible et est régulièrement appuyée par de nouveaux articles scientifiques (Fukuchi *et al.*, 2017; Kratochwil *et al.*, 2017; Yamagata *et al.*, 2017; Bounakta *et al.*, 2018; Miyauchi *et al.*, 2018). Nos résultats présentés dans ce chapitre ont confirmé une nouvelle fois que la méthode Poulin peut apporter un gain de précision et tout particulièrement lorsqu'elle est utilisée en association avec les microsomes ou les hépatocytes en suspension. Avec 80% des clairances prédites avec un fold-error inférieur à 3, les hépatocytes en suspension combinés avec la méthode Poulin offrent la meilleure performance de l'étude. Sur les hépatocytes en

monocouche, la méthode Poulin offre des performances bien meilleures que la méthode conventionnelle mais légèrement en dessous de la méthode directe. Avant de lancer une expérimentation sur hépatocytes adhérents (monocouche), les cellules sont habituellement décongelées la veille, soit 15 à 18h avant le début de la cinétique. Un grand nombre de travaux menés sur les hépatocytes en monocouche décrivent une baisse sensible de l'activité des enzymes du métabolisme après 24h (Elaut *et al.*, 2006; Richert *et al.*, 2006; Khetani *et al.*, 2015). Les hépatocytes adhèrent vite et les cinétiques pourraient sans doute être lancées le jour même de la décongélation. Ceci permettrait d'optimiser l'utilisation des hépatocytes sur les premières 24h post-décongélation et contribuerait sûrement à améliorer les prédictions.

De plus, nous avons observé que lorsque la clairance d'un composé est largement médiée par un métabolisme oxydatif hépatique, les hépatocytes en suspension et les microsomes sont capables d'égaliser voire de dépasser les performances des hépatocytes en monocouche. Ce gain de performance peut en grande partie être associé à la possibilité d'utiliser de larges pools de donneurs avec ces modèles. Le lot de microsomes que nous avons utilisé dans ces travaux regroupait 150 donneurs et le pool d'hépatocytes en suspension combinait 50 donneurs. Compte tenu de la forte variabilité inter-individuelle concernant la pharmacocinétique *in vivo*, ces pools peuvent être un avantage face aux 4 donneurs testés individuellement sur les hépatocytes en monocouche. La cryopréservation des hépatocytes nécessite une grande expertise et il n'est pas simple de réunir plusieurs donneurs au sein d'une même ampoule. Les foies et résection destinés à l'isolement d'hépatocytes sont rares ; les pools sont donc constitués d'un ensemble d'ampoules de donneurs individuels qui ont été décongelées puis regroupées. Ces hépatocytes ont donc subi un minimum de deux cycles de cryopréservation ce qui n'est pas sans conséquence sur leur intégrité. Les pools d'hépatocytes certifiés « plateable » sont ainsi difficiles à produire et ne sont apparus que très récemment dans le commerce.

Nous pouvons terminer cette discussion en évoquant le manque d'harmonisation très marqué en ce qui concerne la prédiction de la clairance. Des centaines d'articles scientifiques traitent de ce sujet mais il reste très difficile voire impossible de situer clairement les performances de chaque équipe. Concentration en microsomes, nombre d'hépatocytes par puits, composition du milieu de culture, concentration en substrat, format de plaque, vitesse et type d'agitations, intervalle entre les points, durée de la cinétique etc... sont autant d'éléments qui diffèrent

parfois sensiblement entre les nombreuses publications. De plus, la divergence dans la composition des datasets tout comme le choix des inputs (ex : fup, RBP) peuvent introduire des biais artificiels et compliquent la comparaison des différentes méthodes. Enfin, certains n'intègrent pas le fuinc et ceux qui l'utilisent ne l'estiment pas toujours de la même manière. Une cohésion parfaite est impossible mais le degré d'homogénéité doit être relevé pour exploiter au mieux tout le travail réalisé. Des efforts sont maintenant réalisés et commencent à être perceptibles au travers des différents Workshops, Consortium et Congrès.

## 5. Conclusion

Dans cette étude nous avons évalué les capacités des microsomes, des hépatocytes en suspension et des hépatocytes en monocouche à prédire la clairance métabolique. Les données générées par ces modèles *in vitro* ont été exploitées par trois méthodes d'extrapolation *in vitro- in vivo* (IVIVE) et les clairances prédites ont été comparées aux clairances observées chez l'Homme. L'évaluation a porté sur la méthode IVIVE directe qui ne considère pas le fup, la méthode conventionnelle incluant le fup et la méthode décrite par Poulin *et al.* qui utilise un fup corrigé par le ratio d'albumine entre le foie et le plasma. Le taux de succès lors du ranking des composés a été satisfaisant pour les trois modèles *in vitro* où jusqu'à 92% des molécules ont été classifiées avec succès lorsque les hépatocytes en suspension ont été utilisés. Le métabolisme du Tolcapone et de la Caféine n'a pas pu être mesuré sur les microsomes en raison du manque de sensibilité de ce modèle pour les composés faiblement métabolisés. Les prédictions les plus fiables et les plus précises ont été obtenues grâce aux CLint mesurées sur les hépatocytes en suspension et exploitées à l'aide de la méthode Poulin. Les hépatocytes en monocouche dont l'utilisation est particulièrement intéressante lorsque le métabolisme est complexe (uptake, efflux..) doivent quant à eux être préférentiellement combinés à la méthode directe. En constatant une sous-estimation récurrente avec la méthode conventionnelle, nous confirmons les observations de la littérature. Le rôle du fup nécessite d'être davantage investigué pour lever le flou sur la méthode conventionnelle.

## C. Investigation du rôle de l'albumine et amélioration de la prédiction de la clairance en utilisant le modèle hépatique long terme : Hepatopac™

### 1. Introduction de la publication

Les résultats des études précédentes nous ont motivé à mener des investigations plus approfondies sur le rôle de la fraction libre plasmatique dans la prédiction des clairances. De plus, les molécules très stables et dont la clairance est difficile à prédire avec les modèles de routine se font de plus en plus nombreuses.

Les innovations autour des modèles hépatiques sont considérables et les entreprises pharmaceutiques se doivent de saisir les opportunités pour contribuer au développement de ces technologies qui leurs sont adressées. Des solutions alternatives sont régulièrement proposées pour étudier les molécules très faiblement métabolisées et faire face à ce challenge. Par exemple, la méthode dite « en relai » utilisant des hépatocytes en suspension (Di *et al.*, 2012, 2013) ou en monocouche (C-C Peng *et al.*, 2016) a montré son utilité pour estimer la clairance de composés qui n'ont pas pu être étudiés avec les modèles habituels. La technique consiste à récupérer le surnageant à la fin d'une cinétique et de le réincuber sur des cellules fraîchement décongelées.

L'utilisation de modèles inspirés de l'environnement *in vivo* permettent également de réaliser des incubations plus longues. Ces approches consistent par exemple à cultiver des cellules en 3D via des sphéroïdes (Figaro *et al.*, 2015; Proctor *et al.*, 2017) ou en utilisant des scaffolds et des matrices particulières. Ces modèles peuvent être couplés ou non à des systèmes de perfusion dont l'objectif est de générer un stress de cisaillement et imiter le flux sanguin. (Vinci *et al.*, 2011; LeCluyse *et al.*, 2012; Dash *et al.*, 2013; Vivares *et al.*, 2015; Rashidi *et al.*, 2016; Kostrzewski *et al.*, 2017; Tsamandouras *et al.*, 2017). Bien que prometteur, il reste de nombreux challenges à relever pour simplifier leur utilisation et réduire l'adsorption non spécifique (Godoy *et al.*, 2013) des molécules sur les systèmes (ex : tube en silicone).

Dans cette étude, nous allons traiter du modèle de co-culture micro-organisé commercialisé sous le nom d'Hepatopac™. Nous avons évalué ses capacités à prédire la clairance et l'avons comparé aux hépatocytes en suspension et en monocouche en utilisant le même donneur. Suite aux résultats encourageants obtenus avec ce modèle, nous l'avons ensuite utilisé pour

investiguer le rôle de l'albumine et son impact potentiel sur les prédictions de clairance. L'article qui va être présenté dans les pages suivantes est issu d'une collaboration avec le Dr Patrick Poulin. Les riches discussions alimentées par les résultats de nos études précédentes nous ont effectivement amené à regrouper nos expertises mutuelles dans ces nouveaux travaux.



ELSEVIER

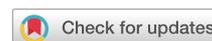
Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: [www.jpharmsci.org](http://www.jpharmsci.org)

Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism

# Improving Prediction of Metabolic Clearance Using Quantitative Extrapolation of Results Obtained From Human Hepatic Micropatterned Cocultures Model and by Considering the Impact of Albumin Binding



Franck Da-silva<sup>1,2</sup>, Xavier Boulenc<sup>1</sup>, Hélène Vermet<sup>1</sup>, Pauline Compigne<sup>1</sup>, Sabine Gerbal-Chaloin<sup>2</sup>, Martine Daujat-Chavanieu<sup>2</sup>, Sylvie Klieber<sup>1,\*</sup>, Patrick Poulin<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Sanofi R&D, Montpellier, France<sup>2</sup> Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy, Université et CHU de Montpellier, INSERM, Montpellier, France<sup>3</sup> Consultant, Patrick Poulin Inc., Québec City, Canada<sup>4</sup> Associate professor, School of Public Health, IRSPUM, Université de Montréal, Canada

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 January 2018

Revised 7 February 2018

Accepted 1 March 2018

Available online 7 March 2018

## Keywords:

ADME

DMPK

IVIVE

hepatocytes

liver models

physiologically-based pharmacokinetics

pharmacokinetics

## ABSTRACT

The objective was to compare, with the same data set, the predictive performance of 3 *in vitro* assays of hepatic clearance (CL), namely, micropatterned cocultures (also referring to HepatoPac<sup>®</sup>) and suspension as well as monolayer hepatocytes to define which assay is the most accurate. Furthermore, existing *in vitro*-to-*in vivo* extrapolation (IVIVE) methods were challenged to verify which method is the most predictive (i.e., direct scaling method without binding correction, conventional method based either on the unbound fraction in plasma ( $f_{up}$ ) according to the free-drug hypothesis, or based on an  $f_{up}$  value adjusted for the albumin [ALB]-facilitated hepatic uptake phenomenon). Accordingly, the role of ALB binding was specifically challenged, and consequently, the ALB production was monitored in parallel to the metabolic stability. The ALB concentration data were used to compare the *in vitro* assays and to adjust the value of  $f_{up}$  of each drug to mimic the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon. The results confirmed that the direct and conventional IVIVE methods generally overpredicted and underpredicted the CL *in vivo* in humans, respectively. However, the underprediction of the conventional IVIVE method based on  $f_{up}$  was significantly reduced from data generated with the HepatoPac<sup>®</sup> system compared with the 2 other *in vitro* assays, which is possibly because that system is producing ALB at a rate much closer to the *in vivo* condition in liver. Hence, these observations suggest that the presence of more ALB molecules per hepatocyte in that HepatoPac<sup>®</sup> system may have facilitated the hepatic uptake of several bound drugs because their intrinsic CL was increased instead of being decreased by the ALB binding effect. Accordingly, the IVIVE method based on the  $f_{up}$  value adjusted for the ALB-facilitated uptake phenomenon gave the lowest prediction bias from the statistical analyses. This study indicated that the HepatoPac<sup>®</sup> system combined with the adjusted value of  $f_{up}$  was the most reliable IVIVE method and revealed the importance of quantifying the *in vitro*-to-*in vivo* variation of ALB concentration to improve the CL predictions, which would help any future physiologically based pharmacokinetics modeling exercise.

  2018 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Pharmacists Association.

**Abbreviations used:** [ALB], albumin concentration; AAFE, absolute average fold error; AAG, alpha 1-acid glycoprotein; AFE, average fold error; ALB, albumin; ASR, ALB synthesis rate; BW, body weight; CL, hepatic clearance;  $CL_{int}$ , intrinsic CL; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay;  $f_{u_{hep}}$ , fraction unbound in hepatocyte incubations;  $f_{up}$ , fraction unbound in plasma;  $f_{up-adjusted}$ , adjusted  $f_{up}$ ; IVIVE, *in vitro*-to-*in vivo* extrapolation;  $k_{10}$ , elimination rate constant; MPCC, micropatterned co-cultures; PBSF, physiological-based scaling factor; PHH, primary human hepatocyte; PLR, plasma-to-liver concentration ratio;  $R^2$ , correlation coefficient; v/v, volume/volume.

\* Correspondence to: Sylvie Klieber (Telephone: 33 (0)4 99 77 54 95; Fax: 33 (0)4 99 77 54 91).

E-mail address: [sylvie.klieber@sanofi.com](mailto:sylvie.klieber@sanofi.com) (S. Klieber).

## Introduction

In the context of selecting drugs with advantageous pharmacokinetic properties, the optimization of hepatic clearance (CL) in early drug discovery is one of the objectives of modern research strategy. Generating accurate *in vitro* intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) data is essential for the prediction of the *in vivo* CL in humans by using adequate *in vitro*-to-*in vivo* extrapolation (IVIVE) methods, particularly to support the estimation of the first-in-human dose.

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.03.001>

0022-3549/  2018 Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Pharmacists Association.

Consequently, several *in vitro* models (assays) of the liver are routinely used (e.g., monolayer and suspended hepatocytes), but these models lack some complexities and conditions of the liver *in vivo* (e.g., short viability, decrease in phases I and II metabolic enzyme expressions, and absence of production of albumin [ALB]).<sup>1-3</sup> Therefore, scientists also made considerable effort to cover more accurately the conditions in liver *in vivo* using more sophisticated *in vitro* models (e.g., 3-dimensional culture, flow systems, scaffolds).<sup>4-12</sup> While promising, many challenges remain to facilitate handling and reduce nonspecific binding/adsorption of drugs to the system with the aim of facilitating access to the pharmaceutical industry where these kinds of systems is not yet widespread.<sup>13,14</sup>

Co-culture systems of human hepatocyte with mouse fibroblasts (e.g., HuREL™ and HepatoPac®) are also encouraging because the capability of such *in vitro* models is closely dependent on the interface between cytoskeleton, extracellular matrix, and cell-cell interactions, which are part of a more *in vivo*-like environment.<sup>15</sup> HepatoPac® is composed of hepatocyte islands, which are surrounded by supportive stromal cells. These micropatterned cocultures (MPCCs) secrete ALB, synthesize urea, display functional bile canaliculi, and metabolize compounds using active and stable phase I and phase II drug metabolism enzymes that permit a long incubation up to 7 days.<sup>16</sup> MPCCs have been extensively used for a broad range of applications, such as toxicity screening,<sup>17</sup> metabolite identification,<sup>18</sup> transporter-mediated drug uptake, biliary efflux, drug-drug interaction predictions,<sup>15,19</sup> and disease models.<sup>20-22</sup> They are also widely used for CL predictions particularly for slowly metabolized and compounds highly bound in plasma. Accordingly, the HepatoPac® system repeatedly demonstrated improved prediction accuracy compared with conventional monolayer and suspension cultures, particularly for predicting low CL compounds under *in vivo* conditions.<sup>19,23,24</sup> In this context, Kratochwil et al.<sup>23</sup> investigated the CL prediction of slowly metabolized drugs by challenging the HepatoPac® system with diverse IVIVE methods; however, their data set was limited to only 4 drugs. For this reason, a similar strategy needs to be repeated but with a larger data set of drugs.

The IVIVE methods are central to the transposition of experimental results determined *in vitro* to predict the CL *in vivo*. The traditional *in vitro* assays do not content any plasma protein binding (e.g., ALB) in the incubation medium compared with the liver *in vivo*; consequently, the conventional IVIVE method has been developed to extrapolate the CL in the absence of binding proteins *in vitro* to that in the presence of binding proteins *in vivo* assuming that only the free drug moiety present in plasma ( $f_{up}$ ) is available for drug metabolism in the liver. Whereas, the direct scaling method does not consider any binding correction by contrast to the conventional method. However, these 2 conventional IVIVE methods either significantly underpredicted or overpredicted the *in vivo* CL, in general.<sup>25-31</sup> Recently, consideration of hepatocyte-to-plasma pH gradient effect on the unbound drug moiety present in the aqueous phase of plasma has been proposed to improve the CL prediction of acidic and basic drugs. However, the drug ionization factor used to correct the input value of  $f_{up}$  did not significantly improve the prediction accuracy.<sup>26,27,32</sup> In addition to the pH gradient effect, some authors suggested that the free-drug concentration penetrating *in vivo* in the hepatocytes is probably higher than expected due to a possible ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon.<sup>26-28,30,33-37</sup> This rationale is because it is agreed by several authors that adding ALB in the *in vitro* incubations of hepatocytes at levels similar to the *in vivo* condition significantly improved the IVIVE-based predictions of CL under *in vivo* condition of several drugs bound to that protein because the apparent  $CL_{int}$  generally increased with the escalation of ALB concentration and

hence, of the ALB binding in the incubation medium, which is not in total accordance with the free drug hypothesis.<sup>36</sup> Then, this may suggest that the hepatic uptake of the bound drug moiety is also in place and might be mediated by the ALB.<sup>37</sup> Consequently, Poulin et al. adjusted the value of  $f_{up}$  ( $f_{up-adjusted}$ ) of each drug bound to the ALB in plasma to quantify the effect of (1) the hepatic uptake of the additional bound drug moiety and (2) the pH gradient on the unbound drug moiety. Briefly, the measured value of  $f_{up}$  determined *in vitro* was adjusted for the pH gradient effect, and, particularly, for the differential of ALB concentration between the plasma and liver to quantify the differential of the ALB-drug complex also assumed available for hepatic uptake. This model of  $f_{up-adjusted}$  is relatively speculative because it presumes that each interaction between the ALB-drug complex and the hepatocyte surface would at all times delivers the corresponding bound drug moiety into the hepatocytes after its dissociation from the complex. Moreover, the  $CL_{int}$  generated in *in vitro* assays in the absence of ALB (e.g., isolated or suspended hepatocytes) were corrected with  $f_{up-adjusted}$ , and this resulted to predict more accurately the corresponding  $CL_{int}$  in liver *in vivo* in the presence of ALB. In other words, the overprediction and underprediction bias seen with  $f_{up}$  in the IVIVE method was significantly reduced by replacing it with  $f_{up-adjusted}$ .<sup>26-30,33,34,37</sup>

Accordingly, Poulin et al.,<sup>34</sup> Fukuchi et al.,<sup>35</sup> and Poulin and Haddad<sup>37</sup> demonstrated for several compounds that the  $CL_{int}$  of the unbound drug moiety changed with the escalation of the ALB concentration of the experimental settings, which is again compatible with the ALB-facilitated uptake phenomenon. Moreover, Poulin et al.<sup>34</sup> showed that the unbound  $CL_{int}$  calculated from the ratio between the total  $CL_{int}$  and  $f_{up}$  of each drug was not maintained constant between the 2 ALB concentrations tested in the isolated richly perfused rat liver model; however, the unbound  $CL_{int}$  was maintained constant while the adjusted  $f_{up}$  value was used as the correction factor for binding probably because this parameter (i.e.,  $f_{up-adjusted}$ ) was able to quantify more accurately the exact amount of drug that has penetrated into the hepatocytes of the perfused rat liver model. This new binding correction factor based on  $f_{up-adjusted}$  has also been challenged in several other studies, and it always showed the most successful extrapolations between the *in vitro* and *in vivo* conditions.<sup>26-30,33-35,37</sup> More importantly, in these published studies,  $f_{up-adjusted}$  was also the only parameter that showed adequate extrapolations of the  $CL_{int}$  over different ALB concentrations,<sup>34,37</sup> which is another advantage of that new parameter compared with  $f_{up}$ . These observations have been validated with several data sets of drugs, experimental settings and species, for both single drug formulations and binary mixtures as well as from drugs with single or multiple CL processes. Therefore, this respect the criterion of a robust validation exercise.

In other comparative assessments, the use of  $f_{up-adjusted}$  in IVIVE methods fared with purely empirically derived factors that were not based on any relevant physiological information by contrast to  $f_{up-adjusted}$ .<sup>26-28,38,39</sup> The new IVIVE method based on  $f_{up-adjusted}$  is derived on real physiological data quantifying the real differential of ALB concentration and pH gradient between the plasma and liver *in vivo*. Empirical scaling factors may only be used with the data sets covered by the optimization exercises. Therefore, it is not surprising that empirically derived IVIVE factors previously optimized from *in vivo* data provided relatively superior statistical analyses compared with  $f_{up-adjusted}$  for some drugs,<sup>39</sup> but not in the case of other drugs.<sup>26-28</sup>

Recently, the group of professor Sugiyama published a new study that also suggests the presence of the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon for 2 drugs binding to the ALB.<sup>40</sup> These scientists have successfully extrapolated the CL of 2 organic anion transport polypeptide substrates in the absence of ALB to that in the

presence of ALB by using a facilitated-dissociation model that included additional binding parameters on the capacity of interaction and dissociation with the hepatocytes. Therefore, adequate prediction of CL *in vivo* of drugs bound to the ALB by using an IVIVE method would necessitate making an adjustment for the ALB-mediated uptake phenomenon to cover the enhancement of hepatic uptake seen in the range of physiological ALB concentrations. However, we agree that more mechanistic works are needed to elucidate the exact mechanism by which the ALB binding might facilitate the hepatic uptake. In this context, note that Poulin et al.<sup>33</sup> already compiled several additional mechanistic data and observations that were previously published in the literature, which are fully compatible with the ALB-facilitated uptake phenomenon. Overall, we are not saying that the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon is systematically present for each drug bound to the ALB; however, again, we believe that it is worth challenging the new parameter  $f_{u_p}$ -adjusted by using  $CL_{int}$  data obtained in another *in vitro* assay (i.e., HepatoPac<sup>®</sup> system). Therefore, if  $f_{u_p}$ -adjusted still provides the most accurate CL predictions compared with  $f_{u_p}$  also with the HepatoPac<sup>®</sup> system, this would support once more the presence of an ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon. Therefore, the HepatoPac<sup>®</sup> system still needs to be explored with more drugs bound in plasma.

The objective of this present study was to compare the predictive performance of 3 *in vitro* experimental settings, namely the MPCCs HepatoPac<sup>®</sup> system and the suspension as well as monolayer hepatocyte models. Using a single hepatocyte donor, we aimed to define which of these systems would provide the most accurate CL predictions in human for the same data set of 15 drugs. Therefore, the aim of this study was to investigate the HepatoPac<sup>®</sup> performance mainly for slowly cleared and highly bound compounds compared with the protocol we used for routine studies. In addition, we used a larger data set of 25 compounds for the MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>) system to challenge the common IVIVE methods (i.e., direct scaling without binding correction and conventional method using either  $f_{u_p}$  based on the free drug hypothesis or the adjusted  $f_{u_p}$  that considers the ALB-facilitated uptake hypothesis). Accordingly, the objective was also to monitor the ALB production in the HepatoPac<sup>®</sup> system compared with the *in vivo* condition in the liver in parallel to the metabolic stability (i.e., the ALB synthesis rate [ASR] and the number of ALB molecule per hepatocyte *in vitro* to that *in vivo*) This monitoring was also used to adjust the value of  $f_{u_p}$  determined *in vitro* for the real differential of ALB content in the *in vitro* assay to that in the liver *in vivo* to estimate the level of ALB-bound drug moiety that can also permeate into the hepatocytes, which is an essential information that could be used in the new Poulin-based IVIVE method.

In this context, it is expected that more the ALB is produced in an *in vitro* assay such as the HepatoPac<sup>®</sup> system, higher is the number of ALB molecule per hepatocyte, and therefore, higher will be the degree of prediction accuracy of that system compared with another *in vitro* assay not producing any ALB according to the ALB-facilitated uptake phenomenon. In that case, closer will be the ALB production between an *in vitro* assay and *in vivo* condition in the liver, more accurate the extrapolation of CL from that assay would be if we are assuming that the bound drug moiety may also permeate into the hepatocytes to be metabolized following a potential ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon. Consequently, although the  $CL_{int}$  of a bound drug is determined in an *in vitro* assay that may produce ALB, the corresponding IVIVE method including the binding correction of  $f_{u_p}$  would show less significant underprediction of the CL *in vivo* because that  $CL_{int}$  *in vitro* would have apparently been increased by the potential ALB-facilitated uptake phenomenon. Furthermore, if the new IVIVE method based on the value of  $f_{u_p}$ -adjusted is corrected with the real differential of ALB

concentration that is measured between that *in vitro* assay and liver *in vivo*, this IVIVE method would provide even more accurate CL prediction. Similarly, while the ALB production is superior in one donor compared with another donor, we also expect a superior  $CL_{int}$  *in vitro* in that donor because more molecule of ALB per hepatocyte is present for potentially more facilitated-hepatic uptake. Overall, this present study will guide any future investigation on the ALB binding versus the CL prediction as well as the on the comparison of the HepatoPac<sup>®</sup> system compared with other *in vitro* assays.

## Materials and Methods

### Compounds and Reagents

A total of 25 compounds covering a large range of physico-chemical and pharmacokinetic properties were considered in this study as demonstrated in the Tables. Alfuzosin, amiodarone, irbesartan, and zolpidem were synthesized at Sanofi. Amitriptyline, bosentan, caffeine, chlorpromazine, dextromethorphan, diazepam, diclofenac, imipramine, lorazepam, midazolam, oxazepam, phenacetine, propafenone, propranolol, quinidine, terfenadine, theophylline, tolbutamide, tolcapon, verapamil, warfarin, insulin, glucagon, gentamycin, dexamethasone, and Trypan blue were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ham's F-12 and Williams' E media, fetal calf serum, penicillin G, streptomycin, Insulin-Transferrin-Selenium, and Glutamax were purchased at Gibco/Life Technologies (Grand Island, NY). All other chemicals and reagents used were obtained from usual commercial sources and were of the highest commercially available grade.

The 25 reference drugs are thought to be eliminated by hepatic oxidative metabolic CL under *in vivo* conditions in humans based on the literature.<sup>41–43</sup> We are assuming that the metabolic activity is the main process governing the CL of those drugs compared with the transporter activity and uptake. However, because among the tested compounds, irbesartan, bosentan, and tolbutamide are also substrates of hepatic transporters, consequently, we also presented separate statistics by excluding these 3 compounds to verify whether this can affect our statistical analysis compared with the completely metabolized compounds. This is because although we are referring to only 1 single value of  $CL_{int}$  to predict the CL *in vivo* (as it is the case in this study), the correction with  $f_{u_p}$ -adjusted could be valid only when the metabolism, mediated transport, and passive membrane permeation are equally affected by the ALB. However, the single  $CL_{int}$  values measured in the HepatoPac<sup>®</sup> system should represent an apparent  $CL_{int}$  that should lump the impact of the metabolism versus uptake in the membrane. Accordingly, it has been demonstrated that the concept of ALB-facilitated hepatic uptake and hence, of  $f_{u_p}$ -adjusted is applicable as long as the drug gets to the hepatocyte membrane; consequently, the prediction of CL for drugs showing multiple CL processes was also improved by correcting the apparent  $CL_{int}$  values (determined by the combination of  $CL_{int}$  on the metabolism and mediated transport with permeability data) with  $f_{u_p}$ -adjusted.<sup>29</sup>

### HepatoPac<sup>®</sup>

Micropatterned Co-Culture plates were purchased from Ascendance Biotechnology, Inc. (Medford, MA) and recovered for 3 days after reception in proprietary Human HepatoPac<sup>®</sup> maintenance medium. Three batches of plateable cryopreserved primary human hepatocyte (PHH) were used with a density of 3500 (batches #4202 and #3121B) and 3200 (batch #3121A) hepatocytes seeded to each well of a 96-well plate. Hepatocyte donor informations are summarized in Table 1. Cells were cultured in a 37°C thermostatically

**Table 1**  
Hepatocyte Donor Demographic Information

Identification	Supplier	Donor Characteristics
#3121A	Ascendance (Medford, MA)	Female. 52-year old. Caucasian. Anoxia, CA
#4202	Ascendance	Female. 39-year old. Caucasian. Anoxia, CA
#3121B	Ascendance	Female. 48-year old. Polynesian. Trauma
#HH1024	In Vitro ADMET Laboratories (Columbia, MD)	Male. 48-year old. Caucasian. Anoxia, CVA
#IVT-LTG	BioreclamationIVT (Baltimore, MD)	Male. 56-year old. Caucasian. ICH
#BD-304	BD Biosciences/Corning (Tewksbury, MA)	Male. 64-year old. Caucasian. ICH

CA, cardiac arrest; CVA, cerebrovascular accident; ICH, intracerebral hemorrhage.

controlled incubator with 95% relative humidity and 10% CO<sub>2</sub> when maintained in Human HepatoPac<sup>®</sup> Maintenance Medium or 5% CO<sub>2</sub> when cultivated in proprietary metabolic stability application medium (Ascendance Biotechnology, Inc.). Mouse embryonic 3T3 fibroblast and acellular plates used as control were treated identically.

#### Assessment of Test Compound Stability With HepatoPac<sup>®</sup>

To adapt to serum-free conditions in MPCCs, the maintenance medium was replaced by application medium, and plates were incubated for 3 h before initiating the study. During the pre-incubation, compound dosing solutions were prepared in the application medium with a final concentration of 1 μM for each compound (from 1-mM dimethyl sulfoxide stock solution and with a final solvent concentration of 0.1%). The metabolic stability study was initiated by adding 64 μL of prewarmed application medium containing test compounds to each well. At appropriate time points (up to 79 h), the reaction was terminated by addition of 200 μL of quench solution (acetonitrile/water 40:30, v/v). The 96-well surface was scraped with the end of a pipette tip, and the mixture was immediately stored at -20°C for further analysis. Control plates (stromal cells only and acellular plate) were treated identically and in parallel (1) to ensure that the depletion of the substrates was specifically related to hepatocyte metabolism and (2) monitor any chemical instability in the medium (the last sampling time point was considered only).

#### Thawing Procedure for Cryopreserved Human Hepatocytes

Demographic donor information and supplier of hepatocytes batches used throughout the study are summarized in Table 1. Cryopreserved PHHs were thawed using cryopreserved hepatocyte recovery medium (ThermoFisher, Waltham, MA) and centrifuged 10 min at 100 × g. Viability for all human hepatocyte preparations used was greater than 95% as measured by Trypan blue exclusion test. Before seeding, cell concentration was adjusted to obtain a final density of 30 × 10<sup>3</sup> cells/well for hepatocyte suspensions (Ultra-Low Attachment Surface 96-well plates; Corning, Tewksbury, MA) and 160 × 10<sup>3</sup> cells/well for the monolayer model (Collagen I-coated 48-well plate, Corning, Tewksbury, MA). After seeding and a cell attachment period of around 4 h, the plating medium was removed. Cells were then incubated overnight with culture medium in a 37°C thermostatically controlled incubator, using 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity before initiating the study.

#### Cell Media for Suspension and Monolayer Models

The plating medium was composed of Ham's F-12 and Williams' E medium (50/50, v/v), supplemented with 10% decomplexed fetal calf serum, 10 mg/L insulin, 0.8 mg/L glucagon, 100 IU penicillin G, and 100 μg/mL streptomycin. Culture medium was based on 500 mL Williams' E medium devoid of serum supplemented

with 5 mL of Insulin-Transferrin-Selenium (100×), 5 mL of Gluta-max 100×, 500 μL of 50 mg/mL gentamycin solution, and 10 μL of a 5 mM dexamethasone stock solution.

#### Assessment of Test Compounds Stability in Suspension and Monolayer Models

Compound-dosing solutions for suspension and monolayer models were prepared as described in the part *Assessment of test compounds stability with HepatoPac<sup>®</sup> models* except that culture medium was used instead of application medium. For suspension, metabolic stability study was started immediately after thawing while for monolayer, the study was initiated the day after seeding. The final incubation volume of dosing solution was 100 μL/well for both models. At appropriate time points (up to 4 h for suspension and up to 24 h for monolayer), the reaction was terminated by addition of 700 μL of quench solution (acetonitrile/water 40:30, v/v), and the mixture (cells and medium) was stored at -20°C for analysis.

#### Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis

After dilution and addition of internal standards (Trifluoperidol for positive electrospray ionization and Chloramphenicol for negative electrospray ionization), the quantification of parent compound depletion was performed using an Acquity I-Class ultra performance liquid chromatography system (0.45 mL/min) BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm i.d. × 100 mm length, 1.7 μm particle size) and coupled to a Xevo TQ-S mass spectrometer (all from Waters, Milford, MA). Solvent A was 0.1% (v/v) formic acid in distilled water. Solvent B was a mixture of acetonitrile/methanol (80/20, v/v) and 0.1% formic acid (v/v). The elution conditions were as follows: gradient of 10% to 85% B from 0 to 0.6 min, followed by a gradient of 85% to 100% B from 0.6 to 1.5 min.

#### Quantitative Measurement of Human Serum ALB

Parallel to the metabolic stability assessment, culture supernatants—from application medium for MPCCs and culture medium for monolayer—from each individual hepatocyte donor were collected at each time point (pool of 2-wells) and stored at -80°C. The secretion of human serum ALB was measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Sandwich-ELISA) kit (ALB range between 0.31 ng/mL to 20 ng/mL) from Abcam (Cambridge, UK). Briefly, to perform the assay, samples or standards were added to the wells, followed by the antibody mix. After incubation, the wells were washed to remove unbound material. Tetramethylbenzidine substrate was added, and during incubation, it was catalyzed by Horseradish Peroxidase, generating blue coloration. This reaction was then stopped by addition of Stop Solution completing any color change from blue to yellow. Signal was generated proportionally to the amount of bound analyte, and the intensity was measured at 450 nm.

**Table 2**  
Physiological Parameters Used in This Study

Parameters	Human
Liver weight <sup>47</sup> (kg)	2.57% BW
Standard BW (kg)	70
PBSF <sup>47</sup> (10 <sup>6</sup> cells/kg BW)	2544.3
Q <sub>liver</sub> <sup>47</sup> (mL/min/kg)	20.7
Total liver volume <sup>45</sup> (mL)–Caucasian	1622 (888–2438) <sup>a</sup>
Plasma ALB concentration <sup>46</sup> (g/L)	43 (37–47) <sup>a</sup>
Absolute ALB synthesis rate <sup>46</sup> (mg/kg/d)	167 (127–239) <sup>a</sup>

Q<sub>liver</sub>, liver blood flow.<sup>a</sup> Mean (range).

### Data Analysis: Determination of CL<sub>int</sub>

The substrate depletion method was used for the measurement of *in vitro* CL<sub>int</sub>. Briefly, concentration versus time was plotted, and a one compartment analysis was conducted using PKSolver to calculate the elimination rate constant (Eq. 1)<sup>44</sup>:

$$C_t = C_0 e^{-k_{10}t} \quad (1)$$

where C<sub>t</sub> is the concentration at any time, C<sub>0</sub> is the concentration at t = 0 min, and k<sub>10</sub> is the elimination rate constant.

CL<sub>int, *in vitro*</sub> was subsequently computed taking into account the experimental conditions:

$$CL_{int, \text{ *in vitro* }} = k_{10} \times \frac{\text{Volume of incubation}}{\text{Number of hepatocytes/well}} \quad (2)$$

The CL<sub>int</sub> value used for IVIVE was obtained from CL<sub>int, *in vitro*</sub> by applying physiological-based scaling factor (PBSF) of 2544.3 × 10<sup>6</sup> cells/kg body weight (BW) for human (Ring et al.<sup>47</sup>) using Equation 3.

$$CL_{int} = CL_{int, \text{ *in vitro* }} \times \text{PBSF} \quad (3)$$

The other physiological parameters used in this study are shown in Table 2.<sup>45–47</sup>

### IVIVE Calculation Methods

The CL derived and predicted from *in vitro* hepatocyte data were compared with *in vivo* CL values observed in humans. The comparative assessment between the suspended and monolayer hepatocytes and the HepatoPac<sup>®</sup> system consisted of predicting the CL *in vivo* from 3 IVIVE methods, namely the direct scaling, conventional scaling, and Poulin scaling. All these methods are based on the well-stirred liver model and differ by plasma protein binding consideration. The direct scaling method does not consider any binding corrections, whereas the conventional method assumes that only the free drug in plasma *in vitro* is available for drug metabolism in the liver *in vivo*. The Poulin method assumes that the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon may participate to the delivery of additional bound drug moiety to the hepatocytes; therefore, the parameter fu<sub>p-adjusted</sub> is used as the correction factor in the original Poulin method. It is estimated by correcting the experimentally determined *in vitro* fu<sub>p</sub> value of each drug for any differential of ALB concentration in the absence of ALB in the *in vitro* assay to that in the presence of ALB in the liver *in vivo* to estimate the corresponding differential of bound drug concentration that is also assumed to be available for hepatic uptake. The corresponding equations of the IVIVE methods according the well-stirred liver model are described in Table 3 according to the original sources.<sup>26,27,34</sup> The list of drugs and all input parameters required for the IVIVE calculations are shown in

Table 4, and the observed CL<sub>int</sub> are summarized in Table 5. However, 4 drugs presented a relatively higher CL under *in vivo* conditions (i.e., propafenone, verapamil, phenacetin, and dextromethorphan); for those drugs the parallel-tube liver model based on Equation 4 was also challenged. The binding corrections were also included in this liver model.

$$CL = Q_{liver} \times \left( 1 - e^{-\frac{CL_{int}}{Q_{liver}}} \right) \quad (4)$$

### Estimation of fu<sub>p-adjusted</sub>

The adjustment of fu<sub>p</sub> is based on the binding isotherm that extrapolates the measured fu<sub>p</sub> value *in vitro* to an fu<sub>p</sub> value adjusted for the *in vivo* conditions. The adjustments refer to (1) apply the differential of ALB concentration between the *in vitro* assay and liver *in vivo* (and hence, of the corresponding ratio of ALB-bound drug complex, i.e., assumed to enhance the hepatic uptake of the bound drug moiety after an interaction with the hepatocyte surface), and (2) apply the corresponding pH gradient effect on the unbound drug moiety presents in the aqueous phase. Hence, the ratio between the calculated fu<sub>p-adjusted</sub> and measured fu<sub>p</sub> values corresponds to the factor used to correct the conventional IVIVE method based on fu<sub>p</sub> for the presumed ALB-facilitated uptake phenomenon.

The essential input parameters used to calculate fu<sub>p-adjusted</sub> are referring to PLR that corresponds to the plasma-to-whole liver concentration ratio of ALB under *in vivo* condition. The input PLR value is not an empirical factor; it is rather a physiological factor based on real measurements on the differential of ALB concentration between the plasma and liver *in vivo*. Under normal physiological *in vivo* condition, the measured PLR value is ranging up to 13.3 depending of the literature sources. The commonly used PLR value of 13.3 should only be considered to adjust the value of fu<sub>p</sub> determined *in vitro*, whereas the CL<sub>int</sub> of a drug is obtained in an *in vitro* assay into which no ALB has been added or if this assay is not producing any ALB by contrast to the liver *in vivo*. In such *in vitro* assay, we are assuming that the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon is not present compared with the *in vivo* condition in liver. In other words, the CL<sub>int</sub> determined *in vitro* should represent only a measure of the hepatic uptake of the free drug moiety by contrast to the *in vivo* condition in liver where the bound drug moiety is also assumed to be available for uptake. Conversely, the PLR value should be equal to 1, whereas an *in vitro* assay is producing ALB at a level similar to the *in vivo* condition in liver (i.e., there is no need to adjust fu<sub>p</sub>, and hence, fu<sub>p-adjusted</sub> is simply set equal to fu<sub>p</sub> with the pH gradient effect). Therefore, lower is the ALB concentration measured in an *in vitro* assay closer is the adjusted PLR value to 13.3, and inversely, higher is the ALB concentration measured in an *in vitro* assay closer is the adjusted PLR value to 1. Accordingly, while an *in vitro* assay is producing ALB (e.g., the HepatoPac<sup>®</sup> system used in this study), the value of PLR needs to be adjusted to reflect the real incubation medium *in vitro*-to-liver *in vivo* concentration ratio of ALB prior to any calculation of fu<sub>p-adjusted</sub>.

To support the estimation of the PLR value for the current HepatoPac<sup>®</sup> system, the ALB production was monitored in parallel to the metabolic stability, as described previously. This was made to potentially improve the CL prediction from the HepatoPac<sup>®</sup> system compared with the monolayer or suspended hepatocyte models. In practice, the ALB concentration was converted to the number of ALB molecule per number of hepatocyte in the HepatoPac<sup>®</sup> system, and this was compared with the *in vivo* condition in liver to estimate the adjusted PLR value for

**Table 3**  
IVIVE Methods Tested in This Study for the Prediction of Plasma CL

IVIVE Methods	Model Equations of CL
Conventional method	$CL = \frac{Q_{liver} R_{BP} CL_{int} f_{u_p}/f_{u_{hep}}}{Q_{liver} R_{BP} + CL_{int} f_{u_p}/f_{u_{hep}}}$
Direct scaling method	$CL = \frac{Q_{liver} R_{BP} CL_{int}}{Q_{liver} R_{BP} + CL_{int}}$
Poulin method	$CL = \frac{Q_{liver} R_{BP} CL_{int} f_{u_{p-adj}}/f_{u_{hep}}}{Q_{liver} R_{BP} + CL_{int} f_{u_{p-adj}}/f_{u_{hep}}}$
Where	
$f_{u_{p-adj}} = \frac{PLR-adjusted \times f_{u_p} \times \frac{f_{unionized-plasma}}{f_{unionized-liver,cells}}}{1 + (PLR - adjusted - 1) \times f_{u_p} \times \frac{f_{unionized-plasma}}{f_{unionized-liver,cells}}}$	

For additional details on these equations, please refer to the [Method](#) section and previous studies.<sup>26,27,37</sup>

CL, hepatic clearance;  $Q_{liver}$ , liver blood flow rate;  $R_{BP}$ , ratio blood-to-plasma;  $f_{u_{p-adj}}$ , unbound fraction in plasma adjusted for the liver considering the ALB-facilitated uptake and pH gradient effects;  $f_{u_{hep}}$ , unbound fraction in incubations of hepatocytes; PLR-adjusted, PLR of ALB adjusted for each donor;  $f_{unionized}$ , fraction of drug unionized calculated from standard Henderson-Hasselbalch equations with the pKa value of each drug assumed the pH values on both sides of the membrane (i.e., 7.1 for hepatocytes and 7.4 for the incubation medium and plasma).

that system (i.e., the ratio HepatoPac<sup>®</sup> *in vitro*-to-liver *in vivo*). The adjustments of PLR are detailed later in the results section where we are presenting the essential measurements of ALB levels in each *in vitro* assay. Note that under normal *in vivo* conditions in the liver, the concentration of ALB should be at steady-state, which is probably not the case in the *in vitro* HepatoPac<sup>®</sup> system. This aspect was addressed by selecting ALB concentration data measured at the 48-h time point only to adjust the PLR value, which is the intermediate time point used in this study that should reflect a fair estimate of successive additions of the potential ALB-facilitated uptake effect(s) before the complete depletion. However, ALB concentration data could

also be pondered over the time points but up to the nearest time point, at which complete depletion of each compound occurs (i.e., the average of ALB data from the first time point at 6 h to either 28, 48, or 79 h). Consequently, for more precaution, these 2 different approaches were challenged in this study because the subsequent model performance of the PLR adjusted approach is entirely based on the selection of the ALB concentration data.

Whereas the other essential input parameters used to calculate  $f_{u_{p-adj}}$  refer to  $f_{unionized,cells}$  and  $f_{unionized,plasma}$ , which are respectively the corresponding fraction of unionized drug in plasma (pH ~ 7.4) and hepatocytes *in vivo* (pH ~ 7.0) for

**Table 4**  
Physicochemical and Pharmacokinetic Parameters in Human of the Test Compounds

Compound Name	Main Enzymes <sup>a</sup>	Class of Drug <sup>a</sup>	log p <sup>a</sup>	pKa acid <sup>a</sup>	pKa base <sup>a</sup>	Fraction Unbound in Plasma ( $f_{u_p}$ ) <sup>a</sup>	Blood-to-Plasma Ratio ( $R_{BP}$ ) <sup>a</sup>	Observed Plasma CL <sup>a</sup> (mL/min/kg)	$f_{u_{hep}}$ Monolayer <sup>c</sup>	$f_{u_{hep}}$ Suspension <sup>c</sup>
Warfarin	CYP2C9	Acid	3.1	4.8		0.013	0.55	0.1	0.88	0.98
Tolbutamide	CYP2C9, OAT2	Acid	3.1	5.2		0.05	0.65	0.2	0.88	0.98
Tolcapone	UGT	Acid	2.6	4.8		0.001	0.6	1.7	0.93	0.99
Bosentan	CYP3A4, OATP	Acid	3.1	4.6		0.037	0.58	2.1	0.89	0.98
Irbesartan	UGT, OATP	Acid	4.5	4.2		0.1	0.55	2.2	0.68	0.92
Diclofenac	CYP2C9, UGT2B7/1A9	Acid	4.5	4.2		0.008	0.55	3.6	ND	ND
Amiodarone	CYP2C, 1A2, 3A4	Base	>6.3		9.1	0.04	0.73	1.9	ND	ND
Terfenadine	CYP3A4	Base	7.1		8.6	0.03	1 <sup>b</sup>	4	ND	ND
Alfuzosin	CYP3A4	Base	1.5		8.1	0.13	0.82	5	0.99	1.00
Amitriptyline	CYP2C19, 2D6	Base	4.9		8.7	0.07	0.86	6.1	0.84	0.97
Quinidine	CYP3A4, 2D6	Base	3.4		9.5	0.195	0.9	7.1	ND	ND
Chlorpromazine	CYP2D6	Base	5.4		9.3	0.053	0.98	12.3	ND	ND
Imipramine	CYP1A2, 2D6, 3A4, 2C9	Base	4.8		9	0.088	1.08	13.3	ND	ND
Propranolol	CYP2D6	Base	3.6		9.1	0.13	0.83	14	0.96	0.99
Propafenone	CYP2D6, 3A4, 1A2	Base	3.2		9.1	0.038	0.7	16	ND	ND
Verapamil	CYP3A4	Base	3.8		8.8	0.093	0.77	18	ND	ND
Phenacetin	CYP1A2	Base	1.4		9.1	0.47	1 <sup>b</sup>	20.7 (~ $Q_{liver}$ )	0.97	0.99
Dextromethorphan	CYP2D6	Base	3.3		9.2	0.77	1.76 (rat)	20.7 (~ $Q_{liver}$ )	0.97	0.99
Diazepam	CYP3A4, 2C19	Neutral	2.2			0.023	0.63	0.4	0.94	0.99
Theophylline	CYP1A2	Neutral	-0.14			0.525	0.83	0.9	0.99	1.00
Lorazepam	UGT	Neutral	2.4			0.09	1 <sup>b</sup>	1.1	0.94	0.99
Oxazepam	UGT	Neutral	2.2			0.045	1.11	1.3	ND	ND
Caffeine	CYP1A2	Neutral	-0.09			0.67	1.08	1.4	0.99	1.00
Zolpidem	CYP3A4	Neutral	1.3			0.08	0.76	4.3	ND	ND
Midazolam	CYP3A4	Neutral	3.3			0.03	0.54	6	0.87	0.97

ND, not determined/calculated because these drugs were tested only with the MPCC (HepatoPac<sup>®</sup>) system for which the values of  $f_{u_{hep}}$  are set equal to the unity.

<sup>a</sup> Compiled from [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) and literature data.<sup>41-43</sup>

<sup>b</sup> Value of 1 was used when  $R_{BP}$  value was unknown.

<sup>c</sup> Predicted as detailed by Austin et al.<sup>48</sup> and as described in the [Method](#).  $f_{u_{hep}}$  in MPCC was assumed equal to unity as explained in the [Method](#).

**Table 5**  
Predicted and Observed Plasma CL

Compound Name	Extrapolated $CL_{int, in vivo}$ (mL/min/kg) From <i>In Vitro</i> Data						Predicted CL <sub>p</sub> From Data Generated in MPCCs <sup>a</sup> (mL/min/kg)					<i>In Vivo</i> Observed CL <sub>p</sub> (mL/min/kg)
	Suspension Donor 1 #3121A	Monolayer Donor 1 #3121A	MPCCs Donor 1 #3121A	MPCCs Donor 2 #4202	MPCCs Donor 3 #3121B	Substrate Depletion Time in MPCC (h)	Direct Scaling	Conventional Method With $f_{up}/f_{u,inc}$	Poulin et al. With PLR Original With $f_{up-adjusted}/f_{u,inc}$ <sup>b</sup>	This Study: Poulin et al. With PLR Adjusted Using the Average of [ALB] With $f_{up-adjusted}/f_{u,inc}$ <sup>c</sup>	This Study: Poulin et al. With PLR Adjusted Using [ALB] at 48 h With $f_{up-adjusted}/f_{u,inc}$ <sup>c</sup>	
Warfarin	ND	0.7	3.3	1.4	2.8	79	2.0	0.03	0.15	0.06	0.05	0.06
Tolbutamide	1.7	2.4	5.7	3.1	2.3	79	2.85	0.18	0.75	0.30	0.23	0.22
Tolcapone	168.7	53.6	431.6	354.8	354.1	48	12.0 <sup>d</sup>	0.44 <sup>d</sup>	2.02 <sup>d</sup>	1.56 <sup>d</sup>	0.61 <sup>d</sup>	1.7
Bosentan	16.8	4.9	40.7	39.9	25.2	48	8.9	1.2	3.9	2.5	1.5	2.1
Irbesartan	54.4	16.1	108.2	80.2	81.5	79	10.1	5.0	8.4	7.9	5.6	2.2
Diclofenac	NT	NT	375.6	323.2	284.6	48	11.0	2.0	6.0	5.1	2.6	3.6
Amiodarone	NT	NT	18.2	21.7	16.4	79	8.3	0.7	1.7	4.5	3.8	1.9
Terfenadine	NT	NT	170.8	163.9	148.9	79	18.3 <sup>d</sup>	3.9 <sup>d</sup>	7.5 <sup>d</sup>	15.9 <sup>d</sup>	12.9 <sup>d</sup>	4
Alfuzosin	6.7	5.3	20.9	19.7	14.5	28	8.8	2.1	4.1	7.0	6.5	5
Amitriptyline	35.6	8.6	48.2	NT	NT	79	13.0 <sup>e</sup>	2.8 <sup>e</sup>	5.6 <sup>e</sup>	10.4 <sup>e</sup>	8.8 <sup>e</sup>	6.1
Quinidine	NT	NT	47.9	38.5	25.1	28	12.2	5.1	9.0	11.3	11.0	7.1
Chlorpromazine	NT	NT	62.0	54.0	26.3	79	13.8	2.2	4.7	10.6	8.7	12.3
Imipramine	NT	NT	44.3	40.6	15.8	28	12.9	2.6	5.3	9.7	9.0	13.3
Propranolol	44.2	24.5	68.5	NT	NT	48	13.7 <sup>e</sup>	5.9 <sup>e</sup>	9.7 <sup>e</sup>	13.0 <sup>e</sup>	11.9 <sup>e</sup>	14
Propafenone	NT	NT	129.7	131.4	65.8	48	12.7	3.2	5.9	11.3	9.5	16
Verapamil	NT	NT	156.2	151.6	89.7	28	14.1	6.9	10.3	13.6	12.8	18
Phenacetin	6.9	5.3	50.2	37.0	19.3	28	12.6	8.9	13.4	12.7	13.7	20.7 (-Q <sub>liver</sub> )
Dextromethorphan	73.8	22.0	30.6	NT	NT	48	16.6 <sup>e</sup>	14.3 <sup>e</sup>	20.7 <sup>e</sup>	18.0 <sup>e</sup>	18.4 <sup>e</sup>	20.7 (-Q <sub>liver</sub> )
Diazepam	17.9	5.7	9.6	6.3	5.3	28	4.5	0.16	1.46	0.63	0.49	0.38
Theophylline	0.1	ND	0.9	NT	NT	79	0.81 <sup>e</sup>	0.44 <sup>e</sup>	0.76 <sup>e</sup>	0.65 <sup>e</sup>	0.62 <sup>e</sup>	0.86
Lorazepam	0.8	2.5	6.7	NT	NT	79	5.1 <sup>e</sup>	0.6 <sup>e</sup>	3.2	1.6 <sup>e</sup>	1.3 <sup>e</sup>	1.1
Oxazepam	NT	NT	34.3	61.0	18.9	28	13.6	1.6	8.5	6.2	4.0	1.3
Caffeine	ND	ND	1.4	ND	ND	28	1.3 <sup>e</sup>	0.9 <sup>e</sup>	1.3 <sup>e</sup>	1.2 <sup>e</sup>	1.1 <sup>e</sup>	1.4
Zolpidem	NT	NT	24.4	16.7	11.3	79	8.1	1.3	5.7	3.7	3.1	4.3
Midazolam	169.3	93.8	343.1	287.2	204.0	79	10.7	4.7	9.8	9.5	7.8	6

NT, not tested; ND, no depletion was observed (the rate is too slow to be captured adequately).

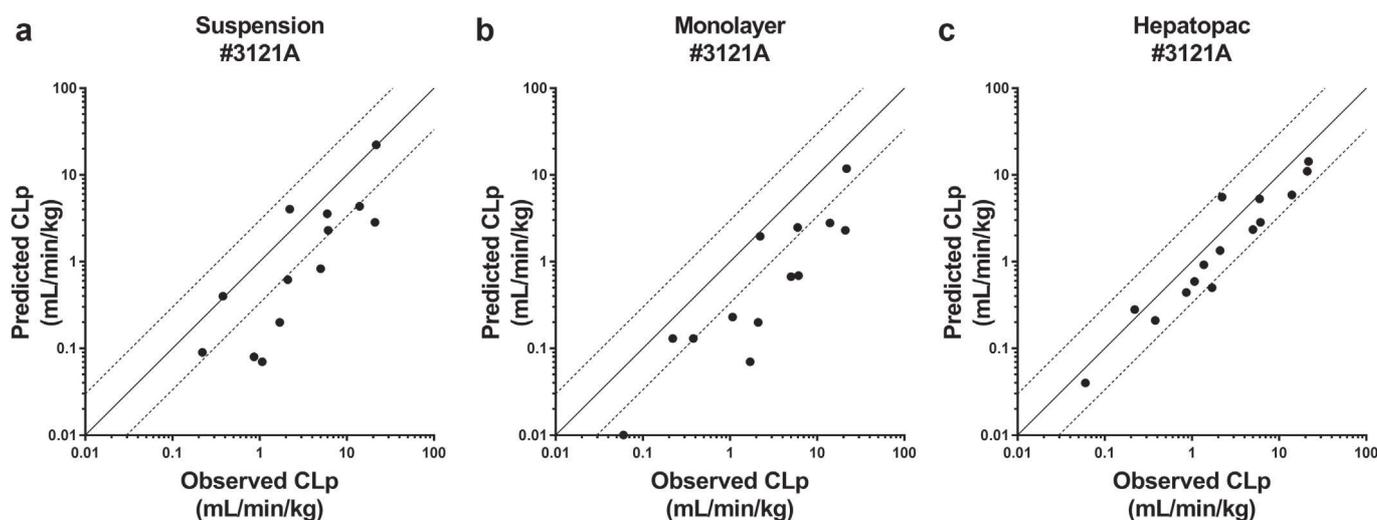
<sup>a</sup> CL<sub>p</sub> predicted from the mean values of  $CL_{int, in vivo}$  and the well-stirred model excepted for phenacetin, dextromethorphan, propafenone, and verapamil for which the parallel-tube model was used instead.

<sup>b</sup> Binding to ALB was assumed to be preferred for acidic and neutral drugs (PLR = 13.3), whereas binding to AAG was assumed to be preferred for basic drugs (PLR = 1).

<sup>c</sup> In this study, the PLR values adjusted values were used for each class of drugs because ALB was the most abundant protein in the HepatoPac<sup>®</sup> (MPCC) system as measured in this study.

<sup>d</sup> Terfenadine and Tolcapone were excluded from the comparative assessment due to complete metabolism observed on stromal cells only in control plate.

<sup>e</sup> Only tested on batch #3121A.



**Figure 1.** Comparison between the predicted and observed plasma clearance (CLp) in humans referring to the 3 *in vitro* assays for the conventional IVIVE method detailed in Table 3. The same PHH donor is considered. (a) Predicted CLp from suspended hepatocytes and using the conventional IVIVE method based on  $f_{u_p}$ . (b) Predicted CLp from plated hepatocytes and using the conventional IVIVE method based on  $f_{u_p}$ . (c) Predicted CLp from MPCCs and using the conventional IVIVE method based on  $f_{u_p}$ . The solid line indicates the best fit (unity), and dashed lines on either side of unity represent the 3-fold error envelope.

considering the pH gradient effect, and they were calculated from standard Henderson-Hasselbalch equations and the pKa value of each drug. A pH effect was also considered to correct the current IVIVEs since it has been reported that the hepatocytes acquire more or less the same pH as the incubation buffer (i.e., 7.4) during the experiments.

#### Determination of $f_{u_{hep}}$

The unbound fraction in the incubations of hepatocytes ( $f_{u_{hep,monolayer}}$  and  $f_{u_{hep,suspension}}$ ) was predicted, according to Austin et al.<sup>48</sup> for a cell density of  $30 \times 10^3$  and  $160 \times 10^3$  cells per well for suspended and plated hepatocytes, respectively, (i.e.,  $0.16 \times$  and  $0.03 \times 10^6$  cells/mL). Regarding the very low density of hepatocytes per well in the HepatoPac<sup>®</sup> system (maximum of 3500 cells/well), and the  $f_{u_{hep,hepatopac}}$  measured by Kratochwil et al.,<sup>23</sup> it was assumed that  $f_{u_{hep,hepatopac}}$  was equal to 1 for each drug tested in MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>).

#### Evaluation of Predictive Performance: Statistics

Predicted CL was compared with the observed human CL to determine the predictability of each method as already described by Poulin and Theil.<sup>49</sup> Briefly, to evaluate accuracy, precision, and correlation, average fold error (AFE) that is the geometric mean fold error, coefficient of correlation ( $R^2$ ), and absolute average fold error (AAFE) were calculated and presented for each IVIVE method.

With the following equations, specific fold errors of deviation between the predicted and observed values (percentage of fold error  $\leq 1.5$ ,  $\leq 2$ ,  $\leq 3$ , and  $\leq 4$ ) were also calculated.

$$AFE = 10^{\frac{1}{N} \sum \log \frac{\text{Predicted}}{\text{Observed}}}$$

$$AAFE = 10^{\frac{1}{N} \sum |\log \frac{\text{Predicted}}{\text{Observed}}|}$$

Finally, plots of predicted versus observed CL values are also presented for each IVIVE method.

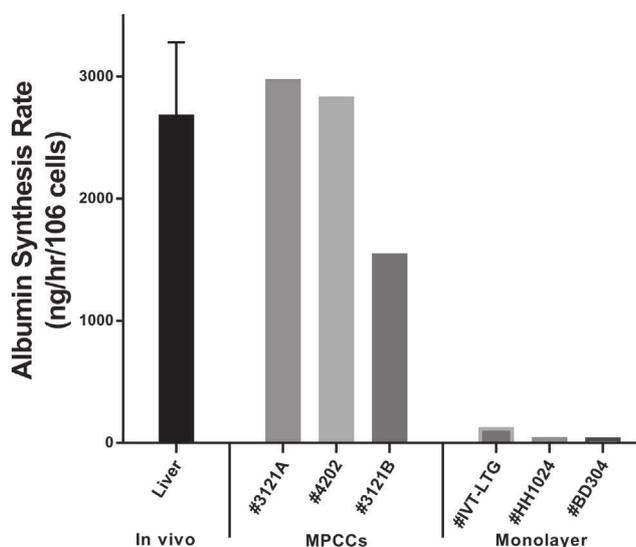
## Results

### Comparison of In Vitro Hepatocyte Models for the Conventional IVIVE Method Based on $f_{u_p}$

Three *in vitro* models (suspension, monolayer and MPCCs: HepatoPac<sup>®</sup>) were compared using a single donor of hepatocytes (batch #3121A) and a first data set of 15 drugs. With incubation up to 79 h, MPCCs allowed to determine the  $CL_{int}$  for all molecules tested while no substrate turnover was observed for caffeine and warfarin after 4 h in suspension. In plated hepatocytes, no metabolism was measured for theophylline and caffeine after the 24 h incubation. Drug CL was predicted from *in vitro* data using the conventional IVIVE method based on the binding correction  $f_{u_p}/f_{u_{hep}}$  to explore the predictive performance of each *in vitro* model. The plots of observed versus predicted CL for suspension, monolayer, and MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>) are shown in Figures 1a, 1b, and 1c, respectively. As described in the literature, the predictions showed that the conventional method in association with standard *in vitro* models such as suspension or monolayer resulted in a marked underestimation of CL. However, the predictive performance was significantly improved when the conventional method was applied to MPCC data. Human CL was predicted within 3-fold of the observed CL for 93% of the compounds with the HepatoPac<sup>®</sup> system, whereas the suspended and plated hepatocytes exhibited lower levels of accuracy with 46% and 38% of compounds, respectively, within the same 3-fold error envelope. The results obtained in this study demonstrate the superior capability of the HepatoPac<sup>®</sup> system with the conventional IVIVE method based on  $f_{u_p}$ .

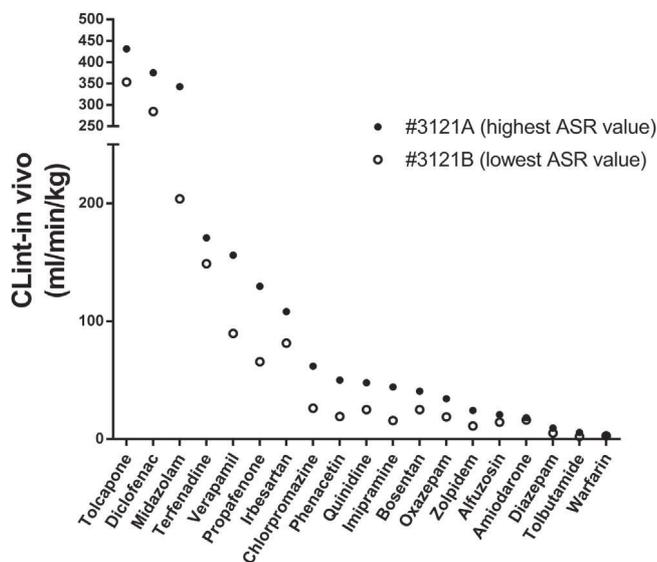
### ALB Synthesis Rate

Production capacity regarding ALB was compared between the liver (*in vivo*), MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup> *in vitro*) and monolayer (*in vitro*). The absolute ALB synthesis rate which corresponds to the absolute amount of ALB that is daily synthesized is about 167 mg/kg/d for a 70 kg human.<sup>46</sup> Using a PBSF of  $2544.3 \cdot 10^6$  cells/kg of BW,<sup>47</sup> ASR value for a healthy human liver is about 2688 ng/h/ $10^6$  cells/d. ALB in MPCCs was monitored in this present study for the 3 donors #3121A, #4202, and #3121B. Owing to PHH sourcing limitations, 3 other donors (#IVT-LTG, #HH1024, and #BD304) were selected for



**Figure 2.** ASR determined in batches of hepatocytes cultivated for 24 h in MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>) and monolayer hepatocytes against the AST of the liver observed under *in vivo* condition. Liver data represent the mean  $\pm$  standard deviation.

the monolayer study. *In vitro* ALB synthesis rate was determined from the ALB concentration measured in the culture medium after 24-h incubation. It is assumed that no catabolism or degradation of ALB occurs in both systems during this short-time incubation. An ASR average of 76 ng/h/10<sup>6</sup> cells/d (i.e., 131, 49, and 47 ng/h/10<sup>6</sup> cells for #IVT-LTG, #HH1024, and #BD304, respectively) was found for the 3 hepatocyte batches cultivated in monolayer. With a mean value of 2457 ng/h/10<sup>6</sup> cells/d (i.e., 2982, 2838, and 1552 ng/h/10<sup>6</sup> cells for #3121A, #4202, and #3121B, respectively), the ASR in MPCCs appears considerably closer to the *in vivo* situation in liver and was 32.5 times higher than the monolayer cultures (Fig. 2). In addition, no ALB was detected in the control plate containing the stromal cells only (without hepatocytes), signing a specific synthesis by the hepatocytes.



**Figure 3.** CL<sub>int</sub> values determined from 2 individual batches of hepatocytes cultivated in MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>). Donor #3121A showing the highest ASR value (2982 ng/h/10<sup>6</sup> cells), and donor #3121B showing the lowest ASR value (1552 ng/h/10<sup>6</sup> cells).

#### Adjustment of the PLR Value Used in the Native Poulin et al. IVIVE Method

According to the highest capacities of the HepatoPac<sup>®</sup> system regarding ALB synthesis, we decided to investigate further the impact of this protein on the CL prediction. The CL<sub>int</sub> of 19 compounds obtained in MPCCs were compared between the hepatocyte batches #3121A having the highest ASR value versus #3121B having the lowest ASR value (2982 and 1552 ng/h/10<sup>6</sup> cells, respectively). The CL<sub>int</sub> of each drug tested was higher for #3121A than for #3121B suggesting a potential relationship between the rate of metabolism and the ALB synthesis capacity of each hepatocytes batches (i.e., the number of ALB molecule per hepatocyte; Fig. 3). In other words, the results suggest that more the ALB is synthesized by the hepatocytes in the HepatoPac<sup>®</sup> system, higher is the CL<sub>int</sub>, and inversely. This could possibly be due to the presence of more ALB-drug complex at the hepatocyte surface that may penetrate into the cells by an ALB-facilitated mechanism. However, differences in CL<sub>int</sub> between the batches of hepatocytes have not been fully assessed, and hence, differences could also be due either to a different enzyme activity across the 2 donors or may simply suggest the presence of an ALB-facilitated uptake phenomenon in the HepatoPac<sup>®</sup> system.

Based on these observations and the ALB-facilitated uptake hypothesis, we adjusted the original PLR value of 13.3 used in the native Poulin-based IVIVE method to mimic the capacity of each hepatocytes batch in our HepatoPac<sup>®</sup> system. Hepatocyte density, concentration, and quantity of ALB on each system were the key considerations for the calculation of the adjusted PLR value. Based on the hepatocellularity of 2544.3.10<sup>6</sup> cells/kg BW and the *in vivo* PLR value of 13.3, the ALB quantity per hepatocytes *in vivo* is 0.029 ng for a reference concentration of ALB in plasma of 43 g/L. In the HepatoPac<sup>®</sup> system, the concentration of ALB measured at the sampling time nearest to half of the kinetics (48 h) were 7156, 7449, and 4074 ng/mL for batches #3121A, #4202, and #3121B, respectively. According to the number of hepatocytes per well, ALB quantity in MPCCs were about 0.143, 0.136, and 0.074 ng per hepatocyte for #3121A, #4202, and #3121B, respectively. The amount of ALB that can interact with the hepatocytes differs between MPCCs *in vitro* and liver *in vivo*; this is why the original PLR value in the Poulin-based IVIVE method needs to be adjusted accordingly. Parameters used to determine the adjusted values of PLR at time 48 h are detailed in Table 6. PLR adjusted values were 2.7, 2.9, and 5.3 for batches #3121A, #4202, and #3121B, respectively. Note that in addition to the PLR value adjusted from ALB concentration data determined at 48 h in the HepatoPac<sup>®</sup> system, the pondered PLR values for each drug and donor were also challenged as explained in the method, which represents the PLR value determined from the average of ALB concentration between the first time point and the time point nearest the complete metabolic depletion.

#### Prediction Accuracy of CL From In Vitro Data Generated in MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>) and Comparative Assessment of IVIVE Methods

Tolcapone and terfenadine that were initially included in the study data set were excluded from the current comparative assessment due to complete metabolism observed in control stromal cell plate in the MPCC system. Three IVIVE calculation methods (direct scaling, conventional scaling based on  $f_{up}$  nonadjusted, and Poulin-based scaling method using the adjusted  $f_{up}$  and PLR values) were assessed for a total of 23 drugs tested in MPCCs and with 3 different hepatocyte batches. The same data sets were used to compare all IVIVE methods, and the evaluation was conducted based on several statistical parameters. The plots of observed

**Table 6**  
Proposed Approach Used to Estimate the Value of PLR-Adjusted Using [ALB] at Time 48 h According to the ALB Synthesis Capacity of Each Donor

Parameters Used for the Calculation of PLR Adjusted	<i>In Vivo</i>		<i>In Vitro</i>		
	Liver ( <i>In Vivo</i> )	Plasma ( <i>In Vivo</i> )	MPCCs Donor 1 #3121A	MPCCs Donor 2 #4202	MPCCs Donor 3 #3121B
Number of hepatocytes	1.8E+11	—	3200	3500	3500
PLR of ALB <i>in vivo</i>	13.3	—	—	—	—
ALB concentration (ng/mL)	3.2E+06	4.3E+07	7156 <sup>a</sup>	7449 <sup>a</sup>	4074 <sup>a</sup>
Volume (mL)	1622	3100	0.064	0.064	0.064
ALB quantity on each system (ng)	5.2E+09	—	458	477	261
ALB quantity per hepatocyte (ng)	0.029	—	0.143	0.136	0.074
Ratio ALB quantity per hepatocyte ( <i>in vitro/in vivo</i> )	—	—	4.9	4.6	2.5
PLR-adjusted (PLR13.3/ratio)	—	—	2.7	2.9	5.3

<sup>a</sup> ALB concentration in supernatant measured at time 48 h.

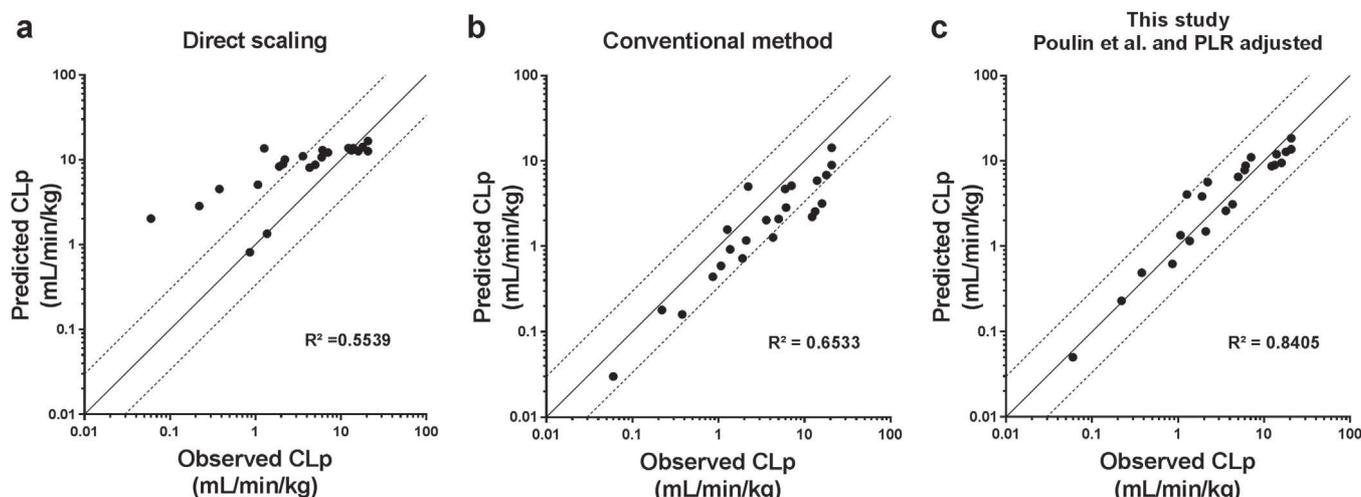
versus predicted CL for each method are shown in Figure 4a (direct scaling), 4b (conventional with  $f_{up}$  non-adjusted), and 4c (Poulin-based with  $f_{up}$  adjusted). The overall statistical summary in terms of precision, accuracy, and correlation is detailed in Tables 7 and 8.

Predictions generated from the direct scaling method showed a tendency for overestimation (AAFE up to 2.67), in particular for low CL compounds ( $\leq 20\%$   $Q_{liver}$ ) (AFE up to 5.21). The direct scaling method did not generate significantly more accurate predictions compared with the 2 other IVIVE methods. Whereas the conventional scaling method which considered the binding correction factor  $f_{up}/f_{up,hep}$  showed a marked improvement in the prediction from MPCCs data compared with monolayer or suspended hepatocytes, as presented previously. Therefore, these results generated on a larger data set of drugs confirm the capability of MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>) to predict the CL *in vivo* more accurately with the conventional scaling method. Accordingly, 83% of the compounds showed predicted CL within 3-fold error of the observed CL; however, this IVIVE method based on  $f_{up}$  still shows general trends of underestimation of the real CL *in vivo* for all sub-data sets of drugs investigated in this study (AFE values range from 0.37 to 0.66).

The most accurate predictions were obtained with the Poulin-based IVIVE method associated with the proposed PLR and  $f_{up}$  values adjusted for the differential of ALB production between the HepatoPac<sup>®</sup> *in vitro* system and liver *in vivo*. No systematic bias was

observed with this specific scaling method. In other words, the statistical parameters were in favor of the Poulin-based IVIVE method compared with the conventional method based on the nonadjusted  $f_{up}$  values. This is particularly true in term of precision since the number of drugs for which their observed CL was predicted within 1.5-fold and 2-fold error is much greater with the Poulin-based IVIVE method compared with the 2 other IVIVE methods tested in this study. Accordingly, the prediction accuracy is high (i.e., up to 85% of the predictions fall within 1-5 fold error and 90% within 2-fold error) for the studied data sets. Furthermore, the statistical values of AFE, AAFE, and  $R^2$  become closer to unity for all tested scenarios (Tables 7 and 8). Only one drug for which its CL is governed principally by the metabolism (oxazepam) showed a relatively more accurate CL prediction in humans by using the conventional IVIVE method based on  $f_{up}$  compared with  $f_{up-adjusted}$ , which again demonstrated the superior predictability of the Poulin-based IVIVE method based on  $f_{up-adjusted}$  (Table 5).

Note that the use of the PLR value adjusted from the ALB concentration data determined at the intermediate time point of 48 h only (designated as “Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h”) or from the average of ALB concentration between the first time point and the time point nearest the complete depletion of each drug (designated as “Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]”) showed generally more similar degrees of accuracy (Tables 5, 7, and 8). However, the native Poulin-based



**Figure 4.** Comparison between the predicted and observed plasma clearance (CLp) in humans referring to the HepatoPac<sup>®</sup> *in vitro* assay and 3 IVIVE methods. All drugs ( $n = 23$  compounds). (a) Direct scaling method without binding correction. (b) Conventional scaling method including  $f_{up}$ . (c) Poulin-based scaling method including  $f_{up-adjusted}$  and a corresponding adjusted PLR value referring to the ALB synthesis capacity of each donor at time 48 h. The  $CL_{int}$  and other input parameters that were used for the predictions were generated in MPCCs (HepatoPac<sup>®</sup>) and are presented in Tables 4 and 5. The solid line indicates the best fit (unity), and dashed lines on either side of unity represent the 3-fold error envelope.

**Table 7**  
Comparative Assessment of IVIVE Methods Used to Predict Plasma CL in Humans From Data Generated on HepatoPac®

Scenarios and IVIVE Methods	% ≤ 1.5-Fold Error	% ≤ 2-Fold Error	% ≤ 3-Fold Error	% ≤ 4-Fold Error	AFE	AAFE	R <sup>2</sup>
All predictions (n = 23 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	74	87	96	100	1.03	1.46	0.84
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	61	87	91	96	1.24	1.52	0.79
Original: Poulin et al. with nonadjusted PLR value	39	61	78	96	1.25	1.91	0.57
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	22	48	83	87	0.50	2.19	0.65
Direct scaling	35	57	61	65	2.38	2.67	0.55
Acids and neutrals (n = 12 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	83	83	92	100	1.10	1.47	0.63
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	58	83	83	92	1.46	1.61	0.59
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	33	75	92	100	0.66	1.80	0.49
Direct scaling	17	33	33	42	4.38	4.44	0.37
Bases (n = 11 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	64	91	100	100	0.95	1.45	0.70
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	64	91	100	100	1.04	1.44	0.70
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	18	18	73	73	0.37	2.71	0.57
Direct scaling	55	82	91	91	1.22	1.53	0.60
Drug with low CL (<20% Q <sub>liver</sub> ) <sup>a</sup> (n = 11 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	73	73	91	100	1.19	1.54	0.38
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	55	73	82	91	1.59	1.71	0.50
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	27	73	100	100	0.67	1.81	0.37
Direct scaling	18	18	18	27	5.13	5.21	0.45
Drugs with low fu <sub>p</sub> (<0.1) (n = 15 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	80	87	93	100	1.01	1.48	0.84
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	60	87	93	93	1.30	1.54	0.79
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	20	47	73	80	0.44	2.35	0.63
Direct scaling	27	40	47	53	3.35	3.59	0.52
Drugs with very low fu <sub>p</sub> (<0.05) (n = 9 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	67	78	89	100	1.12	1.54	0.75
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	56	78	89	89	1.55	1.67	0.71
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	33	67	89	89	0.54	1.93	0.48
Direct scaling	11	22	22	33	5.50	5.79	0.33

In this assessment, the well-stirred liver model was used for all drugs and bosentan, irbesartan, and tolbutamide that are also substrates for hepatic transporters were included. Comparison between the predicted and observed values of CL. Q<sub>liver</sub>, liver blood flow rate in human (20.7 mL/min/kg).

IVIVE method using the original (nonadjusted) PLR value of 13.3 provided less accurate CL predictions indicating that the current adjustments made to the PLR and fu<sub>p</sub> values represented a real advantage in this present study (Table 7).

The results also indicate that the conventional IVIVE method based on fu<sub>p</sub> values nonadjusted and the Poulin-based IVIVE method using fu<sub>p-adjusted</sub> values provide more similar statistical analyses, whereas the CL<sub>int</sub> was obtained from the HepatoPac® system compared with the monolayer or suspended hepatocytes. In other words, the prediction accuracy of the conventional IVIVE method based on the nonadjusted fu<sub>p</sub> values increased by using the HepatoPac® data and that level of accuracy becomes more similar to the Poulin-based IVIVE method based on fu<sub>p-adjusted</sub>. This is probably because the adjusted PLR values for the HepatoPac® system (2.7, 2.9, and 5.3) become closer to the unity since that system is significantly producing ALB, and hence, the calculated values of fu<sub>p-adjusted</sub> become closer to the experimentally determined fu<sub>p</sub> values according to the corresponding equation presented in Table 3; however, the current adjustments we have made to fu<sub>p</sub> gave a significant gain of accuracy in this present study.

Finally, 4 drugs showed a relatively high CL value in human *in vivo* (i.e., propafenone, verapamil, phenacetin, and dextromethorphan); therefore, their CL was also calculated with the parallel tube model compared with the well-stirred model, but this did not change the conclusion of this study by any means (Table 8). Similarly, neglecting irbesartan, bosentan, and tolbutamide (due to the potential confounding effect of hepatic transporters) also not changed the conclusion of this study (Table 8).

## Discussion

In this study we challenged the conventional IVIVE method and corresponding free drug hypothesis with the HepatoPac® system. The systematic underestimation of *in vivo* CL by incorporating fu<sub>p</sub> in the conventional IVIVE method was also observed with our in-house data set, but it was reduced with the HepatoPac® system compared to the suspended and plated hepatocytes. Because the HepatoPac® system is probably the most physiologically relevant experimental setting of this study and it showed an ALB production that is closer to the *in vivo* condition in liver, this probably explains why the values of CL were generally less underpredicted compared with monolayer and suspended hepatocyte data. The trends in the underprediction of CL of drugs are common and can also be multifactorial as recently discussed by Wood et al.,<sup>31</sup> but the present study significantly reduced the underprediction bias simply by using the HepatoPac® system. Therefore, the improvement of the conventional IVIVE method based on fu<sub>p</sub> is partly attributable to the stability of the HepatoPac® system, which demonstrates physiologically relevant metabolic activity for phase I, phase II, and transporter activity over several weeks.<sup>15</sup> Hence, using conventional monolayer models should be more challenging because of the low physiological relevance regarding ALB secretion and of the rapid loss of liver-specific functions and Cytochrome P450 activities over time.

Although the CL<sub>int</sub> data generated by the HepatoPac® system are combined with the calculated values of fu<sub>p-adjusted</sub> instead of the experimentally determined *in vitro* fu<sub>p</sub> values, the Poulin-based IVIVE method showed no relevant trends of underprediction or overprediction and was consequently the most accurate IVIVE

**Table 8**  
Additional Comparative Assessment of IVIVE Methods From Data Generated on HepatoPac<sup>®</sup>

Scenarios and IVIVE Methods	% ≤ 1.5-Fold Error	% ≤ 2-Fold Error	% ≤ 3-Fold Error	% ≤ 4-Fold Error	AFE	AAFE	R <sup>2</sup>
All predictions (n = 20 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	85	90	95	100	1.04	1.39	0.90
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	65	90	95	95	1.22	1.43	0.88
Original: Poulin et al. with nonadjusted PLR value	55	65	85	95	1.15	1.73	0.67
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	25	50	80	85	0.47	2.19	0.69
Direct scaling	45	65	70	75	2.13	2.27	0.70
Acids and Neutrals (n = 9 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	89	89	89	100	1.06	1.45	0.72
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	56	89	89	89	1.36	1.55	0.68
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	33	78	89	100	0.57	1.83	0.78
Direct scaling	22	44	44	56	3.88	3.95	0.36
Bases (n = 11 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	82	91	100	100	1.03	1.35	0.81
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	73	91	100	100	1.11	1.34	0.83
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	18	27	73	73	0.39	2.53	0.59
Direct scaling	64	82	91	91	1.31	1.44	0.80
Drug with low CL (≤20% Q <sub>liver</sub> ) <sup>a</sup> (n = 8 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	75	75	88	100	1.17	1.54	0.35
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	50	75	88	88	1.51	1.68	0.49
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	25	75	100	100	0.57	1.86	0.74
Direct scaling	25	25	25	38	4.75	4.85	0.35
Drugs with low fu <sub>p</sub> (<0.1) (n = 13 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	85	85	92	100	1.07	1.47	0.88
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	54	85	92	92	1.34	1.54	0.83
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	15	38	69	77	0.42	2.46	0.61
Direct scaling	31	46	54	62	3.02	3.15	0.60
Drugs with very low fu <sub>p</sub> (<0.05) (n = 7 compounds)							
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using [ALB] at 48 h	71	71	86	100	1.25	1.58	0.87
This study: Poulin et al. with PLR adjusted using the average of [ALB]	43	71	86	86	1.68	1.75	0.83
Conventional method based on fu <sub>p</sub>	29	57	86	86	0.52	2.05	0.52
Direct scaling	14	29	29	43	5.15	5.30	0.42

In this assessment, the parallel-tube liver model was used for all high CL drugs (phenacetin, dextromethorphan, propafenone, and verapamil), whereas the well-stirred model was used for all other drugs as well as bosentan, irbesartan, and tolbutamide that are also substrates for hepatic transporters were not included. Comparison between the predicted and observed values of CL.

Q<sub>liver</sub>, liver blood flow rate in human (20.7 mL/min/kg).

method; it provided even more accurate CL predictions for those drugs highly bound in plasma, as demonstrated by several statistical parameters and sub-data sets of drugs (Tables 5, 7, and 8). This specific IVIVE method used an adjusted value of fu<sub>p</sub> to quantify the real differential of ALB concentration (and hence the differential of additional bound drug assumed available for hepatic uptake) between the *in vitro* and *in vivo* conditions due to potential ALB-facilitated uptake phenomenon, which represented a significant advantage over other IVIVE methods and experimental settings. Therefore, the high level of prediction accuracy that was obtained with this new IVIVE method is probably not just a coincidence. A superior predictability of fu<sub>p-adjusted</sub> compared with fu<sub>p</sub> was also observed in other studies where the extrapolations of CL in the absence of ALB *in vitro* to that in the presence of ALB *in vivo* were generally much more accurate from fu<sub>p-adjusted</sub> compared with fu<sub>p</sub>.<sup>30,34,37</sup>

In this context, we demonstrated that the HepatoPac<sup>®</sup> system can secrete ALB to a similar rate as in the intact liver in human and that the input PLR value should be set equal to a smaller value compared with the original PLR value of 13.3. In this context, by reducing the PLR value closer to the unity, the calculated values of fu<sub>p-adjusted</sub> become closer to the observed values of fu<sub>p</sub>, which explains why the CL predictions between the IVIVE methods based on fu<sub>p-adjusted</sub> and fu<sub>p</sub> become more comparable. However, adjusting the PLR value for the real differential of ALB concentration between the *in vitro* and *in vivo* conditions still improved the CL predictions compared with using fu<sub>p</sub>. This may indicate that the CL<sub>int</sub> determined in the HepatoPac<sup>®</sup> system could cover the ALB-facilitated hepatic phenomenon more closely compared with the

isolated and plated hepatocytes, and hence, the IVIVE method based on fu<sub>p</sub> became more accurate. If this directly links to the ALB-mediated uptake of substrate drugs, addition of ALB in the media simply improves the predictability of metabolic activity with the use of isolated or cultured hepatocytes as demonstrated by Blanchard et al.<sup>36</sup> Therefore, it is suggested to adjust the original PLR value when the ALB content differs between the *in vitro* assay and *in vivo* condition (i.e., the PLR value would range from 1 to about 13.3). And because interindividual variability in the ALB concentration have been shown in the literature, the interindividual variability of the input PLR values used to calculate fu<sub>p-adjusted</sub> would also need to be further investigated to optimize the comparison of the predicted with the observed CL values (although in this study we have considered the variability across 3 donors for the CL<sub>int</sub> *in vitro* but only used the means for the observed CL values).

Our current observations are in contradiction with the free drug hypothesis. First, the values of CL<sub>int</sub> determined in the HepatoPac<sup>®</sup> system increased (or are kept similar) compared with the 2 other *in vitro* assays for the studied drugs (Table 5), which is not expected from the free drug theory that rather suggests a significant decrease of the CL<sub>int</sub> with such a relevant increase of the ALB binding effect in the incubation medium of the HepatoPac<sup>®</sup> *in vitro* assay. Second, this aspect could be tested further with the HepatoPac<sup>®</sup> system to validate whether the CL<sub>int</sub> will increase while the ALB concentration is increased (e.g., by measuring the ALB production and CL<sub>int</sub> at several time points for the same donor and drug). In this context, we observed a concordance between the metabolic rate (i.e., the measured CL<sub>int</sub> in Fig. 3) and the absolute synthesis rate of ALB (Fig. 2) between 2 donors. Our results showed that in the donor

where the ALB production (i.e., the number of ALB molecule per hepatocyte) is the greatest in the HepatoPac<sup>®</sup> system, the corresponding  $CL_{int}$  of each drug is also the greatest compared with the other donor, and this seems to be valid for all classes of drugs, which is again compatible with an ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon. However, it might be that the 2 donors showed a different enzymatic activity due to donor-donor variability and physiological state of the cells during the experiments, which have a link with the biotransformation and the ALB synthesis rates. We also agree that the mouse fibroblast line stabilized the co-cultures in the HepatoPac<sup>®</sup> system, and hence, having material from 2 different species (mouse and human) present in the culture may also explain some of the metabolic differences/variance observed.

How this present comparative assessment differs from, or improves upon, previous comparative assessment also needs to be discussed. Kratochwil et al.<sup>23</sup> also specifically studied the HepatoPac<sup>®</sup> system but by using another data set of drugs. These authors also showed superior prediction accuracy for the Poulin-based IVIVE method based on  $fu_{p-adj}$ ; however, these authors also demonstrated that the direct scaling method was as accurate, whereas the conventional method was again the less accurate IVIVE method. It is important to note that these authors only investigated very few drugs (i.e., 4 drugs), which limited their statistical analysis. More importantly, these authors have not measured and considered the level of ALB produced in their HepatoPac<sup>®</sup> system to adjust the value of PLR used to calculate  $fu_{p-adj}$ , which may both explain the relative discordance with the present study.

It was assumed that ALB should play a major role in the protein-facilitated hepatic uptake of acidic and neutral drugs bound to this protein as compared with the alpha 1-acid-glycoprotein (AAG) for ionized basic drugs. For chlorpromazine and other basic drugs, it is clear that the use of  $fu_{p-adj}$  provided the most accurate predictions of CL which was not expected, whereas for quinidine, the CL predictions based either on  $fu_p$  or  $fu_{p-adj}$  showed an equivalent bias compared with the *in vivo* value (Tables 5 and 7). We have previously demonstrated that several drugs may bind to both proteins (ALB or AAG) in plasma when a binding competition study is performed in a RED device system.<sup>27</sup> Interestingly, the binding ratio of ALB/AAG is superior for chlorpromazine compared with quinidine by about 1.3 fold,<sup>27</sup> which supports the current observations that some basic drugs may bind preferably to ALB compared with other basic drugs. Therefore, it would be important to define the main binding protein in plasma before calculating  $fu_{p-adj}$  and to find the right binding ratio where the ALB-facilitated uptake phenomenon may become relevant.

Related to that, preliminary measurements of the concentration of AAG in supernatants of the HepatoPac<sup>®</sup> system showed much lower concentrations of AAG (below limit of quantification of 0.1  $\mu\text{g/mL}$  based on an ELISA kit) compared with ALB (4.074 to 7.156  $\mu\text{g/mL}$ ). The concentration ratio AAG/ALB between the plasma and interstitial fluid (lymph) of a tissue is relatively higher under *in vivo* conditions at 0.025 (i.e., ~1 mg/mL/~40 mg/mL).<sup>50</sup> Thus, the ALB is by far the most abundant protein in both the *in vitro* and *in vivo* conditions. It is, therefore, probable that the  $CL_{int}$  of several basic drugs was altered by the ALB binding due to nonspecific hydrophobic interactions. Another explanation could be that the AAG is a protein with a lower capacity of binding compared with ALB; thus, at the drug concentrations studied *in vivo*, the binding to AAG might have been saturated. In addition, fatty acids and lipoproteins could also be of importance for the binding properties with the drugs and the ALB,<sup>51</sup> and hence, the fractional binding effect also needs more investigation in that context.

Since it is hypothesized that both the ionic and hydrophobic effects could explain the interactions between the drugs and the ALB as well as the interactions between the ALB-drug complex and

the hepatocyte membrane, a logical next step should also challenge drugs with more than 1 pKa as more extreme case scenarios for the ionization effect. The values of the unbound fraction in the incubation medium of the monolayer cultures (i.e.,  $fu_{hep,monolayer}$  and  $fu_{hep,suspension}$ ) were predicted from data on drug lipophilicity and ionization based on a previous study<sup>49</sup> or were simply assumed equal to the unity for the MPCCs ( $fu_{hep,hepatopac}$ ). Because these parameters sometimes affect the predictability of metabolic activity, we agree that this may have affected the current comparative assessment. However, considering the cell density tested in this study, these unbound fractions are predicted to be close to the unity; furthermore, the same unbound fraction was used for each IVIVE method.

A logical next step would be to perform specific mechanistic studies to elucidate by which mechanism the ALB binding seems to affect the CL *in vivo*. The ALB does interact with the hepatocyte membrane through an ALB receptor. This receptor holds several glycosylated ALB molecules prior to it becoming incorporated into the cell as a vehicle for recycling. Whether "old" ALB binds drugs to the same extent as "new" ALB is not clearly known. And whether the affinity of the ALB-drug complex compared with the unbound drug moiety is of importance for a specific ALB transporter or some other site on the cell membrane, mathematically might be indistinguishable, but physiologically may become important. This may be one area that facilitation may work. Accordingly, Fukuchi et al.<sup>35</sup> recently demonstrated the nonlinear pharmacokinetics of a highly ALB-bound compound associated with the saturation of ALB receptors if any, to demonstrate the ability of proposed facilitated mechanism in describing nonlinear pharmacokinetics observed in human. In the current investigation, the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon has been introduced by assuming a linear CL for each drug at the lowest drug concentration tested. However, a nonlinear CL effect could potentially be reproduced by using the values of  $V_{max}$  and  $K_m$  determined with the HepatoPac<sup>®</sup> system instead of using the single  $CL_{int}$  values.

Another thought is that the electrical attraction between ALB-drug complex and hepatocyte membrane forms an unfavorable binding pocket for drugs and enhances their release. This concept would work for both new and old ALB. This is what Burczynski et al.<sup>51</sup> have demonstrated for many years; the values of  $CL_{int}$  measured in incubations of hepatocytes varied between the incubations containing positively and negatively charged ALB, and hence, these observations support the effect of ALB surface charge modification versus the hepatocyte membrane. This study has been limited to few compounds but could interestingly be repeated with other drugs. It has also been suggested that because drugs are bound to different binding sites on the ALB, this could modify the electrostatic environment of the ALB-drug complex for each drug divergently and hence could modify the corresponding ionic interactions of the complex with the hepatocyte membrane. In this case, the values of  $V_{max}$  and  $K_m$  of Bisphenol A and Naproxen, 2 drugs bound to the ALB, varied with the escalation of the ALB concentration of the perfusate used in an isolated richly perfused liver model; moreover, the trend of variation of  $V_{max}$  and  $K_m$  was different between these 2 drugs.<sup>34</sup> And the resulting  $CL_{int}$  of the unbound drug moiety also increased with the escalation of the ALB concentration, which is again fully compatible with an ALB-facilitated uptake phenomenon. Other observations in accordance with an ALB-facilitated phenomenon were compiled by Poulin et al.<sup>33</sup>

By changing the dissociation constant ( $K_d$ ) of the ALB-drug complex, the shift to unbound drug and hence enhanced uptake is predictable. Accordingly, Miyauchi et al.<sup>40</sup> recently challenged an old facilitated-dissociation model into which additional binding parameters on the capacity of the ALB-drug complex to interact and

dissociate with the hepatocyte membrane have been included. These authors have developed this model to investigate the ALB-mediated hepatic uptake phenomenon of 2 organic anion transport polypeptide substrates. This necessitated determining additional binding data on the dissociation and interaction effects of each drug by using a curve-fitting exercise to fit the model to experimental data on the unbound  $CL_{int}$  varying with the ALB concentration in the incubation medium. Nonetheless, Miyauchi et al.<sup>40</sup> have improved the extrapolation of the hepatic uptake  $CL$  *in vivo* in the presence of ALB from the uptake  $CL$  determined *in vitro* in the isolated hepatocytes in the absence of ALB. Therefore, this facilitated-dissociation model can be used to describe the ALB-facilitated-hepatic uptake phenomenon. Given the assumption of the ALB-facilitated-hepatic uptake phenomenon, Poulin and Haddad<sup>52</sup> recently compared their model of  $f_{up-adjusted}$  with the facilitated-dissociation model of Miyauchi et al.<sup>40</sup> for the same 2 organic anion data sets. These authors have demonstrated that these 2 models are conceptually and mathematically equivalent for extrapolating the  $CL$  in the absence of ALB *in vitro* to that in the presence of ALB *in vivo* for the organic anion that showed the most relevant potential of interaction and dissociation with the hepatocytes membrane in the presence of ALB.<sup>52</sup> Conversely, the model of  $f_{up-adjusted}$  relatively overestimated the impact of the ALB-facilitated hepatic uptake for the organic anion that showed the lowest capacity of interaction with the hepatocyte membrane in the presence of ALB. This is because the model of  $f_{up-adjusted}$  presumes that each ALB-drug complex interacts significantly with the hepatocyte membrane by contrast to the facilitated-dissociation model of Miyauchi et al.<sup>40</sup> that is based on additional but more specific binding data on the capacity of interaction and dissociation.<sup>52</sup> Therefore, the model of  $f_{up-adjusted}$  may be used as a simple way to provide a rapid prediction of the maximal impact of ALB binding in the IVIVEs, whereas a specific facilitated dissociation model can be developed at the later stages of drug development after collecting the additional binding data on the capacity of dissociation and interaction. Nonetheless, these 2 models are complementary, and all contribute toward achieving the same objective of quantifying the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon in the IVIVEs. The comparative assessment of these 2 models also demonstrated that a drug binding to the ALB may show an ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon less relevant than anticipated; this might potentially be due to the induction of particular conformational (tridimensional) changes of the ALB-drug complex following the ALB binding process that has lowered the capacity of its interaction with the hepatocyte membrane compared to other drugs. Therefore, the degree of ALB-facilitated uptake phenomenon may differ between drugs and might explain why few drugs are relatively more accurately predicted from  $f_{up}$  compared to  $f_{up-adjusted}$ .

Krause et al.<sup>53</sup> studied the desorption kinetics of organic chemicals from ALB to explain their residence time in the blood and liver. However, the artificial membranes used in their study are not charged and do not contain ALB receptors by contrast to the hepatocyte, and hence, a facilitation process with these membranes may not exist, or at best, difficult to show unless you compare the theoretical rates to the observed uptake rates, which has not been made by these authors. Furthermore, the observed binding constants indicate that the studied ligands (chemicals) are not tightly bound to ALB. Nevertheless, the desorption kinetics from ALB may also represent an interesting approach to explain the ALB binding effect in  $CL$  predictions.

The proposed adjustment of the value of  $f_{up}$  in the Poulin-based IVIVE method highlights the possibility and necessity to adapt any extrapolation methods to the capacity of the *in vitro* models in relation to its ALB production. Such approaches should improve the exploitation of plasma protein binding data in drug development. Furthermore, we should be able to exploit the enzymatic reactions

and ALB binding under experimental conditions that are closer to the *in vivo* conditions with the HepatoPac<sup>®</sup> system by contrast to conventional monolayer models.<sup>15,54–56</sup> This would facilitate the derivation of improved scaling factors to bridge the gap between the *in vitro* and *in vivo* conditions. However, note that under normal *in vivo* conditions in the liver, the concentration of ALB should be at steady state, which is probably not the case in the *in vitro* HepatoPac<sup>®</sup> system. This difference has been addressed by selecting ALB concentration data measured at the 48 h time point to adjust the PLR value, which is the intermediate time point used in this study that should reflect a fair estimate of successive additions of the potential ALB-facilitated uptake phenomenon in that system. However, ALB concentration data were also pondered (i.e., averaged) over the time points but up to the nearest time point where is the apparent complete depletion of each compound. The approach using the ALB concentration determined at 48 h provided relatively superior prediction accuracy, but there is no rational explanation at that moment; however, it might be that the facilitated uptake phenomenon, if present, required some time to show its apparent cumulative effect at the surface of the hepatocytes (e.g., ~48 h) (and also for several drugs the depletion was almost complete at a time point close to 48 h), and hence, the number of ALB molecules per hepatocyte measured at 48 h could represent a fair estimate of the number of ALB-drug complex molecules that may have apparently penetrated into the hepatocytes following the ALB-facilitated uptake. Therefore, it will be important to investigate the influence of the ALB concentration because the subsequent model performance of the PLR-adjusted approach is entirely based on the selection of the ALB concentration data.

Two molecules were found to be unstable in control stromal cells in the HepatoPac<sup>®</sup> system (i.e., terfenadine and tolcapone). *In vitro* instability of the 2 compounds in stromal cells and its translation to *in vivo* remains uncharacterized. The contamination of stromal cells to overall  $CL$  when using the HepatoPac<sup>®</sup> system could potentially be an explanation, but we cannot say more on this. As stromal cells in the HepatoPac<sup>®</sup> model are from murine origin, it seemed relevant to the authors to exclude these 2 drugs from the data set, not having the knowledge of metabolism by stromal cells of human origin which, we admit, could also contribute to the metabolism *in vivo* of these compounds in humans. If so, when estimating the  $CL$  of these drugs, we must pay attention to the metabolism by nonparenchymal cells.

Finally, other *in vitro* models of the liver that could be more physiologically relevant have also been suggested to help understand the clearance mechanism(s) or improve the IVIVE,<sup>57–59</sup> and, thus, may also help improve the  $CL$  prediction. However, the complexity of these sophisticated *in vitro* models raises new challenges that still need to be overcome. Although significant progress has been made over the past years to develop user-friendly solutions, the use of advanced *in vitro* models including the HepatoPac<sup>®</sup> system is often limited to a small number of compounds and late stage preclinical studies. In this study, however, we have demonstrated that the HepatoPac<sup>®</sup> model is an interesting alternative to monolayers models.

## Conclusion

In conclusion, the present study and the recent literatures are fully compatible with the notion of an ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon. Therefore, this study showed the importance of including in any experimental setting the quantification of ALB (*in vitro* vs. *in vivo*) to improve the IVIVE-based predictions. We agree that more specific mechanistic works are needed to elucidate whether the suspected facilitated hepatic uptake phenomenon is really present or not in the liver *in vivo*; however, at present, there is

no doubt that the replacement of  $f_{up}$  with  $f_{up}$ -adjusted in the conventional IVIVE method generally represented a significant advantages for CL predictions based both on this present study and other published studies.<sup>23,26–30,33,34,37</sup> Consequently, it is suggested to include  $f_{up}$ -adjusted to any future IVIVE exercises to improve the prediction accuracy before additional information is obtained. Furthermore, note that Miyauchi et al.<sup>40</sup> have developed a new IVIVE method also based on an ALB-facilitated uptake model, which has been successfully validated with 2 drugs; their IVIVE method was mathematically and conceptually equivalent to the current model of  $f_{up}$ -adjusted in the case of a drug showing a relevant facilitated uptake phenomenon.<sup>52</sup> Therefore, these observations should not be ignored by the other scientists, and hence, these 2 models of the ALB-facilitated hepatic uptake phenomenon should essentially be challenged in future IVIVE exercises. Overall, the marked improvement of CL prediction by using the HepatoPac<sup>®</sup> system combined to the IVIVE method of Poulin et al. using  $f_{up}$ -adjusted was based on real physiological observations, not on empirical observations.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Olivier Fedeli, William Brian, Nassim Djebli, and Catherine Bougette for reviewing the manuscript and for their helpful suggestions. Dr. Patrick Poulin would like to thank Sanofi R&D for their financial support.

## References

- Obach RS. Predicting clearance in humans from in vitro data. *Curr Top Med Chem*. 2011;11:334–339.
- Smith CM, Nolan CK, Edwards MA, et al. A comprehensive evaluation of metabolic activity and intrinsic clearance in suspensions and monolayer cultures of cryopreserved primary human hepatocytes. *J Pharm Sci*. 2012;101:3989–4002.
- Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab*. 2004;5:443–462.
- Vinci B, Duret C, Klieber S, et al. Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes. *Biotechnol J*. 2011;6:554–564.
- Dash A, Inman W, Hoffmaster K, et al. Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009;5:1159–1174.
- Di L, Atkinson K, Orozco CC, et al. In vitro-in vivo correlation for low-clearance compounds using hepatocyte relay method. *Drug Metab Dispos*. 2013;41:2018–2023.
- Di L, Trapa P, Obach RS, et al. A novel relay method for determining low-clearance values. *Drug Metab Dispos*. 2012;40:1860–1865.
- LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol*. 2012;42:501–548.
- Peng CC, Doshi U, Prakash C, Li AP. A novel plated hepatocyte relay assay (PHRA) for in vitro evaluation of hepatic metabolic clearance of slowly metabolized compounds. *Drug Metab Lett*. 2016;10:3–15.
- Rashidi H, Alhaque S, Szkolnicka D, Flint O, Hay DC. Fluid shear stress modulation of hepatocyte-like cell function. *Arch Toxicol*. 2016;90:1757–1761.
- Kostrzewski T, Cornforth T, Snow SA, et al. Three-dimensional perfused human in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23:204–215.
- Tsamandouras N, Kostrzewski T, Stokes CL, Griffith LG, Hughes DJ, Cirit M. Quantitative assessment of population variability in hepatic drug metabolism using a perfused three-dimensional human liver microphysiological system. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;360:95–105.
- Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*. 2013;87:1315–1530.
- Vivares A, Salle-Lefort S, Arabeyre-Fabre C, et al. Morphological behaviour and metabolic capacity of cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in a perfused multiwell device. *Xenobiotica*. 2015;45:29–44.
- Khetani SR, Bhatia SN. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat Biotechnol*. 2008;26:120–126.
- Lin C, Khetani SR. Micropatterned co-cultures of human hepatocytes and stromal cells for the assessment of drug clearance and drug-drug interactions. *Curr Protoc Toxicol*. 2017;72:14.
- Khetani SR, Kanchagar C, Ukairo O, et al. Use of micropatterned cocultures to detect compounds that cause drug-induced liver injury in humans. *Toxicol Sci*. 2013;132:107–117.
- Wang WW, Khetani SR, Krzyzewski S, Daignan DB, Obach RS. Assessment of a micropatterned hepatocyte coculture system to generate major human excretory and circulating drug metabolites. *Drug Metab Dispos*. 2010;38:1900–1905.
- Lin C, Shi J, Moore A, Khetani SR. Prediction of drug clearance and drug-drug interactions in microscale cultures of human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2016;44:127–136.
- March S, Ng S, Velmurugan S, et al. A microscale human liver platform that supports the hepatic stages of Plasmodium falciparum and vivax. *Cell Host Microbe*. 2013;14:104–115.
- Shlomai A, Schwartz RE, Ramanan V, et al. Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:12193–12198.
- Ploss A, Khetani SR, Jones CT, et al. Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:3141–3145.
- Kratochwil NA, Meille C, Fowler S, et al. Metabolic profiling of human long-term liver models and hepatic clearance predictions from in vitro data using nonlinear mixed-effects modeling. *AAPS J*. 2017;19:534–550.
- Chan TS, Yu H, Moore A, Khetani SR, Tweedie D. Meeting the challenge of predicting hepatic clearance of compounds slowly metabolized by cytochrome P450 using a novel hepatocyte model, HepatoPac. *Drug Metab Dispos*. 2013;41:2024–2032.
- Halifax D, Turlizzi E, Zanelli U, Houston JB. Clearance-dependent under-prediction of in vivo intrinsic clearance from human hepatocytes: comparison with permeabilities from artificial membrane (PAMPA) assay, in silico and caco-2 assay, for 65 drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45:570–574.
- Poulin P, Hop CE, Ho Q, Halladay JS, Haddad S, Kenny JR. Comparative assessment of in vitro-in vivo extrapolation methods used for predicting hepatic metabolic clearance of drugs. *J Pharm Sci*. 2012;101:4308–4326.
- Poulin P, Kenny JR, Hop CE, Haddad S. In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. *J Pharm Sci*. 2012;101:838–851.
- Poulin P, Haddad S. Toward a new paradigm for the efficient in vitro-in vivo extrapolation of metabolic clearance in humans from hepatocyte data. *J Pharm Sci*. 2013;102:3239–3251.
- Poulin P. Prediction of total hepatic clearance by combining metabolism, transport, and permeability data in the in vitro-in vivo extrapolation methods: emphasis on an apparent fraction unbound in liver for drugs. *J Pharm Sci*. 2013;102:2085–2095.
- Bounakta S, Bteich M, Mantha M, Poulin P, Haddad S. Predictions of bisphenol A hepatic clearance in the isolated perfused rat liver (IPRL): impact of albumin binding and of co-administration with naproxen. *Xenobiotica*. 2017;3:1–13.
- Wood FL, Houston JB, Halifax D. Clearance prediction methodology needs fundamental improvement: trends common to rat and human hepatocytes/microsomes and implications for experimental methodology. *Drug Metab Dispos*. 2017;45:1178–1188.
- Berezhkovskiy LM. The corrected traditional equations for calculation of hepatic clearance that account for the difference in drug ionization in extracellular and intracellular tissue water and the corresponding corrected PBPK equation. *J Pharm Sci*. 2011;100, 1167–1183.
- Poulin P, Burczynski FJ, Haddad S. The role of extracellular binding proteins in the cellular uptake of drugs: impact on quantitative in vitro-to-in vivo extrapolations of toxicity and efficacy in physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic research. *J Pharm Sci*. 2016;105:497–508.
- Poulin P, Bteich M, Haddad S. Supplemental analysis of the prediction of hepatic clearance of binary mixtures of bisphenol A and naproxen determined in an isolated perfused rat liver model to promote the understanding of potential albumin-facilitated hepatic uptake mechanism. *J Pharm Sci*. 2017;106:3207–3214.
- Fukuchi Y, Toshimoto K, Mori T, et al. Analysis of nonlinear pharmacokinetics of a highly albumin-bound compound: contribution of albumin-mediated hepatic uptake mechanism. *J Pharm Sci*. 2017;106:2704–2714.
- Blanchard N, Hewitt NJ, Silber P, Jones H, Coassolo P, Lavé T. Prediction of hepatic clearance using cryopreserved human hepatocytes: a comparison of serum and serum free incubations. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58:633–641.
- Poulin P, Haddad S. Albumin and uptake of drugs in cells: additional validation exercises of a recently published equation that quantifies the albumin-facilitated uptake mechanism(s) in physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling research. *J Pharm Sci*. 2015;104:4448–4458.
- Sohlenius-Sternbeck AK, Jones C, Ferguson D, et al. Practical use of the regression offset approach for the prediction of in vivo intrinsic clearance from hepatocytes. *Xenobiotica*. 2012;42:841–853.
- Yamagata T, Zanelli U, Gallemann D, Perrin D, Dolgos H, Petersson C. Comparison of methods for the prediction of human clearance from hepatocyte intrinsic clearance for a set of reference compounds and an external evaluation set. *Xenobiotica*. 2017;47:741–751.
- Miyauchi S, Masuda M, Kim SJ, et al. The phenomenon of “albumin-mediated” hepatic uptake of organic anion transport polypeptide substrates: prediction of the in vivo uptake clearance from the in vitro uptake by isolated

- hepatocytes using a "facilitated-dissociation" model. *Drug Metab Dispos.* 2018;46:259-267.
41. Obach RS, Lombardo F, Waters NJ. Trend analysis of a database of intravenous pharmacokinetic parameters in humans for 670 drug compounds. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:1385-1405.
  42. Brown HS, Griffin M, Houston JB. Evaluation of cryopreserved human hepatocytes as an alternative in vitro system to microsomes for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:293-301.
  43. El-Kattan AF, Varma MV, Steyn SJ, Scott DO, Maurer TS, Bergman A. Projecting ADME behavior and drug-drug interactions in early discovery and development: application of the Extended Clearance Classification System. *Pharm Res.* 2016;33:3021-3030.
  44. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: an add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010;99:306-314.
  45. Kokudo T, Hasegawa K, Uldry E, et al. A new formula for calculating standard liver volume for living donor liver transplantation without using body weight. *J Hepatol.* 2015;63(4):848-854.
  46. Levitt DG, Levitt MD. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med.* 2016;9:229-255.
  47. Ring BJ, Chien JY, Adkison KK, et al. PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 3: comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci.* 2011;100:4090-4110.
  48. Austin RP, Barton P, Mohamed S, Riley RJ. The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties. *Drug Metab Dispos.* 2005;33:419-425.
  49. Poulin P, Theil FP. Development of a novel method for predicting human volume of distribution at steady-state of basic drugs and comparative assessment with existing methods. *J Pharm Sci.* 2009;98:4941-4961.
  50. Olszewski WL. Physiology, biology, and lymph biochemistry. In: Lee BB, Bergan J, Rockson SG, eds. *Lymphedema: A Concise Compendium of Theory and Practice.* Berlin, Germany: Springer International Publishing AG; 2011:65-68.
  51. Burczynski FJ, Wang GQ, Elmhaddoun B, She YM, Roberts MS, Standing KG. Hepatocyte palmitate uptake: effect of albumin surface charge modification. *Can J Physiol Pharmacol.* 2001;79:868-875.
  52. Poulin P, Haddad S. Extrapolation of the hepatic clearance of drug in the absence of albumin *in vitro* to that in the presence of albumin *in vivo*: comparative assessment of 2 extrapolation models based on the albumin-facilitated hepatic uptake theory and limitations and mechanistic insights. *J Pharm Sci.* 2018;107:1791-1797.
  53. Krause S, Ulrich N, Goss KW. Desorption kinetics of organic chemical from albumin. *Arch Toxicol.* 2018;92:1065-1074.
  54. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, et al. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab.* 2006;7:629-660.
  55. Khetani SR, Berger DR, Ballinger KR, Davidson MD, Lin C, Ware BR. Micro-engineered liver tissues for drug testing. *J Lab Autom.* 2015;20:216-250.
  56. Ramsden D, Zhou J, Tweedie DJ. Determination of a degradation constant for CYP3A4 by direct suppression of mRNA in a novel human hepatocyte model, HepatoPac. *Drug Metab Dispos.* 2015;43:1307-1315.
  57. Varma MV, Steyn SJ, Allerton C, El-Kattan AF. Predicting clearance mechanism in drug discovery: Extended Clearance Classification System (ECCS). *Pharm Res.* 2015;32:3785-3802.
  58. Camenisch GP. Drug disposition classification systems in discovery and development: a comparative review of the BDDCS, ECCS and ECCCS concepts. *Pharm Res.* 2016;33:2583-2593.
  59. Jaroch K, Jaroch A, Bojko B. Cell cultures in drug discovery and development: the need of reliable *in vitro*-*in vivo* extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;147:297-312.

## 2. Commentaire sur la publication :

Dans cette publication, nous avons vu que le modèle de coculture (MPCC) Hepatopac™ a été capable de générer des prédictions satisfaisantes avec la méthode conventionnelle. Les hépatocytes en suspension et en monocouche ont pu être testés avec le même donneur que les MPCC et le constat a été le même que l'étude précédente : la méthode conventionnelle n'est pas adaptée à ces modèles. L'utilisation de la fraction libre plasmatique (fup) dégrade donc les prédictions de ces deux modèles mais les améliore avec Hepatopac™.

Pour explorer les causes de cette différence, nous avons investigué le rôle de l'albumine qui est la protéine centrale lorsque l'on se réfère au fup. Nous avons observé que la synthèse d'albumine était bien plus importante lorsque les hépatocytes étaient cultivés en co-culture. De plus, la vitesse de synthèse de l'albumine sur les MPCC semble se rapprocher de la capacité des hépatocytes *in vivo*. En analysant les CLint générées par 3 donneurs sur Hepatopac™, nous avons observé que le métabolisme était d'autant plus important que la synthèse d'albumine était élevée. Nous avons discuté du lien possible entre ce constat et l'état général des donneurs en culture (enzymes plus actives, anabolisme plus important etc...) mais aussi du lien possible avec l'hypothèse avancée par la méthode Poulin. En se référant à l'écart entre la capacité *in vitro* versus *in vivo* des hépatocytes à synthétiser de l'albumine, nous avons essayé de déterminer le PLR pour chacun des lots d'hépatocytes. En effet, plus les cellules synthétisent de l'albumine dans le système *in vitro*, plus le PLR (« plasma to liver ratio of albumin ») utilisé dans l'équation native de Poulin et al. doit être corrigé. Nous avons donc adapté la méthode d'extrapolation aux capacités du modèle *in vitro* en assumant le rôle important de l'albumine dans le processus de prédiction. Cette approche performe mieux que la méthode conventionnelle et a permis d'améliorer significativement les prédictions (AFE : 1.03 ; AAFE de 1.5). Nos résultats sont en faveur de l'hypothèse portant sur l'« Albumin-Facilitated Uptake », mais des expérimentations complémentaires sont encore nécessaires pour pouvoir l'investiguer plus profondément. Nous espérons que de futures études viendront challenger cette approche qui apparaît comme pertinente et originale (Bowman and Benet, 2018).

Le modèle de coculture Hepatopac™ qui permet de conduire des incubations sur plusieurs jours a démontré son intérêt pour l'étude de la clairance. La prise en main, les performances

et la précision des prédictions se révèlent satisfaisantes. Ce modèle qui se manipule aussi simplement que les hépatocytes en monocouche est cependant bien plus onéreux. Peu de lots d'hépatocytes peuvent être testés car le business model actuel du fabricant n'offre que peu de flexibilité. Les plaques sont vendues ensemencées et prêtes à l'emploi et présentent un coût important : 3200€ par plaque et 3000€ de transport. Ce modèle gagnerait à devenir plus accessible afin d'être enrichi de nouvelles applications. Dans les chapitres suivants, nous allons développer une démarche innovante pour tenter de relever ce défi.

## D. Développement d'une technique simple et flexible de Nanospotting destinée à la production de co-cultures micro-organisées

### 1. Introduction

Le modèle Hepatopac™ challengé dans l'étude précédente est issu des travaux dirigés par Sangeeta Bhatia (MIT) et Salman Khetani (UIC) dans le domaine de la bioingénierie. Ces groupes ont exploité des techniques de micro-fabrication et ont travaillé sur une architecture capable d'optimiser la co-culture d'hépatocytes primaires avec d'autres types cellulaires (Khetani and Bhatia, 2008). Ce type de modèle est surnommé « MicroPatterned Co-Cultures » abrégé MPCC et que nous pouvons traduire comme de la co-culture micro-organisée. Les hépatocytes cultivés en MPCC sont polarisés et expriment toutes les enzymes importantes pour les études de métabolisme ainsi que des transporteurs hépatiques fonctionnels. Leur culture est supportée par la lignée 3T3-J2 de fibroblastes embryonnaires de souris qui participent à stimuler la fonction hépatique comme par exemple la sécrétion de protéines spécifiques. Il est important de noter que les MPCC sont capables de maintenir un phénotype fonctionnel pendant 4 à 6 semaines et dans un format de culture qui est compatible avec des études à moyen débit et avec l'utilisation de robot. Ce modèle s'est révélé plus prédictif que les modèles hépatiques *in vitro* de routine pour générer et identifier des métabolites (Wang *et al.*, 2010), estimer la clairance hépatique (Lin *et al.*, 2016; Da-Silva *et al.*, 2018), étudier la toxicité hépatique (Khetani *et al.*, 2013) et s'est révélé utile dans l'étude de maladies infectieuses dont l'infection par les virus des hépatites B et C, et la Malaria (Ploss *et al.*, 2010; Shlomai *et al.*, 2014; March *et al.*, 2015). Des études récentes ont également montré l'emploi des MPCC pour l'étude du diabète de type 2 et de la stéatose hépatique (Davidson *et al.*, 2016, 2017).

#### a) Historique du modèle MPCC

Les origines de ce modèle remontent à 1997 lorsque Bhatia et ses collaborateurs ont utilisé une technique de photolithographie inspirée de la fabrication de semi-conducteurs pour moduler les interactions homotypiques entre des hépatocytes primaires de rat adhérents à des îlots circulaires recouverts de collagène de type I (Bhatia *et al.*, 1997). En faisant varier le diamètre et la distance entre chaque îlot ils ont observé que les fonctions hépatiques étaient

modifiées par l'architecture des îlots. Dans cette même étude, les interactions hétérotypiques entre les hépatocytes et les fibroblastes 3T3-J2 ont également été explorées. Une augmentation ou une diminution de la longévité des hépatocytes pouvait alors être observées lorsque l'architecture et le ratio hépatocytes sur fibroblastes étaient modulés. Ces résultats ont ainsi pu confirmer les observations faites lors des travaux précurseurs de Guguen-Guillouzo et al. (1983) sur la co-culture d'hépatocytes. De plus, le transfert d'un milieu de culture conditionné par des fibroblastes dans des puits d'hépatocytes purs ne permet pas de maintenir les fonctions hépatiques aussi longtemps que la co-culture (Guguen-Guillouzo *et al.*, 1983). Les contacts cellulaires directs entre hépatocytes et fibroblastes entraînent la formation de jonctions hétérotypiques de cadhérine et ont donc une importance cruciale dans ce modèle (Khetani *et al.*, 2004, 2008). Les équipes de Khetani ont ensuite testé d'autres clones 3T3 (à savoir Swiss-3T3, NIH-3T3, L1-3T3) mais ils ont confirmé que les cellules 3T3-J2 présentaient une supériorité dans le maintien des fonctions hépatiques et cela chez plusieurs espèces. En 2008, Khetani et Bhatia ont continué d'optimiser le modèle MPCC et l'ont adapté aux hépatocytes primaires humains (fraîchement isolés et cryoconservés). Cette étude révéla que les interactions homotypiques et hétérotypiques avec les fibroblastes 3T3-J2 sont différentes entre les hépatocytes humains et les hépatocytes de rat. La taille et la distance des îlots ont donc été optimisées pour chaque espèce dans le but de maximiser les effets bénéfiques de la co-culture. Pour faciliter la création de MPCC sur des plaques classiques de culture cellulaire et permettre une production à plus grande échelle, les inventeurs ont développé des techniques de lithographie douce utilisant du PDMS. Aujourd'hui, le modèle humain optimisé consiste en des îlots circulaires de 500µm de diamètre (≈200 à 250 cellules/îlot), espacés de 1200µm (centre-à-centre) et entourés de fibroblastes 3T3-J2 (Figure 30). L'architecture circulaire du modèle MPCC permet de conserver la fidélité des motifs cellulaires pendant plusieurs semaines (= peu ou pas de migrations des hépatocytes). Ce modèle est actuellement proposé en 2 formats : 24- et 96-puits.

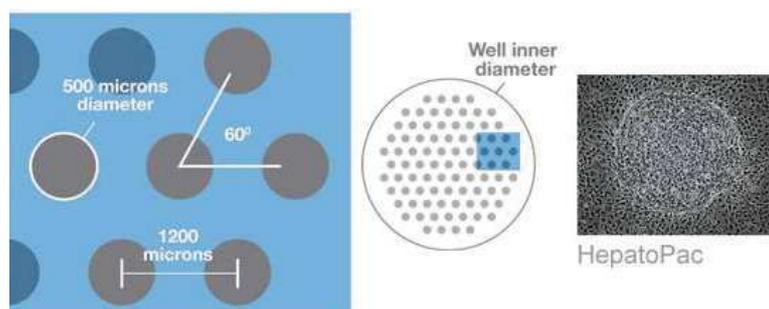


Figure 30 : Schéma de la structure des îlots d'hépatocytes sur HepatoPac.  
Copyright Hepregen Source : Hepregen Corporation 2015

Lors de la confection des moules de PDMS, les inventeurs font appel à la photolithographie dans le but d'atteindre une résolution suffisante. Ces moules sont en effet utilisés comme des masques et une grande minutie est nécessaire pour couvrir des zones très précises au fond des puits. Ils doivent respecter les spécifications structurales des inventeurs (diamètre des îlots, architecture...) tout en étant suffisamment résistants pour pouvoir être réutilisés. En pratique, le masque est placé au fond d'une plaque de culture puis un traitement au plasma d'oxygène est réalisé pour irradier et détruire le collagène non protégé par le moule. Après cette étape, les plaques qui contiennent désormais des îlots de collagène (Figure 31) peuvent êtreensemencées : D'abord par des hépatocytes qui vont adhérer spécifiquement sur le collagène puis ensuite par des cellules 3T3-J2 aptes à être cultivées sur des surfaces non coatées.

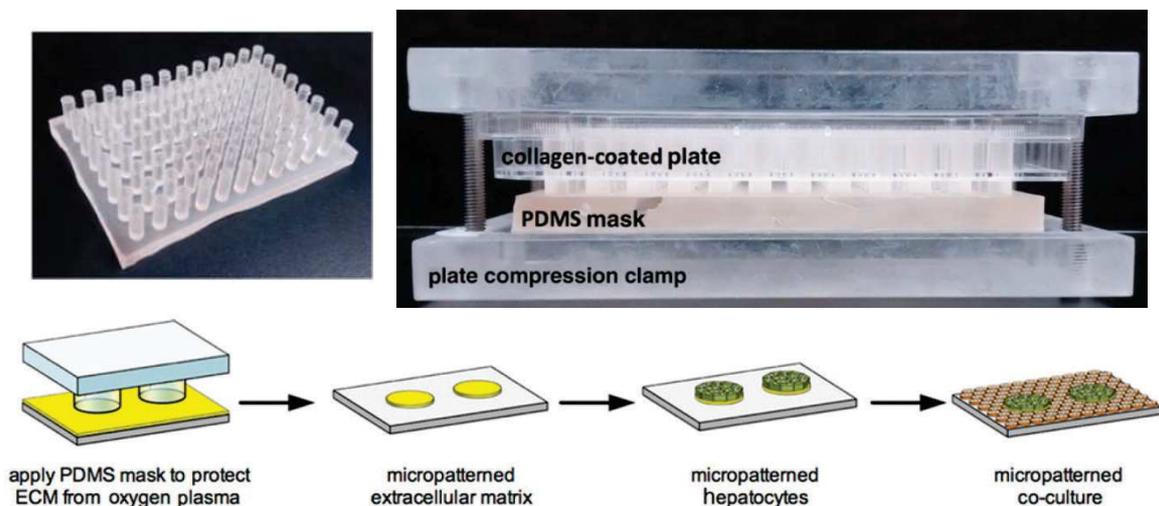


Figure 31 : Processus global de création de co-cultures micro-organisées (MPCC) par photolithographie.  
Lin & Khetani (2017)

#### b) Contexte du projet

Les inventeurs du modèle Hepatopac™ ont développé une grande expertise dans le domaine de la micro-fabrication. Avec une résolution de l'ordre du micromètre, la lithographie leur permet de satisfaire leur imagination et fabriquer toute sorte de motifs. En plus d'une grande maîtrise théorique et technique, cette technologie nécessite du matériel très spécialisé et onéreux qui est généralement réservé aux instituts d'électronique. De plus, dans un contexte d'amélioration du modèle, la préparation de MPCC via l'approche de lithographie n'offre pas une grande réactivité : un masque PDMS est spécifique d'un seul motif et d'un seul type de

plaque, ainsi, pour tester d'autres supports et de nouvelles architectures il faut repartir du début et relancer une fabrication de moule. Dans l'étude précédente, nous avons vu que le coût élevé du modèle Hepatopac™ n'était pas conciliable avec une utilisation de routine et pour du criblage de stabilité métabolique sur hépatocytes. Par conséquent, l'emploi de ce modèle reste occasionnel et se limite généralement aux molécules candidates au développement.

Le modèle économique du fabricant Hepatopac™ repose sur la vente de plaques prêtes à l'emploi et déjàensemencées. Une partie du prix peut ainsi être justifiée par la consommation d'hépatocytes cryopréservés mais également par le temps consacré par le personnel technique pour ensemercer, entretenir les plaques et réaliser les contrôles qualité nécessaires. En revanche, nous pouvons sans doute imaginer que beaucoup d'entreprises préféreraient ensemercer les plaques elles-mêmes, en interne et avec les lots d'hépatocytes de leur choix. Pour ce faire, il faudrait pouvoir se procurer des plaques pré-coatées avec les îlots de collagène mais le débit offert par la photolithographie ne semble pas compatible avec une production à grande échelle. De plus, face aux performances et aux nouvelles applications susceptibles d'être développées autour de ce modèle hépatique, il serait judicieux de le rendre facilement accessible aux acteurs de l'innovation.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'entreprendre une démarche d'innovation liée à la production de co-cultures micro-organisées. L'objectif était de développer une technique simple à mettre en œuvre et à utiliser au quotidien, abordable et suffisamment flexible pour produire rapidement de nouveaux prototypes de MPCC. Pour pouvoir améliorer le modèle original, nous espérons que cette approche développée en interne facilitera la création de toutes sortes d'architectures et de motifs de collagène et ce, sur une multitude de supports (plaques de culture cellulaire, lames, boîtes de Petri, systèmes fluidiques...).

Les travaux précédemment décrits dans ce manuscrit nécessitaient des expérimentations et des analyses très lourdes qui ont, en conséquence, consommé beaucoup de temps. Le délai pour développer notre approche représentait donc un challenge nous obligeant à réaliser les prochaines études sur un laps de temps relativement court (8 mois).

c) Démarches d'innovation

Notre première idée se voulait simple et basique tout en restant astucieuse. Contrairement à la technique « indirecte » de photolithographie qui permet « d'effacer » des zones de collagène, l'idée consistait à disposer directement les cellules à l'endroit où nous le souhaitions. Pour ce faire, nous avons imaginé des pastilles perforées que nous utiliserions tel un pochoir pour disposer les cellules selon un motif prédéfini. A l'aide des services techniques de Sanofi, nous avons créé des prototypes à base de tôles perforées utilisées quotidiennement par l'industrie du bâtiment. Bien que la transposition à la biologie puisse paraître étonnante, ces matériaux sont conçus avec une grande précision (ex : trous ronds de 500µm espacés de 1100µm) et une finition excellente. Les possibilités de motifs sont nombreuses, leur coût de revient est faible (quelques centimes par pastille) et l'acier inoxydable permet de les autoclaver et de les réutiliser très facilement (Figure 32).

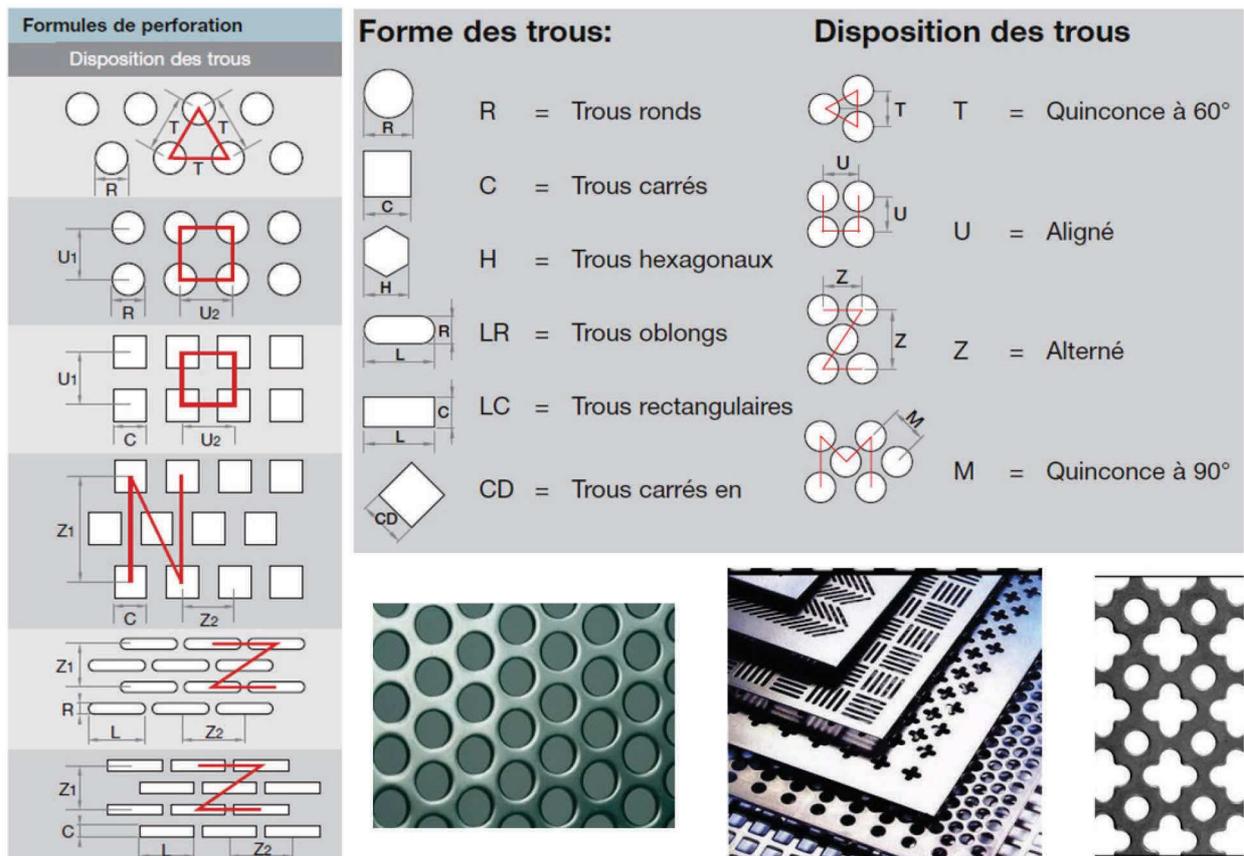


Figure 32 : Catalogue des possibilités de la tôle perforée

Les pastilles en Inox désignées pour des plaques de culture cellulaire 24- et 6-puits sont présentées dans l'image ci-dessous :



Nous avons effectué quelques essais qui se sont avérés encourageants mais le système nécessite une phase d'amélioration importante. Les îlots se forment correctement sur le collagène grâce aux pastilles mais des difficultés apparaissent lorsque celle-ci doivent être retirées des puits. Le retrait du pochoir en inox a effectivement tendance à abîmer les îlots de cellules s'il n'est pas retiré de manière parfaitement parallèle au fond du puit. Quelques rares cellules semblent également adhérer aux parois du pochoir et emportent avec elles les hépatocytes voisins. Il est donc nécessaire d'optimiser la manipulation de ces pastilles en les fixant sur un système permettant de les retirer dans une horizontalité parfaite. De plus, il serait intéressant de les recouvrir de résine (ex : silicone) afin de diminuer leur porosité et de lisser les angles. Bien que prometteur, nous n'avons pas continué sur ces prototypes car nous avons imaginé une autre approche plus flexible qui sera présentée dans le prochain paragraphe.

La seconde invention a été réalisée grâce au robot « Digital Dispenser D300e » capable de dispenser des pico- et des nano-volumes de DMSO ou de biomolécules avec une très grande précision (Figure 33). Fabriqué et distribué par Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, CA) et Tecan (Männedorf, Suisse), il a été initialement conçu pour faciliter les expérimentations de « dose-réponse » et distribuer de très faibles volumes de médicaments, d'enzymes, d'oligonucléotides, d'étalon, de mix PCR etc... En distribuant ces volumes directement au-dessus des puits sous forme de microgouttes, il permet de s'affranchir des étapes de dilution et éviter le gaspillage de molécules souvent précieuses (Brennan-Krohn et al., 2017 ; Holger et al., 2017 ; HafnerChiaraviglio et al., 2016 ; Hanson et al., 2015 ; Jones et al., 2013). Par exemple une solution stock à 10mM peut être directement distribuée en plaque pour obtenir

une large gamme de concentrations et ce, sans aucune étape de pré-dilution. Cet instrument qui repose sur le même principe que les cartouches d'impression à jet d'encre est capable de distribuer une gamme étendue de volumes allant de 13 pL jusqu'à un maximum de 10µL



Figure 33 : Photos du robot dispenseur D300e

Nous avons ainsi fait le rapprochement entre les capacités de ce robot et la production de co-cultures micro organisées. En effet, si nous arrivons à dispenser des microgouttes de collagène où bon nous semble, nous pourrions alors coater n'importe quelle surface avec une architecture bien définie. Nous avons donc contacté les ingénieurs de chez HP et Tecan pour leur proposer d'ajouter une nouvelle fonction au robot : le spotting de précision. Par chance, les ingénieurs avaient déjà cette idée en tête et avaient commencé à développer un nouveau logiciel dédié à cette application. Intéressés par notre projet, HP et Tecan ont eu l'amabilité de nous fournir en exclusivité le logiciel de spotting encore en test ainsi que de nous prêter un second robot (D300e) destiné à l'Inserm.

#### d) Objectifs de l'étude

Dans cette étude, différentes solutions de spotting, différents supports de culture ainsi que divers motifs de collagène ont été testés dans le but d'explorer les capacités du robot D300e. Dans un premier temps, nos expérimentations ont ainsi visé à définir les conditions de spotting optimales pour pouvoir produire des co-cultures microorganisées de qualité. Après cette phase d'exploration, des hépatocytes ont été ensemencés puis cultivés en MPCCs avec des fibroblastes 3T3-J2 (le même clone que celui utilisé sur le modèle Hepatopac™)

Les MPCCs ont également été ensemencées avec des cellules souches mésenchymateuses de souris (mMSC). Ces cellules n'ont encore jamais été testées en coculture microorganisées mais plusieurs études réalisées sur d'autres modèles (2D ou 3D) montrent que leur présence est bénéfique à la culture d'hépatocytes : activités métaboliques (CYP, UGT...) augmentées et maintien de la morphologie et des fonctions anaboliques sur le long terme (Gu *et al.*, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2015; Qin *et al.*, 2015; Rebelo *et al.*, 2017).

Les fonctions hépatocytaires comme la production d'albumine, l'activité des CYP450 et la formation de canalicules biliaires ont été évaluées tout au long de l'expérimentation. En parallèle, des photos ont été capturées à intervalles réguliers afin de réaliser un suivi morphologique des îlots au cours du temps. Les objectifs de cette seconde phase étaient tout d'abord de déterminer si notre méthode de spotting pouvait égaler les performances observées sur Hepatopac™. Puis dans un second temps, d'évaluer la capacité des mMSC à maintenir les hépatocytes sur le long terme et de situer cette co-culture en comparaison aux cellules 3T3-J2.

## 2. Matériels et méthodes

**Supports de culture cellulaire et réactifs.** Le spotting a été conduit à l'aide du robot HP D300e digital dispenser (Tecan, Morrisville, NC) et des cassettes de dispense (T8+). Le spotting a été réalisé sur 3 types de support : des plaques 96-puits commandées chez Falcon (Cat. #351172 Corning, NY), des coverslips stériles en plastique Thermanox™ (15mm Cat. #174969, Thermo Fisher Scientific Inc.) et des coverslips en verre de 15mm (Cat. #11578482, Menzel). Après le

spotting, les coverslips ont été placés dans des plaques de 24-puits (Cat. #353047, Falcon). Durant l'étape de spotting le robot est placé dans un PSM afin de garantir les meilleures conditions de stérilité. Après le spotting, les supports coatés sont tout de même baignés dans de l'éthanol à 70° afin de prévenir au maximum le risque de contamination. Les pinces pour manipuler les coverslips ainsi que l'eau distillée (H<sub>2</sub>O) qui compose le tampon de spotting ont toujours été utilisées sous forme stérile.

**Tampon de spotting.** Le liquide destiné à être dispensé doit respecter une certaine tension de surface afin de pouvoir être éjecté de la cassette. Ainsi, nous devons ajouter un « surfactant » à notre mélange de collagène pour amorcer la cassette et obtenir un spotting de qualité.

Dans cette étude, nous avons testé 3 formulations de tampons de spotting :

- Brij 35 (Cat. #10265731, Acros Organics) à 0.1% dans H<sub>2</sub>O
- Triton X100 (Cat. #X100-100ML, SIGMA ALDRICH) à 0.1% dans H<sub>2</sub>O
- TWEEN® 20 (Cat. #P2287, SIGMA ALDRICH) à 0.1% dans H<sub>2</sub>O.

Le coating des plaques a été réalisé avec du collagène de type I (Cat. # #8188, ScienCell). Le collagène a toujours été ajouté en dernier dans le tampon de spotting et au dernier moment (juste avant de démarrer le robot). Après le spotting les supports coatés avec les motifs de collagène sont incubés à 37°C pendant 2h puis stockés à -4°C jusqu'à utilisation.

**Développement du protocole de distribution.** Les travaux préliminaires ont dans un premier temps consisté à créer les « layouts » et les « patterns » nécessaires au fonctionnement du robot. Le « layout » indique les dimensions et les coordonnées des puits pour chaque type de plaque tandis que les « patterns » représentent les schémas de distribution permettant de spotter le motif de collagène. Ces étapes de configuration et de design des motifs ont été réalisées avec le logiciel HP Bio Pattern développé par HP, Inc. (Palo Alto, CA). Les schémas des motifs et les volumes dispensés seront décrits avec précision dans la partie résultats. La qualité du spotting a d'abord été évaluée à l'œil nu grâce à la réfringence des gouttes puis de manière plus approfondie avec le microscope EVOS XL (Life Technologies SAS).

**Milieux de culture.** Nous avons utilisé les milieux de culture décrits dans la publication de Lin & Khetani (2017). La composition est décrite dans le tableau ci-dessous :

<p><b>mMSC medium</b></p> <p>445 mL exp media (HMSC.E.Med, CET) 50 mL Fetal Bovine Serum 5 mL 100× penicillin-streptomycin</p>	<p><b>HEP seeding medium</b></p> <p>48.25 ml Williams' E medium (Sigma-Aldrich, cat. no. W4128) 750 µl 1 M HEPES, pH 7.6 500 µl ITS+ premix (Corning, #354352) 500 µl 100x penicillin-streptomycin 0.5 µl 10 mM dexamethasone 0.5 µl 0.7 mg/ml glucagon</p>	<p><b>HEP overnight medium</b></p> <p>43.25 ml 1× DMEM, high-gluc 5 ml fetal bovine serum (Hyclone, #SH30071.03HI) 750 µl 1 M HEPES, pH 7.6 500 µl ITS+ premix 500 µl 100× penicillin-streptomycin 0.5 µl 10 mM dexamethasone 0.5 µl 0.7 mg/ml glucagon</p>
<p><b>3T3-J2 medium</b></p> <p>44.5 ml 1× DMEM, high-glu (#10017CV) 5 ml bovine serum (Life Tech #16170060) 500 µl 100× penicillin-streptomycin</p>	<p><b>HEP maintenance medium</b></p> <p>43.25 ml 1× DMEM, high-glu 5 ml bovine serum 750 µl 1 M HEPES, pH 7.6 500 µl ITS+ premix 500 µl 100× penicillin-streptomycin 0.5 µl 10 mM dexamethasone 0.5 µl 0.7 mg/ml glucagon</p>	<p><b>HEP dosing medium</b></p> <p>48.25 ml 1× DMEM, high-glu 750 µl 1 M HEPES, pH 7.6 500 µl ITS+ 500 µl 100× penicillin-streptomycin 0.5 µl 10 mM dexamethasone 0.5 µl 0.7 mg/ml glucagon</p>

**Amplification des cellules partenaires 3T3-J2 et mMSC.** Les ampoules de cellules souches mésenchymateuses de souris (mMSC) C57BL/6 (#MUBMX-01001) proviennent de chez Cyagen tandis que les fibroblastes embryonnaires de souris clone 3T3-J2 ont été obtenues via Kerafast (#EF3003). Ces ampoules ont été décongelées selon les recommandations des fournisseurs. Le passage des cellules a été réalisé à l'aide de trypsine EDTA 1X et 3000 cellules/cm<sup>2</sup> ont ensemencées dans des flasques ou boîtes de pétri (traitées culture cellulaire). Les milieux de culture « 3T3-J2 medium » et « mMSC medium » ont été utilisés pour l'amplification et la maintenance des 3T3-J2 et mMSC.

**Ensemencement des hépatocytes et mise en co-culture.** Les ampoules d'hépatocytes (lots #4122C et #4020, TRL Lonza) ont été décongelées en suivant le même protocole que dans les études précédentes. Après centrifugation, les cellules ont été reprises dans le milieu « HEP seeding ». Après numération, 400µL d'une suspension 350 000 hépatocytes/puits ont été ensemencés sur les coverslips (15mm) préalablement disposés au fond des plaques 24-puits. Les plaques ont ensuite été placées dans un incubateur à 37°C et agitées toutes les 20min pour éviter que les cellules n'adhèrent hors des îlots de collagène. La formation des îlots a été surveillée régulièrement au microscope. Entre 3 et 5h après l'ensemencement, les puits ont été rincés 2 fois avec du milieu « HEP overnight » puis à nouveau remplis avec 400µL de ce même milieu jusqu'au lendemain. Au matin, soit à J+1 post décongélation, les puits ont été rincés 2 fois puis remplis avec 200µL de milieu « HEP maintenance » en attendant l'ajout des

3T3-J2 ou des mMSC. A partir de ce moment, les cellules 3T3-J2 et mMSC préalablement amplifiées ont pu être trypsinées, rincées et centrifugées avant d'être reprises dans du milieu « HEP maintenance ». Après numération, 200µL de suspension contenant 90 000 cellules (3T3-J2 ou mMSC) ont été ajoutés dans les puits contenant les îlots d'hépatocytes. Les plaques ont ensuite été agitées toutes les heures afin d'assurer une répartition homogène autour des îlots d'hépatocytes. Ces co-cultures ont été incubées à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub> et maintenues sur plusieurs semaines grâce à un renouvellement de milieu (400µL/puits de « HEP maintenance ») tous les Lundi, Mercredi et Vendredi.

**Mesure de l'activité des CYP.** Outre les critères morphologiques qui permettent de s'assurer de la qualité des MPCC (stabilité et état des îlots, réfringences des cellules ...), une caractérisation de la capacité métabolique des hépatocytes cultivés à long terme en MPCCs a été réalisée.

En effet, afin de s'assurer de la bonne compétence des cellules en terme d'activité métabolique et obtenir une estimation du phénotype du donneur dont sont issus les hépatocytes, on procède au phénotypage de ces derniers. Le phénotypage a été réalisé vis-à-vis des quatre principales isoformes de P450 impliquées dans la métabolisation des xénobiotiques : les CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 et CYP3A4 grâce à l'utilisation de substrats spécifiques.

Pour chaque activité, on quantifie à la fois la disparition du produit inchangé et l'apparition du ou des métabolite(s) spécifique(s) de l'isoforme de CYP selon que l'on exprime les résultats en clairance métabolique intrinsèque Clint ou en vitesse de formation de(s) métabolite(s). Les substrats utilisés, les réactions étudiées ainsi que les métabolites spécifiques de chaque voie de métabolisation sont listés dans le tableau ci-dessous :

CYP	Substrat spécifique	Réaction catalysée	Métabolite spécifique formé
CYP1A2	Phénacétine	O-Dééthylation	4-Acétamidophénol
CYP2C9	Tolbutamide	Méthyl-hydroxylation	4-Hydroxy-tolbutamide
CYP2D6	Dextrométhorphan	O-Déméthylation	Dextrorphan, Dextrorphan glucuronide
CYP3A4	Midazolam	1'-Hydroxylation puis conjugaison	1'-Hydroxy-midazolam suivi de la conjugaison en 1'-OH-MDZ glucuronide

Les cinétiques de métabolisation ont été démarrées après rinçage des puits et ajout de 200µL de milieu « HEP dosing » contenant les 4 substrats de référence (Midazolam, Dextrométhorphan, Phénacétine et Tolbutamide) à 1µM. Après 8h d'incubation, les cinétiques ont été arrêtées par l'ajout de 800µL d'un mélange Acétonitrile/Eau (40/30, v/v). Ces cinétiques ont été lancées aux jours 4, 11 et 20 (post-décongélation des hépatocytes). Le dosage des substrats et de leurs métabolites a été réalisé dans les mêmes conditions (LC-MS/MS) et en suivant le même protocole que celui suivi dans notre publication sur Hepatopac™.

**Immunomarquage.** Au cours de la culture, des coverslips ont régulièrement été fixés au Paraformaldéhyde 3.2% dans le but de les préparer à l'immunomarquage. Les deux anticorps primaires utilisés sont les suivants : MRP2 (1/100 ; anticorps monoclonal de souris, M2-III-6, Santa Cruz) et le CYP3A4 (1/200 ; anticorps monoclonal de lapin, EPR6202, Epitomics). Brièvement, les cellules fixées sur les coverslips ont d'abord été perméabilisées à l'aide d'une solution PBS--Triton 0,1% pendant 5min puis incubée avec les anticorps primaires durant 1h30. Après lavages, avec du TBS -Tween 0,05% les anticorps secondaires (Anti-Goat 647, Anti-MouseA-568, Anti-Rabbit-647, 1/1000, Molecular probes) et DAPI (1/1000, Thermo Fisher) ont été appliqués durant 1h30 puis les coverslips ont été lavés 3 fois avec du TBS -Tween 0,05%. Après montage des lames (Fluorescence Mounting Medium, Dako), l'observation a été réalisée sur le microscope à épifluorescence Zeiss Apotome (Plateforme Montpellier RIO Imaging (MRI), site de l'INM).

**Dosage de l'albumine.** Lors de la maintenance des cellules et du renouvellement de milieu, des surnageants ont régulièrement été récoltés et conservés à -80°C pour être analysés. La sécrétion d'albumine a ainsi été mesurée à l'aide du kit ELISA-Sandwich de chez Abcam (Cambridge, UK). La procédure de dosage de l'albumine a été la même que celle décrite précédemment. Les détails peuvent être consultés dans notre publication sur Hepatopac™.

### 3. Résultats

#### a) *Prise en main du robot de spotting*

La qualité des motifs de collagène est la composante élémentaire pour obtenir des MPCCs de qualité. Notre approche se veut simple et efficace afin que les utilisateurs puissent concrétiser leurs idées très rapidement. L'évaluation de cette nouvelle méthode de spotting va ainsi débiter par le test du logiciel et la prise en main de l'appareil. Le robot D300e a été piloté via le logiciel HP Bio Pattern développé spécialement pour le spotting. Les « layouts » correspondants aux schémas de plaques (dimensions, nombre et coordonnées des puits) ont été configurés aisément à partir de l'application. L'interface du programme est très intuitive et a permis de créer les plans de tous les types de plaques existants (de 6- à 384-puits) en quelques minutes (Figure 34).

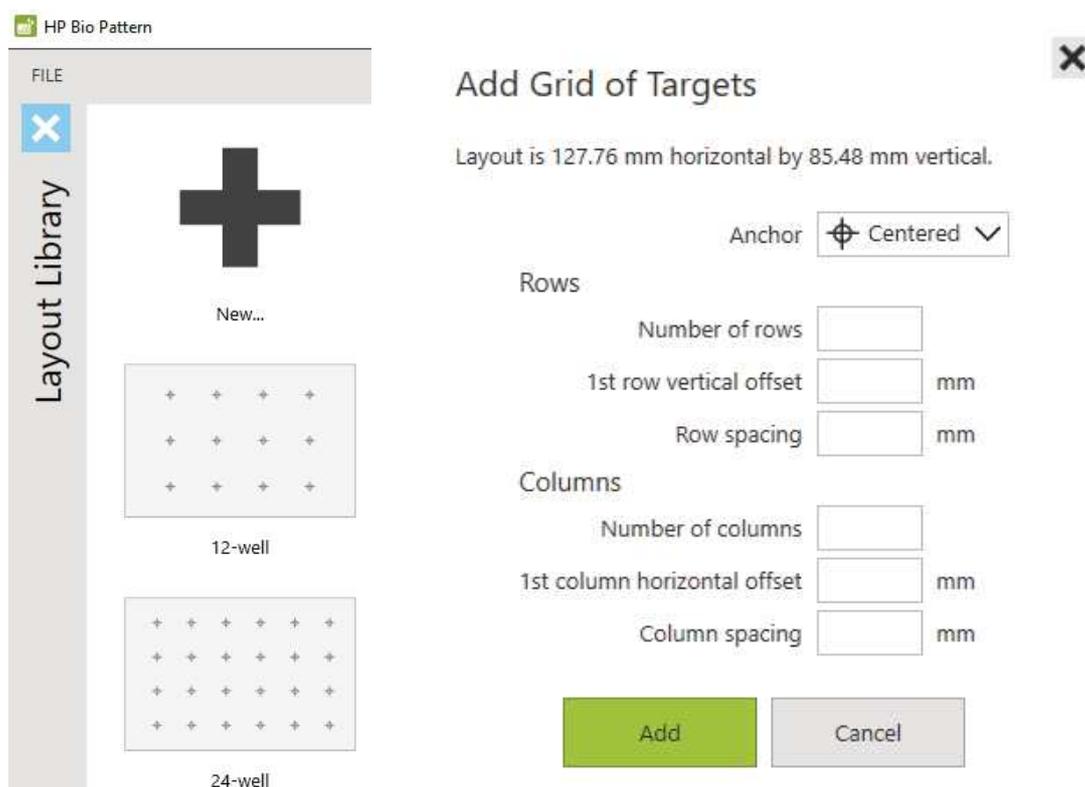
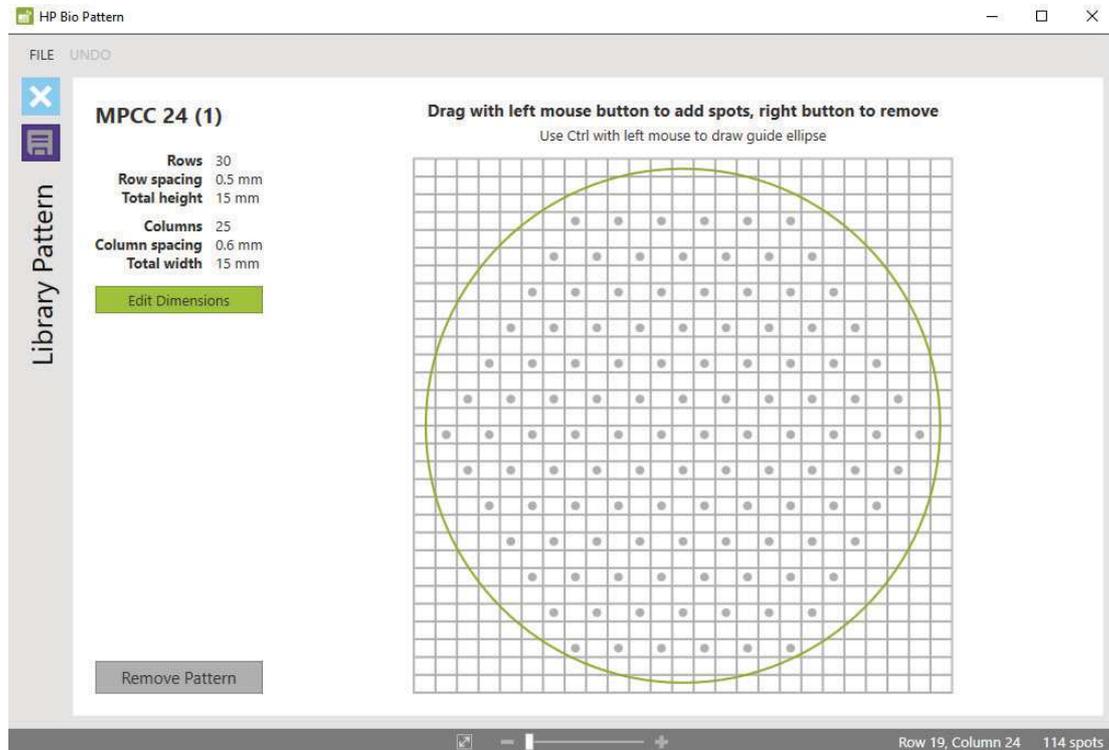
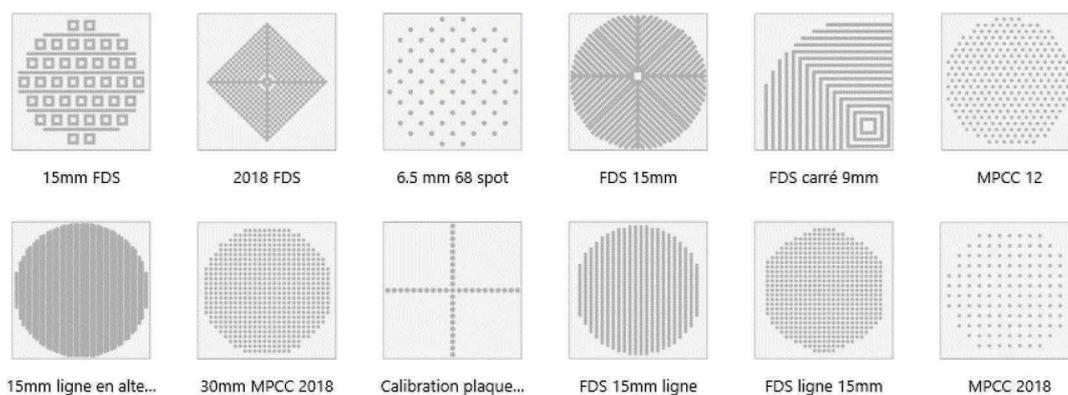


Figure 34 : Logiciel HP Bio Pattern, module de création des Layouts

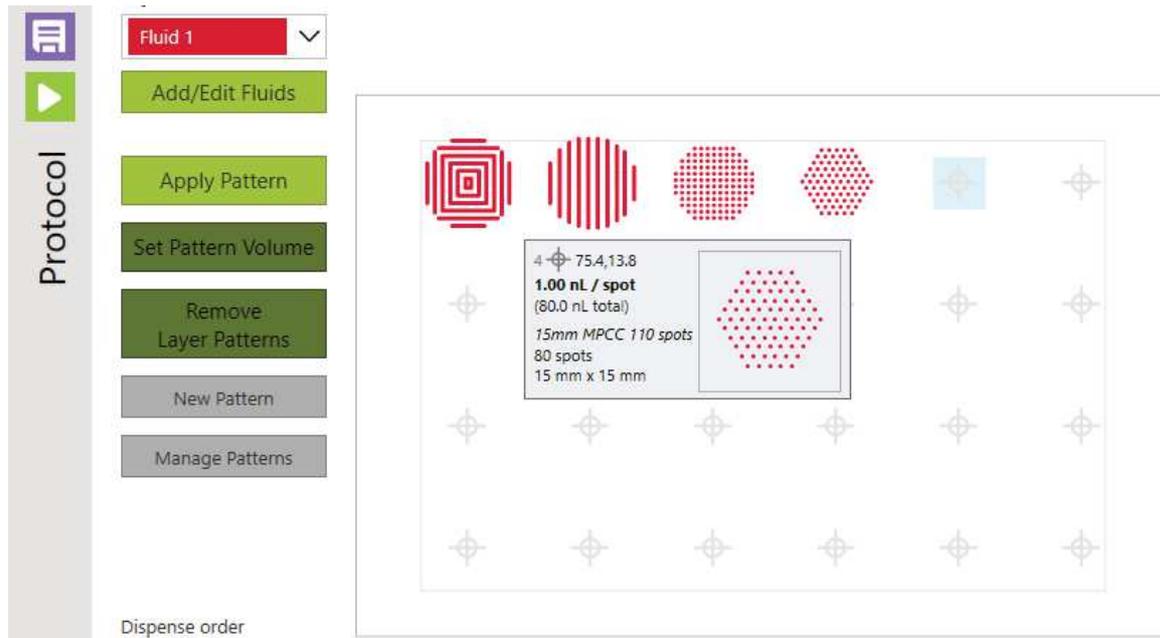
Un second module nous a permis de créer les « patterns » avec la même facilité. Sur le logiciel, le puits est modélisé sous forme d'une grille sur laquelle nous pouvons cliquer pour indiquer la position des spots à distribuer :



Les distances entre les lignes et les colonnes de la grille peuvent être configurées avec précision. Ainsi, tels des pixels sur un écran, les formes et la résolution des motifs ont pu être ajustées à notre guise. En rapprochant les spots nous avons par exemple réussi à créer des lignes continues comme si nous imprimions des travées de collagène. En revanche, plus un motif contiendra de spots, plus le temps pour « l'imprimer » sera important. Le spotting du motif utilisé sur le modèle Hepatopac™, composé d'une centaine de spots, nécessite environ 30 secondes par puits. Voici des exemples de motifs qui ont été imaginés pour cette étude :



La configuration du run permet ensuite de placer et de choisir les motifs à « imprimer ». Dans cette dernière étape, le volume par spot est configuré avec précaution car il s'agit d'un paramètre qui conditionnera la taille finale des îlots. Le logiciel permet de spotter une plaque entière avec une architecture unique mais aussi d'imprimer des architectures et des volumes/spot différents au cours d'un même run :



b) *Qualité du spotting*

**Solution de spotting.** Après la prise en main du logiciel, les premiers essais de spotting ont été initiés. Le fabricant préconise d'utiliser un surfactant lorsqu'une solution aqueuse doit être dispensée avec le robot D300. Les solutions de spotting testées en conséquence sont résumées dans le tableau 7. Un premier contrôle sans surfactant a été réalisé à partir d'une solution de collagène à 50µg/mL diluée dans de l'eau stérile. Cet essai (5nL/spot) s'est avéré infructueux : aucun spot n'a été observé sur le coverslip en verre car aucune goutte n'est sortie de la buse de la cassette. Les mêmes conclusions ont été tirées après un second essai portant sur cette même solution + du Brij 35 à 0.1%. Les premiers spots ont été observés grâce à l'utilisation de Triton X-100 à 0.1%. La cassette n'a cependant pas dispensée tous les spots

prévus et un motif irrégulier a donc été coaté. Enfin, en produisant un motif très régulier, la solution de collagène contenant du Tween 20 à 0.3% a démontré sa supériorité face au Brij 35. L'efficacité de cette solution de spotting a ensuite été confirmée sur une dizaine de coverslips spottés à la suite et à partir d'une même buse.

Essai	Surfactant	Concentration du Surfactant	Résultat
1	Aucun	-	Pas de spot
2	Brij 35	0.1%	Pas de spot
3	Triton X-100	0.1%	Spotting irrégulier
4	Tween 20	0.3%	Spotting fidèle

Tableau 7 : Evaluation de différentes solutions de spotting

Il est important de noter que nous n'avons pas observé de problème de solubilité aux concentrations de collagène testées mais que l'acide acétique peut être utilisé à la place de l'eau en cas de besoin. Bien que subjectif, le contrôle visuel utilisé au cours de cette expérimentation a été pertinent pour évaluer la fidélité globale des motifs. Ainsi, le contrôle visuel a été systématique pour détecter de potentiels irrégularités de spotting. Grâce à ces premiers tests, une solution de spotting adéquate a été identifiée. Les expérimentations suivantes ont donc été menées avec une solution de spotting contenant du Tween 20 à 0.3%.

**Volume des spots.** Pour étoffer nos tests préliminaires, l'impact du volume des spots a été étudié : cinq motifs identiques ont été imprimés avec un volume de spot variant de 1 à 10 nL. Les résultats sont présentés sur la figure 35 ci- dessous :

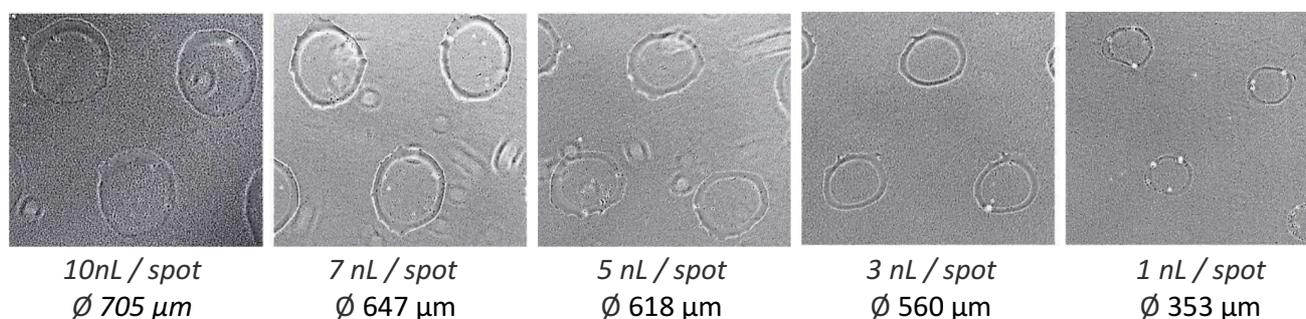


Figure 35 : Tailles des spots en fonction du volume dispensé

Nous avons observé que la taille des spots augmente en fonction du volume dispensé mais qu'il n'y avait pas de proportionnalité entre volume et taille. La variation de la taille de la goutte est plus importante entre 1 et 5 nL qu'entre 5 et 10 nL. Ainsi, à partir d'un certain volume, la goutte va préférentiellement se bomber plutôt que de s'étaler. Nous avons également remarqué qu'à volumes identiques, les spots n'avaient pas le même diamètre entre les coverslips en verre *versus* ceux en plastique. Pour assurer une fidélité parfaite d'un motif, le volume des gouttes doit donc être personnalisé à chaque support de culture.

**Concentration en collagène.** L'influence de la concentration du collagène sur la qualité du spot a ensuite été évaluée. Le spotting a été réalisé à partir de solutions contenant une concentration croissante de collagène : 25, 50, 100 et 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Six nL par spot ont été distribués soit sur des coverslips en verre soit sur des coverslips thermanox (plastique). Les résultats présentés sur la figure 36 montrent que la concentration en collagène ne semble pas avoir influencé la morphologie des spots. De petites irrégularités peuvent être observées sur le coverslip en plastique coaté avec une solution à 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mais cela reste isolé.

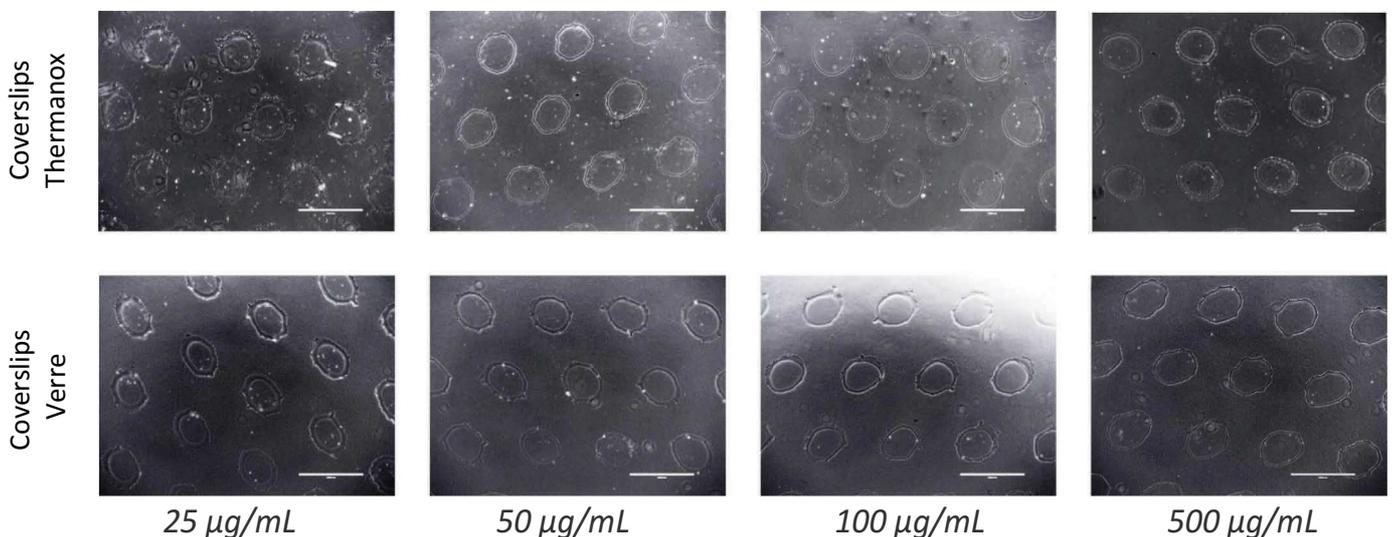


Figure 36 : Impact de la concentration du collagène sur le spotting

**Adhérence des hépatocytes.** L'adhérence des hépatocytes a ensuite été testée sur les coverslips coâtés lors du test précédent. Il s'agit dans un premier temps de vérifier que les

quelques nanolitres dispensés suffisent à coater le support mais aussi de s'assurer que les hépatocytes n'adhèrent pas en dehors des îlots. Les résultats sont présentés sur la figure 37 :

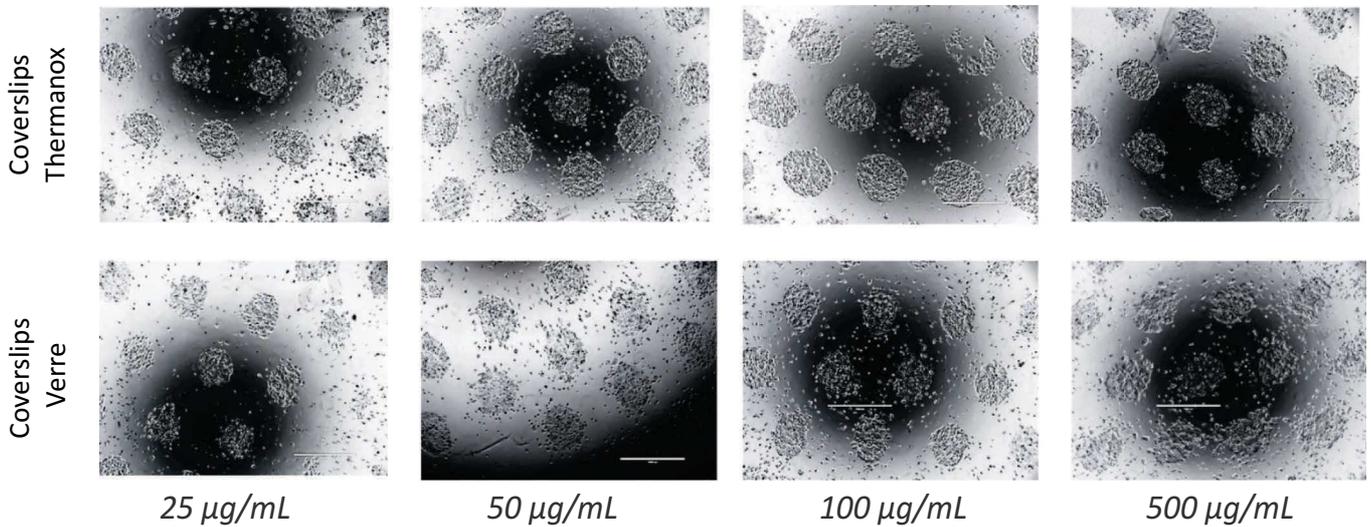


Figure 37 : Impact de la concentration du collagène sur le spotting

Les hépatocytes (lot #4122C) ont spécifiquement adhéré aux îlots de collagène et ce, quelle que soit la concentration de collagène utilisée. La régularité des spots a été évaluée lors de tests complémentaires et la concentration de collagène à 100 µg/mL a été retenue pour les futures expérimentations.

**Spotting au fond des plaques.** Le spotting devait initialement être réalisé en plaque de culture cellulaire. Cependant, comme le montre la figure 28, la qualité des spots distribués directement en plaque n'est pas satisfaisante. Face à cet échec, diverses plaques ont été testées (format 96-, 24- et 12-puits ; traitées culture cellulaire ou non) mais aucun essai ne s'est avéré concluant (Figure 38).

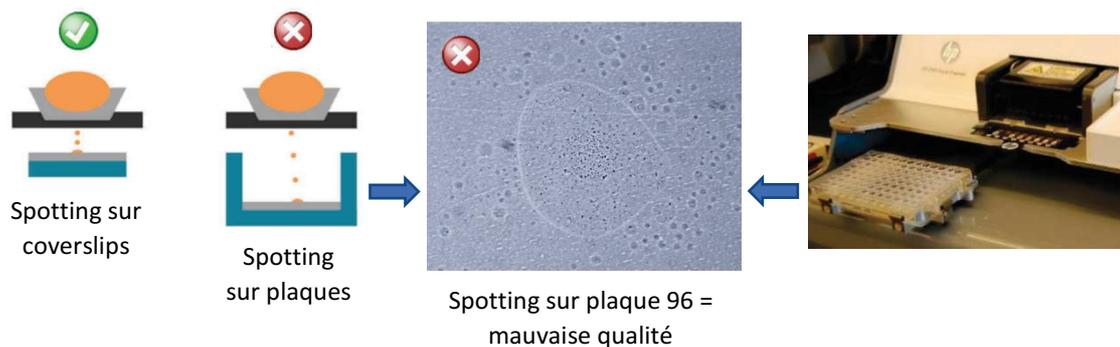


Figure 38 : Spotting sur une plaque 96 puits

Le problème est lié à la profondeur des plaques. En effet, plus la distance entre les buses et la surface à spotter est importante, plus la goutte va tomber de haut et être déformée par le « choc ». Par exemple, une distance de 11mm sépare la buse du fond d'une plaque 96-puits tandis que la distance avec une surface plane (coverslip) est inférieure à 1mm. Les cassettes de distribution utilisées par le robot (Figure 39) n'ont pas été conçues pour rentrer dans les puits mais pour distribuer de très faibles volumes par le dessus. Cette problématique nous oblige donc à spotter sur un coverslip avant de le transférer dans un puits de culture cellulaire. Avec l'expérience, cette étape de manipulation supplémentaire et délicate s'avère être l'un des seuls inconvénients de notre technique.



Figure 39 : Descriptif de la cassette de distribution utilisée pour le spotting

**Précision du spotting.** La dernière phase de découverte a permis d'approcher les capacités maximales du robot spotter. Des motifs très détaillés ont été dispensés pour apprécier la résolution de spotting et la précision des axes X et Y de la platine. Les résultats présentés sur la figure 40 montrent que la qualité de spotting est très satisfaisante. Les angles théoriques de 60° sur le motif utilisé par Hepatopac™ ont été respectés tout comme les angles à 90° des carrés. L'alignement du quadrillage est réussi et les travées d'hépatocytes sont bien parallèles et régulières. Les travées qui ont été confectionnées grâce à l'alignement de spots de volume extrêmement faibles (650pL) témoignent de la robustesse de ce robot.

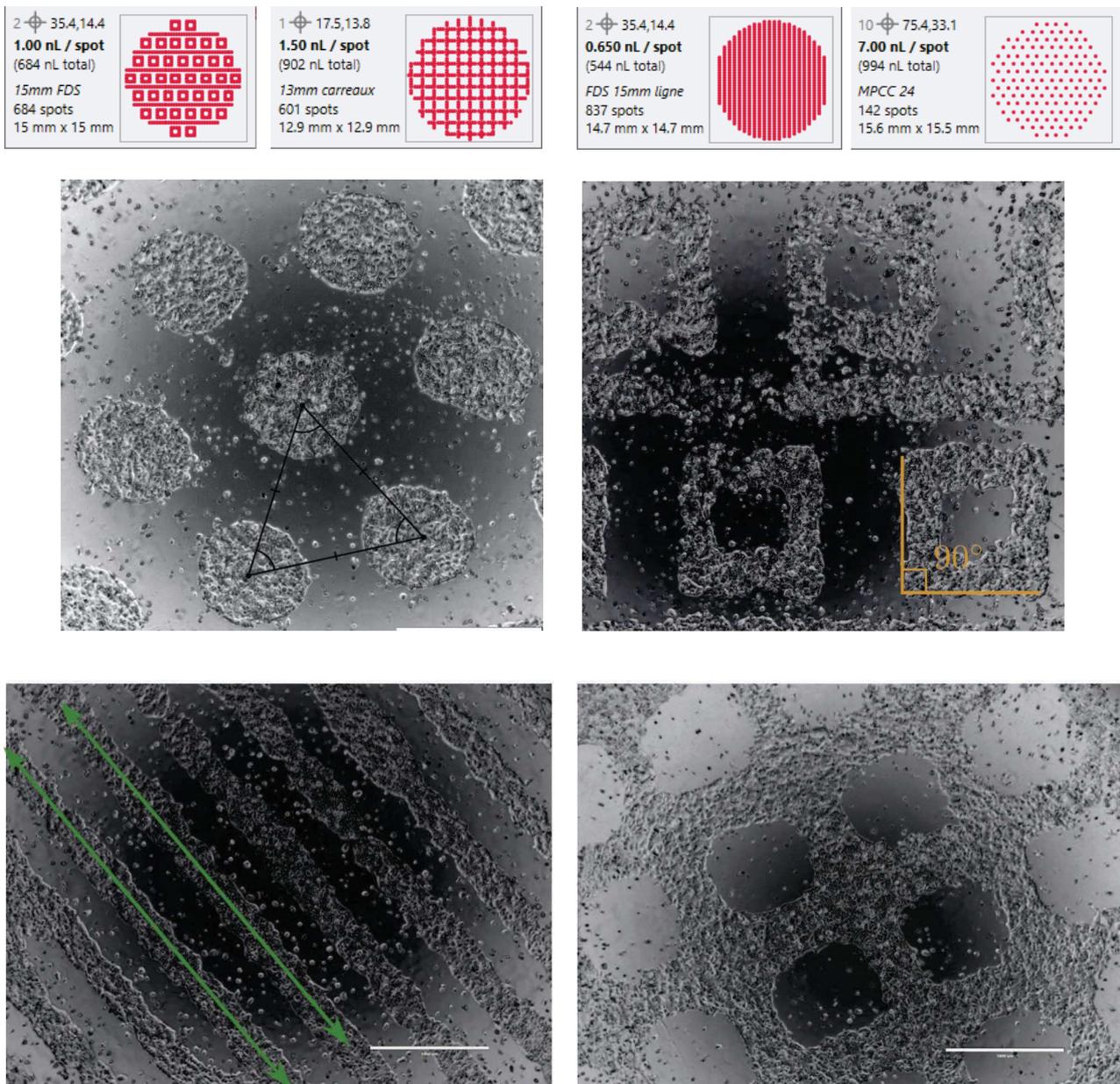
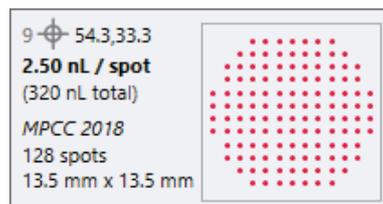


Figure 40 : Evaluation de la précision de spotting sur des motifs distribués par le robot D300e

**Bilan et design de la prochaine expérimentation.** Les coverslips Thermanox (plastique) ont été abandonnés car des tests complémentaires ont montré que les propriétés de surface n'étaient pas fidèles entre les différents lots vendus. Le spotting en plaque a également été écarté et les prochaines expérimentations vont donc être réalisées sur coverslips en verre qui garantissent une qualité de spotting optimale. Dans cette première partie, les différentes expérimentations ont permis de valider avec succès la faisabilité de notre approche dédiée à la production de MPCC par spotting de collagène. Le tampon de spotting retenu est une solution à 100 µg/mL de collagène dilué dans de l'eau distillée stérile contenant 0.3% de Tween 20. Le développement de notre méthode a continué avec l'ensemencement et la caractérisation de co-cultures micro organisées (MPCC) composées d'hépatocytes combinés soit avec des fibroblastes embryonnaires de souris 3T3-J2 soit avec des cellules souches mésenchymateuses de souris (mMSC). Le motif ainsi que le volume par spot utilisés sont précisés dans le schéma suivant :



La figure 41 témoigne de la qualité du spotting obtenue dans ces conditions, les spots sont bien alignés et réguliers. Après spotting, les coverslips de 15mm ont été transférés dans des plaques 24-puits et l'étude a été lancée. Dans les résultats qui vont maintenant être présentés, le « jour 0 » (= Day 0) correspond à la mise en culture des hépatocytes et donc au jour de décongélation. Les lots #4122C et #4020 utilisés dans cette étude ont correctement adhéré aux îlots (Figure 41) de collagène et les co-cultures ont pu être initiées le lendemain.

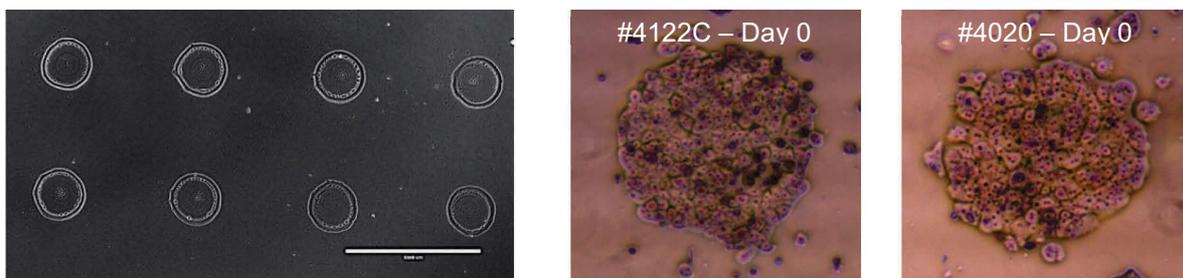


Figure 41 : Spotting et ensemencement des co-cultures micro organisées

c) *Suivi du maintien de la morphologie des MPCCs au cours de la culture.*

**Îlots en Monoculture.** En guise de témoin de monoculture, des coverslips contenant des îlots d'hépatocytes seuls ont été cultivés en parallèle des co-cultures. Au cours des deux premiers jours les îlots sont restés bien délimités mais un décollement des cellules a pu être observé dès le troisième jour. Après 4 jours, les îlots avaient perdu de leur régularité et ont commencé à se morceler. Lors du renouvellement de milieu toutes les 48h ou 72h, aucune modification de pH n'a été observée (rouge de phénol), laissant sous-entendre une très faible activité métabolique des îlots en monoculture. Beaucoup d'îlots avaient disparu après 11 jours et ceux encore présents étaient très abimés (Figure 42).

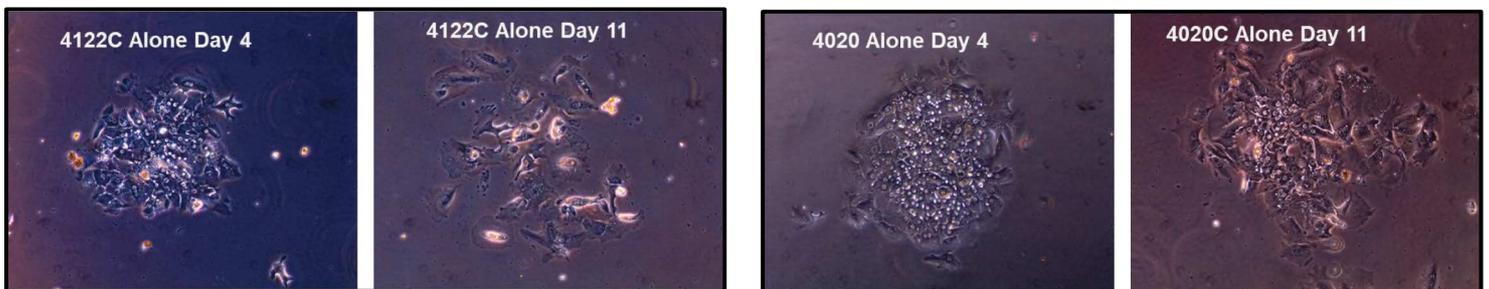


Figure 42 : Îlots d'hépatocytes cultivés en monoculture (Jour 4 et 11)

**Îlots en Co-cultures.** L'aspect des îlots d'hépatocytes a été très différent lorsque ceux-ci étaient en co-cultures avec des 3T3-J2 ou des mMSC. Ces types cellulaires, fibroblastes embryonnaires et cellules souches mésenchymateuses, ont tous deux participé à soutenir les îlots d'hépatocytes au cours de la culture. Contrairement à la monoculture, les cellules hépatiques sont restées accrochées aux coverslips tout le long de l'expérimentation soit jusqu'au 20<sup>ème</sup> jour. Les figures 43 et 44 montrent que les îlots ont conservé leur consistance et que la morphologie des hépatocytes primaires n'est pas (ou peu) affectée par plus de 2 semaines de culture. Avant le renouvellement de milieu, les surnageants tendaient à virer vers le jaune (acide) ce qui supposait le maintien probable d'une activité catabolique et anabolique. Des amas qui s'apparentent à de la matrice extracellulaire et à de petites vésicules peuvent être visualisés sur certains îlots. Enfin, des îlots légèrement déformés ont aussi été observés: des vidéos réalisées dans l'incubateur et en time laps (non présentées) font apparaître un lent mouvement de constriction des îlots causé par la contraction des hépatocytes et/ou par la pression des cellules autour de l'îlot.

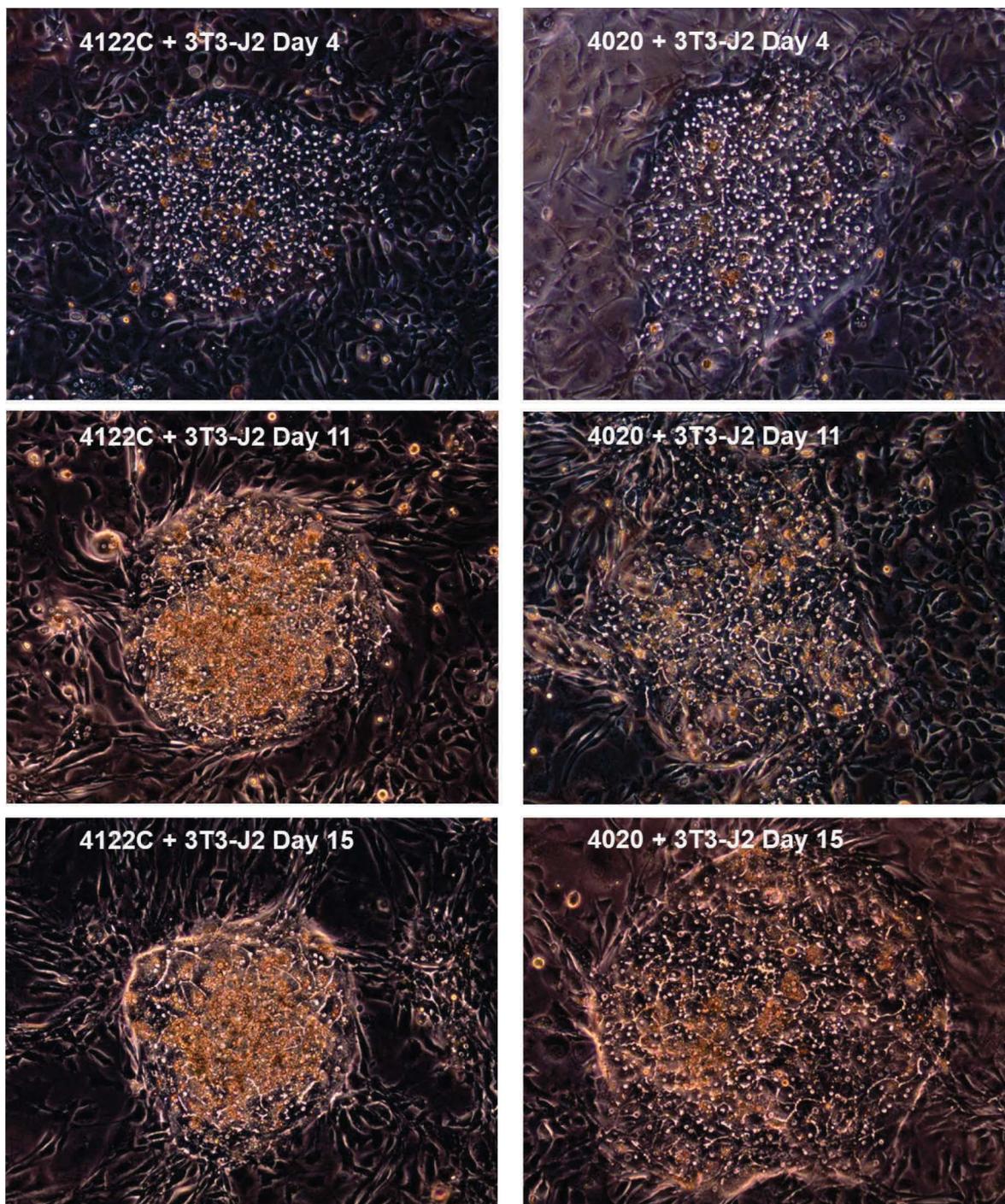


Figure 43 : Suivi morphologique des Ilots d'hépatocytes cultivés avec des fibroblastes 3T3-J2

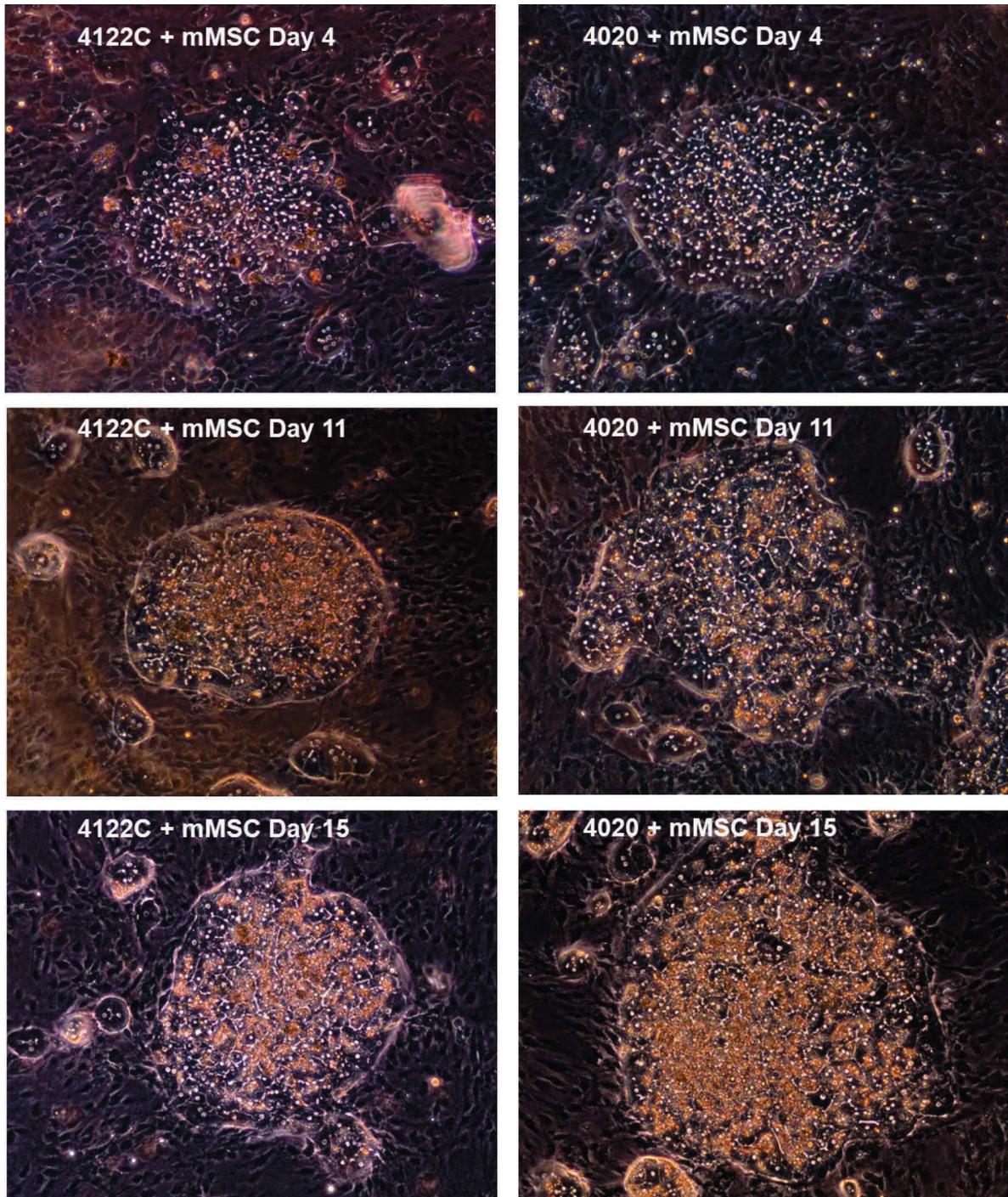


Figure 44 : Suivi morphologique des Ilots d'hépatocytes cultivés avec des cellules souches mésenchymateuses (mMSC)

Pour finir, des structures réfringentes s'apparentant à des canalicules biliaires sont apparues dès le quatrième jour de co-culture et se sont étendues jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour. La formation de canalicules biliaires sera confirmée et commentée dans la partie dédiée à l'immunofluorescence.

d) *Activités des cytochromes P450.*

**Activité du CYP3A4.** L'activité du CYP3A4 a été mesurée aux jours 4, 11 et 20 sur îlots d'hépatocytes seuls et sur les MPCCs cultivés avec les 3T3-J2 et les mMSC. Les résultats présentés sur la figure 45 mentionnent le pourcentage de midazolam éliminé après 8h d'incubation et la quantité de métabolites formés (le 1-Hydroxymidazolame et son glucuronide).

Tout d'abord, une très faible activité du CYP3A4 a été observée sur les îlots cultivés en monoculture ce qui coïncide avec l'analyse morphologique. Que ce soit avec les mMSC ou les 3T3-J2, le lot #4020 présente un métabolisme plus important que le lot #4122C vis-à-vis du Midazolam. L'activité CYP3A4 du lot #4122C a augmenté entre le jour 4 et 11 puis est restée stable jusqu'au 20<sup>ème</sup> jour et ce, pour les deux types de co-cultures. Le lot #4020 cultivé avec les 3T3-J2 a quant à lui, présenté un métabolisme stable tout au long de l'intervalle de mesure (jour 4 à 20). Ce même lot cultivé avec des mMSC montre une diminution de l'activité 3A4 entre le jour 4 et 11 mais se stabilise ensuite (figure 45).

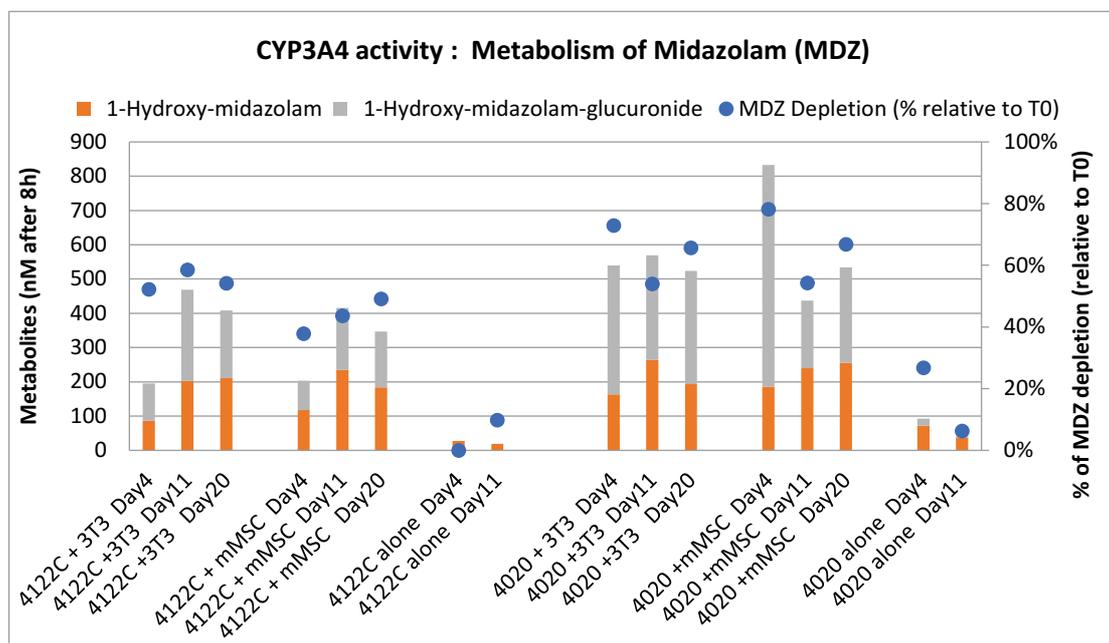


Figure 45 : Activité CYP3A4 des hépatocytes cultivés en MPCC

**Activité du CYP2D6.** Tout comme pour le CYP3A4, la plus forte activité du CYP2D6 a été mesurée sur le lot #4020 mais la disparité est cependant plus marquée. La figure 46 qui résume les résultats montre qu'environ quatre fois moins de métabolites sont produits par le lot #4122C. Que ce soit avec les 3T3-J2 ou les mMSC, la synthèse du Dextrorphan glucuronide a fortement chuté à partir du jour 4 mais le métabolisme du Dextrométhorphan semble rester stable. On observe davantage de dextrorphan ce qui semble démontrer que les UGT2B (UGT2B4/7/15/17) responsables de la conjugaison de ce dernier en dextrorphan glucuronide (ref biblio : Lutz et al., DMD 2011) soient moins stables dans ces conditions.

Ainsi, la somme des quantités de métabolites produits est globalement restée stable tout au long de l'expérimentation. Pour les deux types de co-cultures, la déplétion du Dextrométhorphan diminue à jour 11 puis augmente jusqu'au jour 20. Il n'y a pas de différence marquée entre les co-cultures mMSC vs 3T3-J2, ces deux types cellulaires semblent participer au maintien de l'activité du CYP2D6.

Enfin, la formation du métabolite CYP3A4-dépendant, 3-Méthoxymorphinan, est restée elle aussi stable ce qui vient supporter les résultats obtenus plus haut avec le midazolam, quant à une activité CYP3A4 bien maintenue.

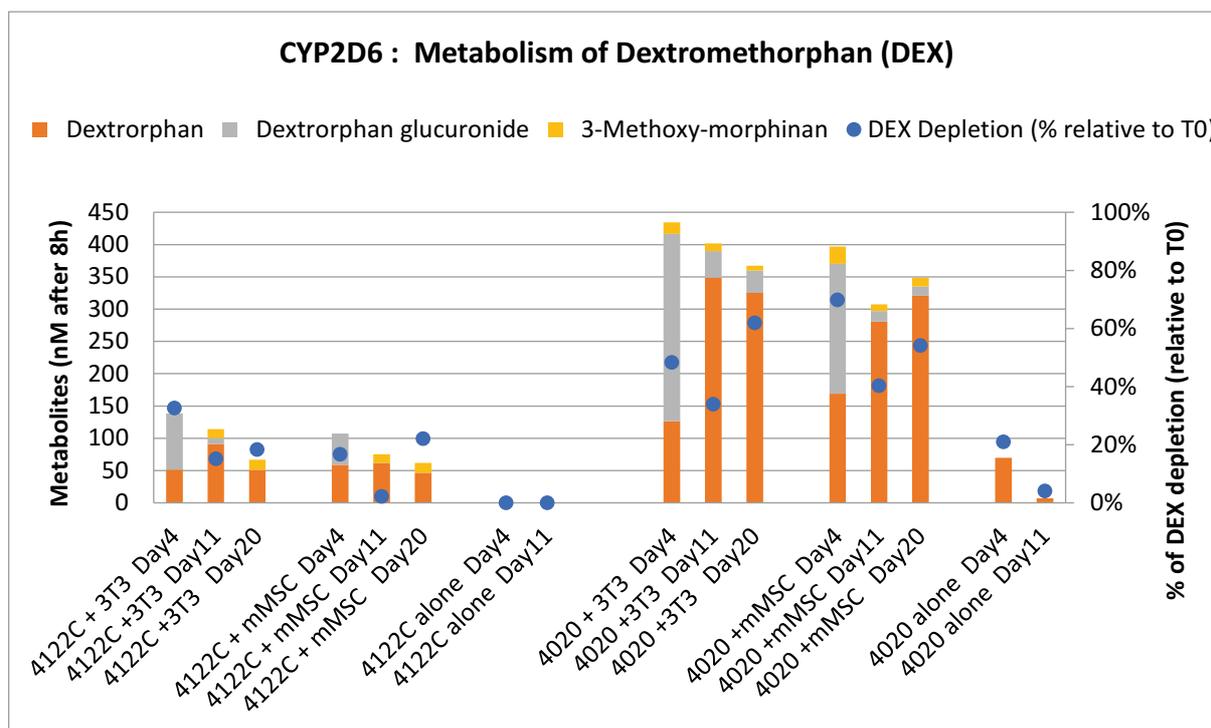


Figure 46 : Activité CYP2D6 des hépatocytes cultivés en MPCC

**Tolbutamide et Phénacétine.** La déplétion du Tolbutamide (CYP2C9) n'a pas été observée sur les MPCCs. Il s'agit d'un substrat à très faible clairance et les 8h d'incubation ne semblent pas avoir été suffisantes pour mesurer son métabolisme. En raison d'un problème expérimental (solution stock dégradée), la mesure de l'activité du CYP1A2 (Phénacétine) s'est également avérée infructueuse. De nouvelles expérimentations sont donc nécessaires pour investiguer l'activité de ces deux enzymes.

e) *Sécrétion d'albumine.*

Les échantillons en lien avec les résultats de cette étude n'ont pas encore été dosés au moment de l'écriture de ce paragraphe. Les résultats relatifs à la sécrétion de l'albumine ont été générés sur une expérimentation antérieure qui se focalisait sur la co-culture (MPCC) du lot #4122C avec les mMSC. Les résultats sont présentés dans la figure 47 :

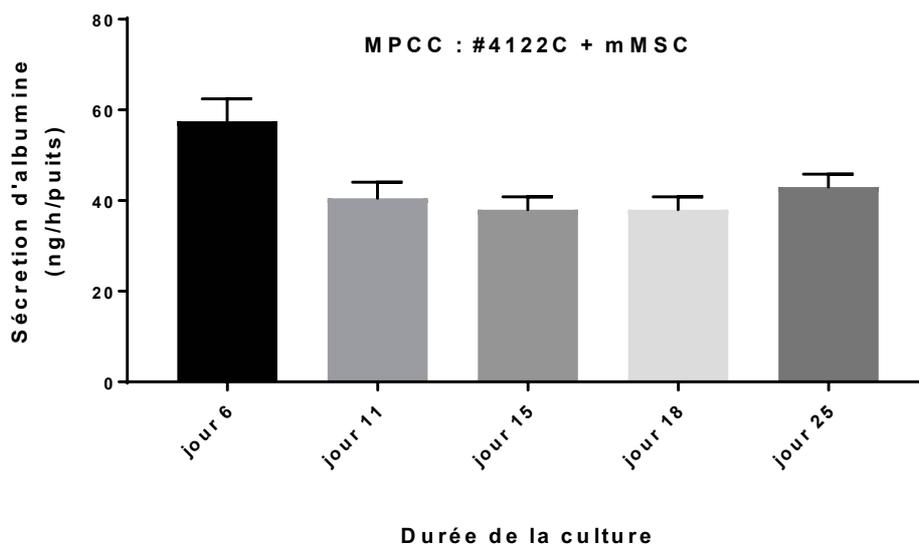


Figure 47 : Suivi de la sécrétion d'albumine de co-cultures micro organisées (#4122C + mMSC)

Après 6 jours de culture en MPCC, les hépatocytes cultivés avec des mMSC de souris ont produit environ 57 ng d'albumine par heure et par puits. Cette vitesse de synthèse a diminué entre le jour 6 et 11 mais s'est ensuite remarquablement stabilisée jusqu'à la fin de l'expérimentation. En effet, l'écarte type mesurée entre le jour 11 et 25 n'est que de 3 ng/h/puits pour une moyenne 40 ng/h/puits d'albumine sécrétée. Le motif imprimé durant cette expérimentation contenait 114 spots d'environ 500µm permettant à ≈200 hépatocytes d'adhérer.

Ainsi, en considérant 23 000 hépatocytes/puits, la sécrétion moyenne entre les jours 11 et 25 était de 1731 ng/h/puits soit une sécrétion qui se rapproche de celle observée sur le modèle Hepatopac™ (moyenne de 2233 ± 542 ng/h/puits mesurée sur 3 donneurs). Ces résultats sont très encourageants car ils illustrent le bénéfice des MPCCs + mMSC sur le maintien et la stabilisation des fonctions hépatiques *in vitro*.

f) Immunofluorescence.

L'immunomarquage a été réalisé sur des coverslips MPCC du lot #4122C fixés à différents temps de culture : Jours 7, 10 et 17. L'immunomarquage a ciblé MRP2 et le CYP3A4 dont nous avons mesuré l'activité précédemment pour ce dernier. MRP2 est une protéine (ou transporteur) d'efflux exprimée au pôle apical des hépatocytes qui est responsable de l'excrétion vers la bile de différents substrats endogènes ou exogènes. Cette protéine joue par exemple un rôle dans la biodisponibilité de certains médicaments substrats de ce transporteur. Les images sont présentées dans la figure 48 :

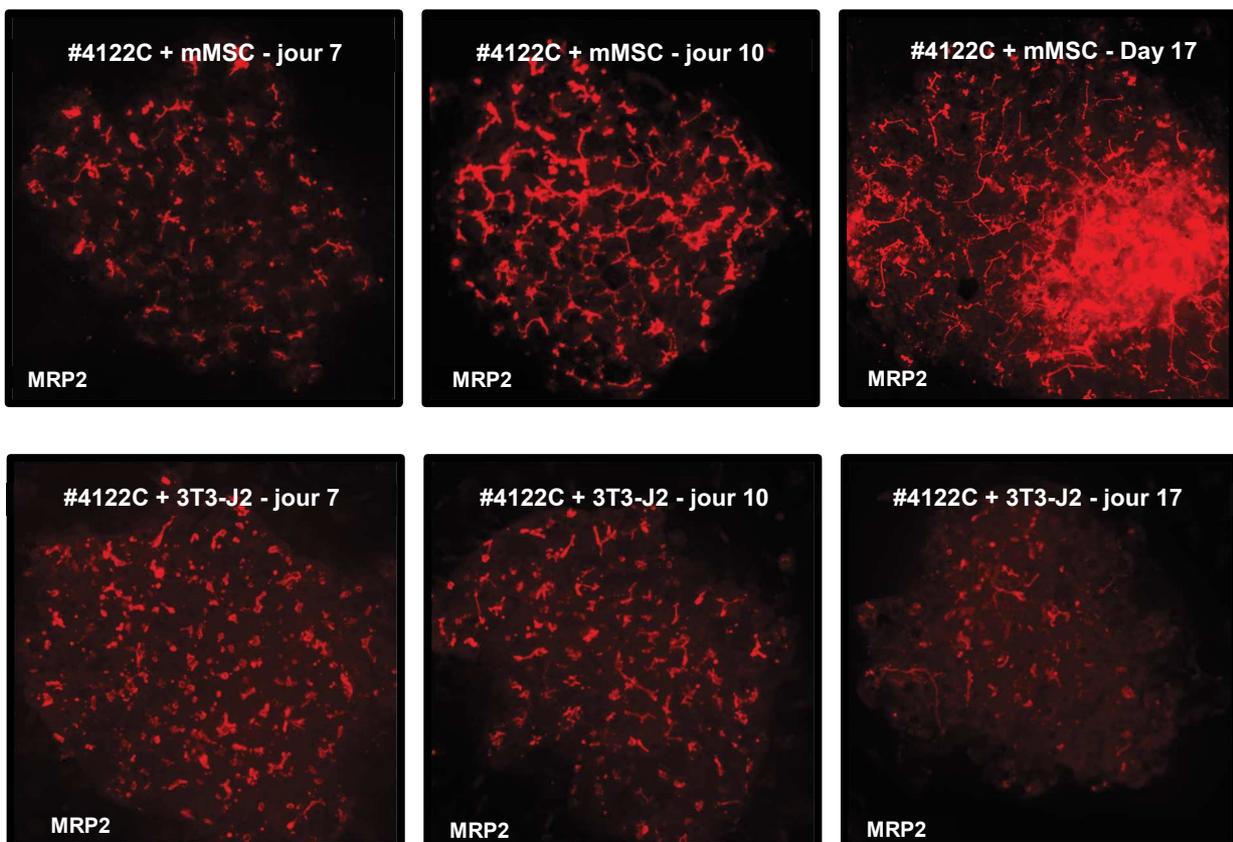


Figure 48 : Immunomarquage de la protéine MRP2 sur les cultures MPCCs (lot #4122C cultivé avec mMSC ou 3T3-J2)

Les hépatocytes cultivés avec les mMSC présentent un réseau de canalicules biliaires très dense (image du haut) dès le jour 7 et qui a continué à s'étendre au fur et à mesure de l'expérimentation. Avec les 3T3-J2, les protéines MRP2 étaient encore partiellement internalisées au jour 7 et le réseau semble avoir mis plus de temps à se former. Avec la présence de longs canalicules, l'expression maximale a été observée sur les coverslips fixés au jour 10.

**CYP3A4.** L'immunomarquage du CYP3A4 a été réalisé sur des coverslips fixés aux jours 7 et 10 et cultivés avec des hépatocytes seuls ou en co-culture avec des mMSC ou des 3T3-J2. Les résultats sont présentés dans la figure 49 :

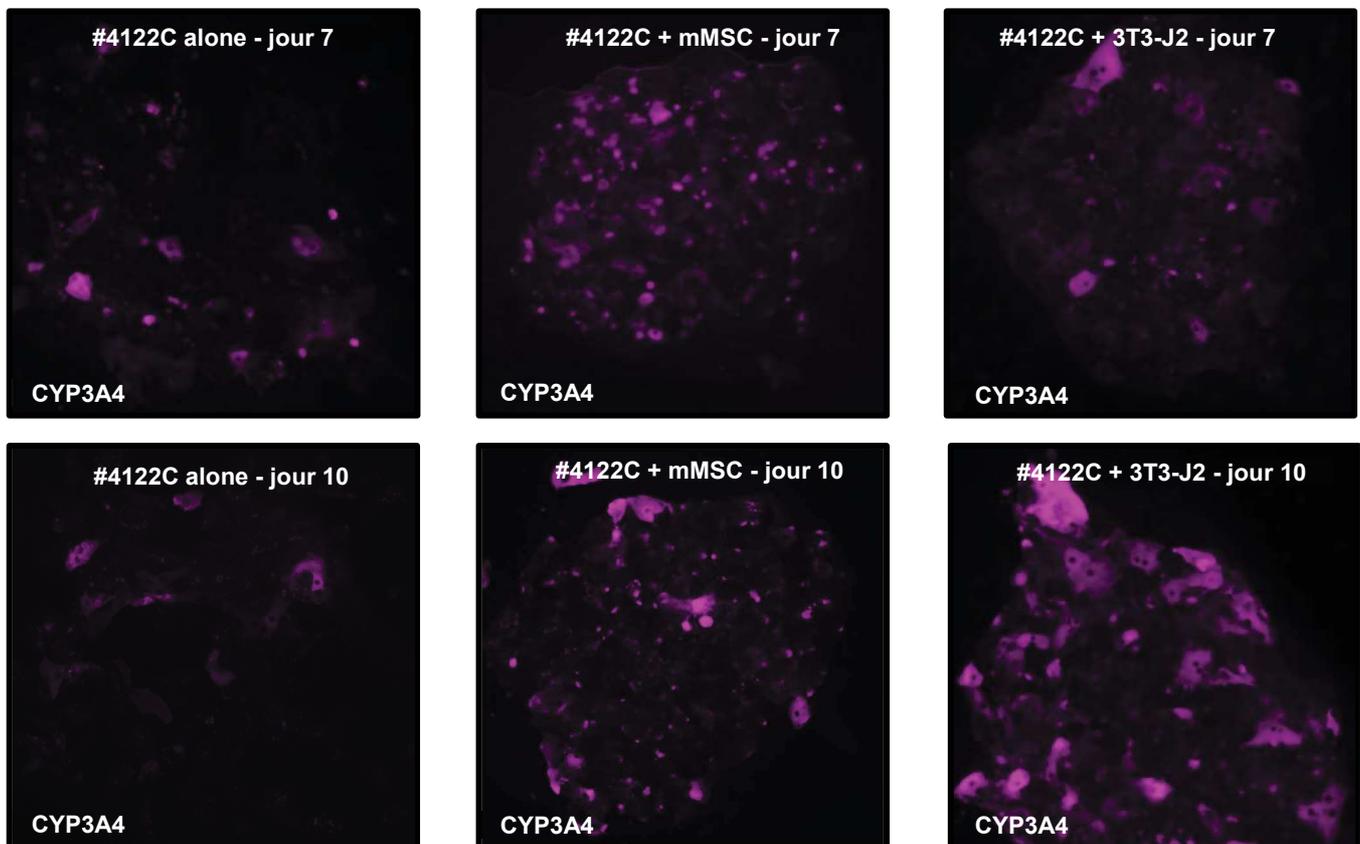


Figure 49 : Immunomarquage du CYP3A4 sur les cultures MPCCs (lot #4122C cultivé avec mMSC ou 3T3-J2)

La qualité et l'intensité du marquage sont inférieures à celles que nous avons obtenues avec MRP2 mais on peut néanmoins observer que l'expression du CYP3A4 ne semble pas uniforme au sein des îlots. Certains hépatocytes présentent en effet une fluorescence plus importante que d'autres cellules voisines. L'expression de l'enzyme semble être maintenue entre le

jour 7 et 10 voire peut-être même augmentée si l'on s'en tient à l'intensité. Les rares îlots encore complets sur les coverslips en monoculture montrent une intensité de fluorescence beaucoup plus faible.

#### 4. Discussion

Dans cette étude nous avons utilisé le robot HP D300e pour distribuer des nano gouttes de collagène et produire des co-cultures microorganisées (MPCC). Contrairement à la photolithographie utilisée par les inventeurs du modèle Hepatopac™ (Khetani and Bhatia, 2008), la méthode que nous avons développée ici ne nécessite pas de longues préparations. Notre approche a effectivement démontré son efficacité pour produire de nouveaux motifs de collagène avec une grande rapidité. Alors que les masques utilisés en lithographie nécessitent jusqu'à plusieurs semaines de fabrication, les prototypes créés par spotting sont réalisés en seulement quelques minutes après avoir été imaginés. Il faudra néanmoins accepter une perte de précision car la résolution du spotting est de quelques dizaines de micromètre contre environ un micromètre pour les techniques de lithographie les plus performantes (Lipomi *et al.*, 2012). Notre étude a cependant montré que la précision du robot était amplement suffisante pour réaliser des motifs détaillés et de toutes formes. Outre la rapidité de mise en œuvre, l'avantage conséquent de notre approche de coating par spotting est sa facilité d'utilisation. Le robot peut en effet être utilisé aussi simplement qu'une imprimante de bureau. Il se branche par une simple prise USB et ses dimensions lui permettent d'être déplacé facilement sous un PSM. Il intègre des capteurs qui guident et assistent l'utilisateur à chaque étape du processus. Enfin, l'expérience d'HP dans la conception de produits grand public leur a permis de développer un logiciel efficace et très intuitif. Les tests préliminaires ont montré qu'une journée de découverte de l'appareil était suffisante pour le prendre en main, et pouvoir exploiter son potentiel en toute autonomie.

Les différents tests réalisés dans cette étude montrent que la meilleure qualité de spotting est obtenue sur les coverslips en verre. L'impossibilité de distribuer le collagène directement au fond des puits a été une réelle déception car ceci impacte négativement le débit de production de MPCCs. La manipulation des coverslips nécessite effectivement une certaine patience et une certaine minutie. Le robot D300e n'a pas été conçu pour pouvoir spotter dans le fond des

plaques mais certains appareils concurrents le permettent grâce à des têtes de distribution piézoélectriques assez longues pour rentrer dans les puits (sciFLEXARRAYER de chez Scienion par exemple). Ces autres technologies sont cependant plus onéreuses et souvent plus compliquées à programmer que le robot d'HP et Tecan.

Pour faciliter la manipulation des coverslips, nous avons adapté et développé des supports compatibles avec le robot. Les coverslips sont ainsi posés sur une base de diamètre inférieur au afin de pouvoir les récupérer facilement avec une pince stérile. Une goutte d'eau stérile est suffisante pour maintenir les coverslips durant le run (Figure 50) :



*Figure 50 : Support transwell® 24 puits adapté pour le spotting*

Grâce à ces supports, un utilisateur expérimenté peut espérer produire une douzaine de plaques 24-puits par demi-journée. Des tests complémentaires ont par ailleurs démontré que les plaques peuvent être conservées plusieurs semaines à 4°C sans affecter les îlots de collagène. Les utilisateurs peuvent ainsi se constituer un stock de plaques et planifier plus efficacement les études futures. Il semble cependant difficile d'utiliser cette approche pour des études à très haut débit en raison du travail manuel exigé par le transfert des coverslips. Notons que le verre qui compose les coverslips est tout de même un atout pour les analyses microscopiques (ex : immunofluorescence). Enfin le caractère amovible des coverslips permet par exemple de les inclure dans des systèmes de culture en flux (ex : Alvetex perfusion plate, Quasi Vivo® etc...).

Les tests préliminaires et les études d'optimisation présentés dans ce chapitre ont permis de valider la faisabilité de notre approche de spotting dans la confection de co-cultures micro

organisées (MPCCs). Nous avons ensuite évalué la capacité des fibroblastes 3T3-J2 et de cellules mMSC à maintenir les fonctions hépatocytaires au cours du temps. Les cellules 3T3-J2 utilisées dans le modèle original Hepatopac<sup>TM</sup> et dans le modèle de long terme Hurel<sup>®</sup> (Bonn *et al.*, 2016; Winer *et al.*, 2017) ont déjà démontré leur efficacité pour supporter la culture d'hépatocytes sur plusieurs semaines. La co-culture de cellules souches mésenchymateuses de souris (mMSC) avec des hépatocytes est connue pour être bénéfique sur d'autres systèmes (Fitzpatrick *et al.*, 2015; Rebelo *et al.*, 2017) mais n'avait jamais été testée sur le modèle MPCC. Les travaux de caractérisation que nous avons initiés dans cette étude montre que les 3T3-J2 tout comme les mMSC supportent les MPCCs produits par spotting. A ce stade il est encore difficile de « départager » ces deux types de cellules et de savoir lequel est à privilégier pour maintenir les fonctions des hépatocytes humains. Le phénotypage des CYP3A4 et CYP2D6 a montré que la quantité de métabolites produits était stable entre les jours 4 et 20 et ce, pour les deux types cellulaires. La polarité des hépatocytes a aussi pu être observée avec les 3T3 ou les mMSC et l'analyse de l'expression de MRP2 a révélé de nombreux canalicules biliaires. Les concentrations mesurées dans les surnageants MPCCs + mMSC font état de sécrétion d'albumine stable et importante tout au long de la culture. Cette vitesse de synthèse semble proche de ce qui a été observé sur les hépatocytes cultivés avec les 3T3-J2 sur Hepatopac<sup>TM</sup> et donc bien plus importante que la monoculture.

L'objectif principal de cette étude était d'établir la preuve de concept de l'approche de spotting et d'initier des idées d'amélioration du modèle. La piste des mMSC est encourageante mais il est évident qu'une caractérisation plus approfondie est à mener pour démontrer la supériorité de ces cellules souches face aux 3T3-J2. Par exemple, il serait intéressant de mesurer l'activité des CYPs dès le J0 et sur des intervalles de temps plus rapprochés pour se faire une idée détaillée du profil métabolique de ces co-cultures. Les études d'expression des ARNm sont également importantes mais très complexes à analyser. Dans cette étude, les ARNm ont été régulièrement isolés avec du Qiazol puis rétro-transcrits et analysés par qPCR. Les résultats n'ont pas été présentés ici car les ARN des hépatocytes sont mêlés aux ARN des 3T3-J2 ou des mMSC ce qui rend l'interprétation très complexe. En effet, la spécificité d'espèce et les gènes de ménage ne suffisent pas car la quantité d'ARN est normalisée préalablement à l'analyse qPCR et ce, sans distinction des populations cellulaires dont la proportion est susceptible de varier au cours du temps de culture. La microdissection laser est une des

solutions ciblées pour découper les îlots et obtenir des ARN d'hépatocytes purifiés. Il serait également intéressant de mesurer les clairances intrinsèques des molécules étudiées dans notre publication sur Hepatopac™ afin de confirmer les performances de prédiction de ces MPCCs fabriquées en interne. Une attention sera portée sur la formulation du « Dosing medium » car nous nous sommes aperçus après cette étude que l'ITS (Insulin-Transferrin-Selenium) contenait de la BSA (1.25g/L final). L'activité mesurée est donc légèrement sous-estimée car les substrats de référence ont pu se lier à l'albumine bovine.

Qu'elles soient produites par lithographie ou par spotting, les co-cultures MPCCs requièrent un sur-ensemencement d'hépatocytes. Le puits doit effectivement être saturé en cellules afin que les îlots de collagène soient entièrement recouverts d'hépatocytes durant l'étape d'attachement. Par exemple, sur une plaque au format 24-puits, environ 350 000 cellules/puits doivent êtreensemencées alors que seulement 25 000 hépatocytes vont pouvoir adhérer sur les îlots. Après la période d'attachement, l'étape de rinçage va éliminer toutes les cellules qui ne sont pas attachées au collagène pour laisser la place à l'autre type cellulaire (3T3-J2 ou mMSC). Malgré leur utilité pour assurer une densité d'ensemencement suffisante, près de 90% des cellulesensemencées sont éliminées. Ce « gaspillage » est dommage car les hépatocytes récupérés sur de rares foies de donneurs sont un consommable précieux et très coûteux. La solution idéale serait de pouvoir spotter directement une suspension cellulaire plutôt que du collagène mais ceci n'est pas possible avec le robot D300e. Une alternative serait d'augmenter artificiellement l'affinité des hépatocytes pour le collagène afin de diminuer la densité d'ensemencement nécessaire. Il faut cependant prendre en compte que toute modification de la membrane est susceptible d'altérer le phénotype des cellules. Afin de ne pas risquer de modifier la réponse cellulaire, nous recommandons de continuer la caractérisation des MPCCs avec l'ensemencement traditionnel (saturation du puits).

En plus de la manipulation manuelle des coverslips, l'amplification des cellules supports (ex 3T3-J2, mMSC etc...) peut aussi être considérée comme une étape contraignante. En effet, ces cellules qui sontensemencées à une densité de 90 000 cellules/puits nécessitent d'être amplifiées en amont de la décongélation des hépatocytes. La population des 3T3-J2 met environ 36 heures pour doubler et il est donc nécessaire de débiter l'amplification 1 à 2 semaines avant l'ensemencement des MPCCs. Pour s'alléger de cette charge de travail les

entreprises pharmaceutiques préféreront sans doute sous-traiter cette étape. Après discussion avec divers fournisseurs, il s'avère possible de leur envoyer nos propres lignées afin de les faire amplifier chez eux. Leur expertise leur permet de fournir des ampoules à façon (densité, irradiées ou non etc...) et à un prix suffisamment intéressant pour ne plus le faire en interne.

La méthode que nous proposons ici n'a pas vocation à « concurrencer » le modèle Hepatopac™ mais plutôt à l'améliorer. Le modèle commercial est de grande qualité et respecte un process de fabrication drastique. Notre étude montre cependant que le « business model » du fabricant d'Hepatopac™ gagnerait à évoluer vers la vente de plaques à ensemercer soit même. Ceci permettrait par exemple d'abaisser le coût final pour les utilisateurs et les amènerait sans doute à recourir au modèle plus fréquemment.

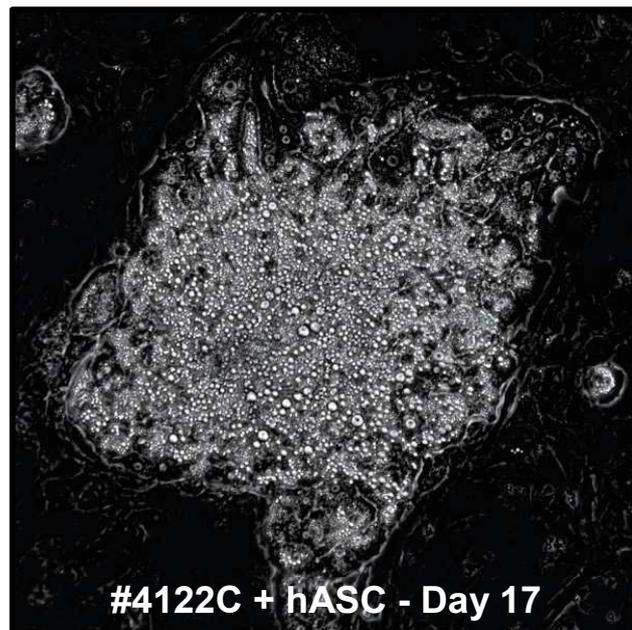
## 5. Conclusion

Ces travaux montrent que le spotting est une alternative plausible à la photolithographie. Notre approche permet de concrétiser un design de MPCC simplement et rapidement sans étape lourde (cf : confection de masque obligatoire en photolithographie). Nous espérons que la flexibilité offerte par cette approche invitera les acteurs de l'innovations à améliorer ce modèle de co-culture. La simplicité et l'intuitivité de cette technique est en effet une notion importante dans le processus d'innovation et nous espérons que le spotting permettra d'étendre le panel d'applications offert par ce modèle hépatique. Le prix du robot D300e d'environ 30 000€ représente un investissement assez important mais qui peut être amorti par plusieurs utilisateurs grâce ses autres usages potentiel (Dose-réponse, Drug Combination, fabrication de petites puces à protéines ou à ADN etc...). Pour rappel, le prix d'une seule plaque Hepatopac™ prête à être utilisée (hépatocytes + 3T3-J2) est de 3200€ hors transport. Après acquisition du robot, le coût de production d'une plaque coatée avec des îlots de collagène sera inférieur à 10€. Ce prix inclut la consommation d'une buse par plaque (cassettes de distribution HP) et les réactifs annexes (collagène et Tween + plaque de culture). Il faut ensuite ajouter le temps de travail pour amplifier les cellules partenaires et le prix des hépatocytes cryopréservés (≈600€/plaque). Les laboratoires académiques pourront utiliser des cellules fraîches (bien moins onéreuses) issues de perfusion de foies de donneurs.

Le délai entre l'imagination de cette approche et la fin de la thèse a malheureusement été trop court pour caractériser pleinement les deux co-cultures testées. Nos résultats sont toutefois suffisants pour espérer utiliser prochainement nos propres MPCCs comme un modèle hépatique stable et de long terme. Les données obtenues avec les mMSC sont prometteuses mais il est encore trop tôt pour les comparer aux cellules 3T3-J2 cultivées sur le modèle Hepatopac™. Les travaux menés dans cette étude ont démontré avec succès la faisabilité de notre approche et ont permis de poser de solides bases pour que le projet puisse évoluer dans les meilleures conditions.

### 1. Perspectives

Au cours de ces expérimentations nous avons également pu co-cultiver quelques îlots d'hépatocytes humains avec des cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées du tissu adipeux (hASC) et avons remarqué l'apparition de gouttelettes intracellulaires à partir du 11<sup>ème</sup> jour de culture (cf image ci-dessous). Les industriels tout comme les académiques sont en attente de modèles *in vitro* permettant d'étudier la stéatose hépatique, ainsi ce qui semble s'apparenter à des gouttelettes lipidiques nous a fortement intrigué. Dans la prochaine et dernière étude nous allons explorer la co-culture d'hépatocytes et de MSC humaines en MPCC afin d'investiguer un possible lien avec le processus de stéatose.



## E. Potentiel des co-cultures MPCCs produites en interne pour étudier la stéatose hépatique

### 1. Introduction

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) est la principale cause de maladie hépatique dans le monde, avec une prévalence globale estimée à 25%. Cette pathologie a progressivement pris des proportions épidémiques notamment en raison de l'augmentation de l'obésité et des diabètes de type 2 (Chalasan *et al.*, 2012). Parmi les complications de la NAFLD, on retrouve la Stéato-Hépatite Non Alcoolique (NASH) qui se différencie de la NAFLD par la présence de fibrose, d'inflammation et de lésions hépatocytaires. Ces pathologies peuvent conduire à l'apparition de carcinomes hépatocellulaires qui, actuellement, sont traités uniquement par résection hépatique partielle (Calzadilla Bertot and Adams, 2016). Au cours de la NASH, les hépatocytes accumulent une quantité anormale de lipides (stéatose), présentent un gonflement (Ballooning) et une activité altérée des CYP450 et des transporteurs de médicaments (Hardwick *et al.*, 2011; Merrell and Cherrington, 2011). Les macrophages pro-inflammatoires et les « natural killer » T (lymphocytes NKT) s'accumulent également dans le foie durant la NASH (Syn *et al.*, 2010; Wree *et al.*, 2013).

Au moment où est écrit ce manuscrit, aucun médicament n'a encore été approuvé pour guérir la NASH (Boeckmans *et al.*, 2018). Le développement de médicaments ciblant les NAFLD se focalise majoritairement sur les causes du syndrome métabolique (Geier and Rau, 2017). La vitamine E et les thiazolidinediones, agonistes de PPAR- $\gamma$ , sont des traitements insulino-sensibilisants susceptibles d'agir sur le syndrome métabolique mais ne sont pas indiqués pour la NASH en raison de leur faible efficacité (Cassidy and Syed, 2016). Les principaux obstacles au développement de candidats anti-NASH sont la méconnaissance de cibles spécifiques et l'absence de modèles NASH prédictifs. De nouveaux modèles doivent donc être développés pour pouvoir conduire un screening efficace et sélectionner des molécules à haut potentiel. De plus, les quelques candidats médicaments actuellement en phase clinique ne semblent pas être en mesure de révolutionner le traitement de la NASH et cela encourage le lancement de nouveaux programmes de recherche. En raison de mauvaises habitudes alimentaires, le besoin de traitement efficace est en effet grandissant car la NASH touche tous les continents.

Les couts liés au traitement de la NASH était estimés à 0,8 milliard de dollars en 2015 et devrait atteindre près de 15 milliards de dollars d'ici 2025 (Cassidy and Syed, 2016).

Plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier la stéatose et la NASH. Il s'agit le plus souvent d'animaux génétiquement modifiés ou ayant subis un régime alimentaire particulier (Takahashi *et al.*, 2012; Willebrords *et al.*, 2015). Cependant les différences inter-espèces et l'induction artificielle de la stéatose restent des inconvénients majeurs qui compliquent la transposition des résultats à l'Homme. Les modèles *in vitro* composés de cellules humaines peuvent alors être utilisés comme une alternative pour espérer conduire des expérimentations plus prédictives. Les lignées cellulaires telles que les HepG2, Huh7 et HepaRG sont très utilisées pour étudier la stéatose (Rogue *et al.*, 2014). Ces lignées cellulaires présentent cependant un génotype anormal en raison de leur origine cancéreuse et des fonctions hépatiques souvent altérées. Comme nous l'avons vu tout au long de ce manuscrit, les hépatocytes en culture primaires (PHH) qui représentent le « gold standard » sont également d'une grande utilité pour générer des données prédictives. Les PHH cultivés en monocouche présentent cependant une diminution rapide de l'activité des CYP et une sensibilité altérée pour l'insuline (Davidson *et al.*, 2016) probablement liée à une forte diminution de l'expression de HNF4 $\alpha$  (Godoy *et al.*, 2016). L'instabilité de la monoculture réduit la durée de l'expérimentation et complique l'étude des longs processus impliqués dans la pathogénèse de la NASH. Les cellules étoilées du foie (HSCs) et les cellules de Kupffer sont également importantes pour étudier la NASH. Les HSCs peuvent par exemple se différencier en cellules myofibroblastiques et sécréter des facteurs (ex : cytokines pro-inflammatoires et synthèse excessive de collagène conduisant à la fibrose) qui affectent négativement les fonctions hépatiques (Puche *et al.*, 2013) telles que le métabolisme des médicaments (Friedman, 2008). La co-culture de cellules non parenchymateuses avec des cellules hépatiques peut ainsi être utilisée pour imiter de manière plus réaliste l'environnement hépatique humain.

L'acide oléique (insaturé) et l'acide palmitique (saturé) sont les deux acides gras les plus utilisés pour induire une accumulation intracellulaire de lipides. En utilisant des hépatocytes ou des lignées cellulaires traités avec différents ratios de ces deux acides gras, il a été observé que l'acide palmitique était plus toxique et nocif que l'acide oléique mais que tous deux

pouvaient contribuer à la formation de gouttelettes lipidiques (Gómez-Lechón *et al.*, 2007; Chavez-Tapia *et al.*, 2012; Moravcová *et al.*, 2015).

Plus récemment, des tissus hépatiques imprimés en 3D (Organovo) à partir de PHHs, d'HSCs et de cellules endothéliales ont été utilisés pour récapituler la fibrogénèse induite par des agents toxiques. Un état de fibrose a pu être observé sur les tissus bio-printés après exposition à du TGF- $\beta$ 1 et à des médicaments connus pour entraîner des lésions hépatiques (Norona *et al.*, 2016). Organovo a pour ambition de proposer ce modèle aux services de toxicologie pour détecter les candidats médicaments susceptibles d'induire ou d'aggraver la stéatose hépatique. D'autre part, cette technologie a été évaluée en interne comme outil de découverte de molécules anti-NASH mais les objectifs fixés n'ont pas été atteints. Bien que prometteur, ce modèle ne semble pas encore assez robuste pour supporter efficacement les programmes de recherche ou de développement.

La culture sous flux est également envisagée pour améliorer les modèles de stéatose. En 2016, Feaver *et al.* ont établi un modèle dynamique de NASH en co-cultivant des PHHs, des HSCs et des macrophages dans le système fluide « Hemoshear ». Les auteurs ont exposé le système avec diverses concentrations d'insuline, de glucose et d'acide gras (acides palmitique et oléique) et ont ensuite procédé à des analyses transcriptomiques et lipidomiques. Les résultats ont révélé une forte similitude avec l'analyse d'échantillons provenant de patients atteints de NASH. Les investigations ont continué avec l'exposition des cellules à deux composés testés actuellement en phase clinique : l'acide obeticholique (OCA) et l'Elafibranor. Ces deux molécules ont permis de réduire la concentration de lipides intracellulaire dans le système et de retrouver un profil lipidomique plus équilibré (Feaver *et al.*, 2016). A la suite de cette étude, le laboratoire pharmaceutique Takeda a signé en octobre 2017 un contrat d'exclusivité avec Hemoshear pour utiliser cette plateforme et identifier de nouvelles cibles contre la NASH et d'autres maladies hépatiques. Une étude similaire a été menée par Kostrzewski sur un système de perfusion concurrent distribué par CnBio sous le nom de « Liverchip » (Kostrzewski *et al.*, 2017). Dans cette étude, les hépatocytes en monoculture étaient cultivés en 3D (utilisation d'un scaffold support) et la stéatose a été induite par l'acide palmitique et l'acide oléique. Le traitement des cellules avec de la Metformine et de la Pioglitazone usuellement utilisés pour le traitement du diabète de type 2 a permis de réduire la consommation d'acide gras dans le milieu de culture et de diminuer l'accumulation de

lipides dans les hépatocytes. Ces systèmes fluidiques et 3D sont très prometteurs mais leur utilisation doit encore être simplifiée et optimisée avant de pouvoir les utiliser en routine dans les services de R&D. Ils sont régulièrement évalués par les laboratoires pharmaceutiques et l'avis des testeurs participe à leur évolution.

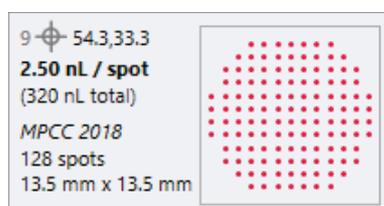
En attendant de rendre ces systèmes plus accessibles, les co-cultures microorganisées (MPCCs) semblent être un modèle attractif. Khetani qui est l'un des inventeurs du modèle Hepatopac™ a récemment dirigé deux études en lien avec la stéatose. La première a montré que la sensibilité à l'insuline en rapport avec le métabolisme glucidique était conservée durant plusieurs semaines dans le modèle MPCC original (hépatocytes + 3T3-J2). Ils ont en revanche démontré que la culture de ces cellules dans un milieu hyperglycémique entraînait une accumulation intracellulaire importante de lipides et une sensibilité réduite vis-à-vis de l'insuline par rapport à un milieu contrôle normoglycémique (Davidson *et al.*, 2016). En 2017, cette même équipe a rajouté des cellules étoilées du foie (HSCs) activées dans le modèle MPCC pour former une tri-culture (PHHs + 3T3-J2 + HSCs). Ils ont alors démontré que la présence de HSCs entraînait une réduction significative des canalicules biliaires et une accumulation de lipides dans les hépatocytes. Le traitement par l'acide obéticholique (OCA) dans leur modèle de tri-culture a permis une récupération partielle des canalicules biliaires et une réduction de la stéatose (Davidson *et al.*, 2017).

Dans notre précédente étude, nous avons développé une approche permettant de produire facilement des co-cultures micro organisées. Les cellules 3T3-J2 et les cellules souches mésenchymateuses de souris (mMSC) que nous avons co-cultivées avec des îlots d'hépatocytes semblent toutes deux pouvoir stabiliser ce modèle hépatique. A l'occasion de ces travaux, nous avonsensemencé quelques puits avec des MSC humaines dérivées du tissu adipeux et avons remarqué l'apparition de vésicules s'apparentant à des gouttelettes lipidiques. Ainsi, dans cette dernière étude, nous allons nous focaliser plus longuement sur la co-culture MPCC d'hépatocytes + MSC humaines et initier des tests de caractérisation. La morphologie des co-cultures, la sécrétion d'albumine et l'activité CYP3A4/-2D6 des hépatocytes cultivés avec des MSC humaines vont être comparées aux données précédentes (3T3-J2 et mMSC). La composition des gouttelettes a ensuite été investiguée pour explorer un éventuel lien avec la stéatose.

## 2. Matériels et Méthodes

**Cellules souches mésenchymateuses humaines.** Deux types de MSC humaines ont été testés. Les hépatocytes ont été co-cultivés soit avec des MSC dérivées de la moelle osseuse que l'on surnommait **BM-MSC** (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) soit avec des MSC dérivées du tissu adipeux surnommées **hASC** (Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells). Les cellules BM-MSC (lot #102, cat. HMSC.BM-500) et hASC (lot #106, cat. HMSC.AD-500) provenaient de Cellular Engineering Technologies (CET, Inc). Le protocole d'amplification et le milieu de culture utilisés sont identiques à ceux utilisés pour les mMSC dans l'étude précédente. Brièvement, le milieu de base (cat. HMSC.E.Media-450) a été complété avec du FBS et de la Penicilline/Streptomycine puis utilisé pour amplifier les deux types de MSC humaines jusqu'à leur mise en co-culture. Le passage des cellules a été réalisé à l'aide de trypsine EDTA 1X dans des flasques ou boîtes de pétri (traitées culture cellulaire)ensemencées avec 3000 cellules/cm<sup>2</sup>. Lors de la mise en co-culture les BM-MSC et les hASC étaient à 5 passages.

**Fabrication des co-cultures microorganisées.** Le spotting a été réalisé selon les conditions optimisées dans l'étude précédente. Pour résumer, 25µL de tampon de spotting composé de 100µg/mL de collagène de type 1 + 0.3% de Tween 20 (dans H<sub>2</sub>O stérile) ont été déposés dans la cassette de distribution HP T8<sup>+</sup>. Cette solution a ensuite été distribuée par le robot D300e sous forme de nanogouttes (2.5 nL/spot) afin de former 128 îlots de collagène sur des coverslips en verre de 15mm. Le motif de collagène distribué sur les coverslips était le même que précédemment :



Après spotting, les coverslips ont été transférés dans des plaques 24-puits à l'aide de pinces stériles puis incubés à 37°C pendant 2h. Elles ont ensuite été stockées à 4°C jusqu'à utilisation. Le jour de la décongélation des hépatocytes, les puits ont été incubés avec 500µL d'éthanol à 70° pendant 30 min puis rincés à l'eau stérile afin de prévenir le risque de contamination.

Le protocole d'ensemencement et les lots d'hépatocytes utilisés (#4122C et #4020) sont les mêmes que dans l'étude précédente. Ainsi 350 000 hépatocytes ont été ensemencés sur chaque coverslip (Jour 0) dans du milieu d'ensemencement. Après une période d'attachement de 5h, les puits ont été rincés puis incubés toute la nuit avec 400  $\mu$ L de milieu « overnight ». Au matin (Jour 1), les puits ont été rincés puis incubés avec 200  $\mu$ L de « milieu de maintenance » en attendant l'ajout des cellules partenaires. En parallèle, les flasques contenant les MSC humaines amplifiées ont été trypsinées et les BM-MSC et les hASC récupérées dans du milieu d'ensemencement. Après rinçage et numération, 200 $\mu$ L d'une suspension contenant 90 000 cellules (BM-MSC ou hASC) ont été ajoutés dans les puits contenant les îlots d'hépatocytes. Les co-cultures micro organisées (PHHs + BM-MSC ou PHHs + hASC) ont ensuite été entretenues par un renouvellement du « milieu de maintenance » tous les Lundi, Mercredi et Vendredi (400  $\mu$ L/puits). La composition de tous les milieux de culture est décrite dans l'étude précédente.

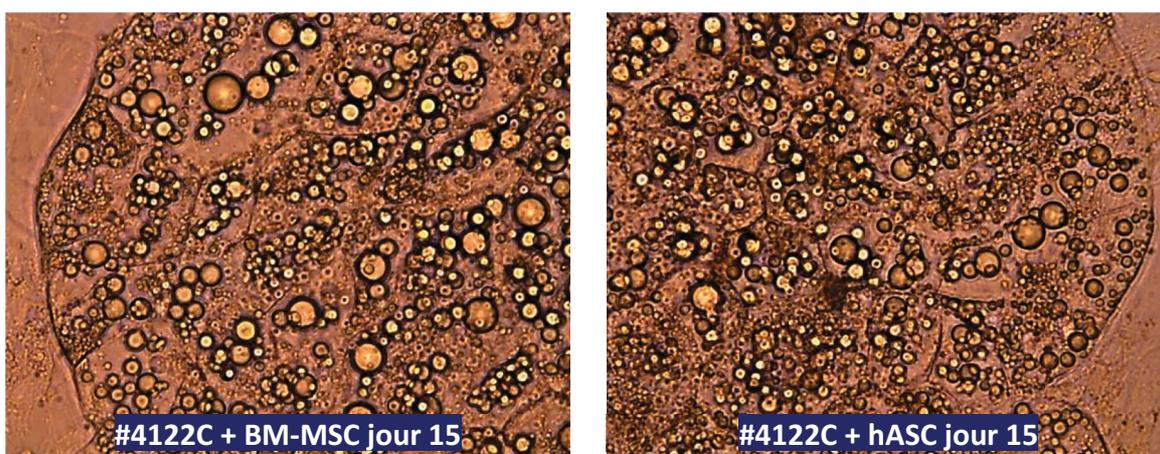
**Immunomarquage.** Les coverslips ont été fixés au jour 18 puis soumis au protocole d'immunomarquage décrit dans l'étude précédente. La protéine MRP2 (1/100 ; anticorps monoclonal de souris, M2-III-6, Santa Cruz) a été ciblée ainsi que les lipides neutres (triglycérides, esters de cholestérols) marqués par le Bodipy 493/503 qui permet de marquer les lipides neutres (1/1000, Invitrogen™).

**Mesure de l'activité des CYP et dosage de l'albumine.** Ces mesures ont été réalisées en parallèle de l'étude précédente et en suivant les mêmes protocoles. Se référer aux travaux précédents pour les détails.

**Dosage des triglycérides (TG).** Après rinçage des puits au PBS, 100 $\mu$ L de solution NP-40 à 5% ont été ajoutés sur les coverslips pour faciliter l'extraction des lipides. Après dilution des lysats au 1/50<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée, le kit colorimétrique/fluorimétrique Biovision (cat. K622-100) a été utilisé pour la quantification des triglycérides. Trente microlitres d'échantillons ou d'étalons ont été ajoutés dans une plaque 96-puits noire et le protocole recommandé dans le kit a été suivi. Après une incubation finale de 1h, la fluorescence des plaques a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre Varioskan (Thermo Fisher) configuré sur le spectre Excitation/Emission de 535/590 nm. Le bruit de fond mesuré à l'aide de « blanc » a été soustrait de tous les échantillons et la concentration de TG a été estimée en utilisant la courbe standard linéaire.

### 3. Résultats

**Morphologie des îlots au cours du temps.** Les photos des îlots capturées aux jours 4, 11 et 15 sont compilées dans les deux prochaines pages. Après 4 jours de culture, les îlots cultivés avec des BM-MSC ou des hASC ne présentaient pas ou très peu de vésicules. Une large quantité de gouttelettes est apparue entre le 8<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour de culture. Au jour 11, les gouttelettes étaient encore cantonnées à certains hépatocytes mais ont très vite été observées sur la quasi-totalité des hépatocytes dans les jours qui ont suivi. Ainsi, les photos enregistrées au jour 15 montrent que tous les îlots d'hépatocytes co-cultivés avec les MSC humaines présentaient des gouttelettes (Figures 51 et 52). Ceci confirme ce qui avait été observé avec un autre lot de hASC lors de l'étude précédente. De plus, cette accumulation de gouttelettes est observée sur les deux lots d'hépatocytes (#4020 et #4122C) et quelle que soit la provenance des MSC humaines, originaires de la moelle osseuse (BM-MSC) ou du tissu adipeux (hASC). Les photos ci-dessous représentent un zoom au grossissement x400 sur les gouttelettes :



Les figures 51 et 52 et la densité de gouttelettes associée peuvent être comparées aux îlots ci-dessous cultivés avec des 3T3-J2 ou des MSC de souris:



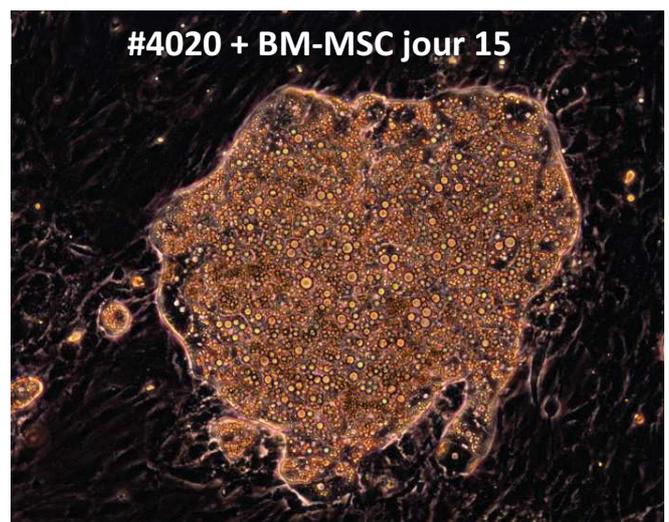
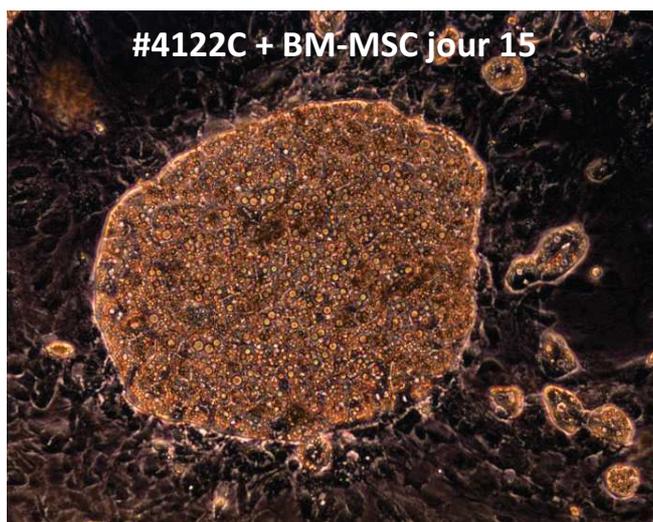
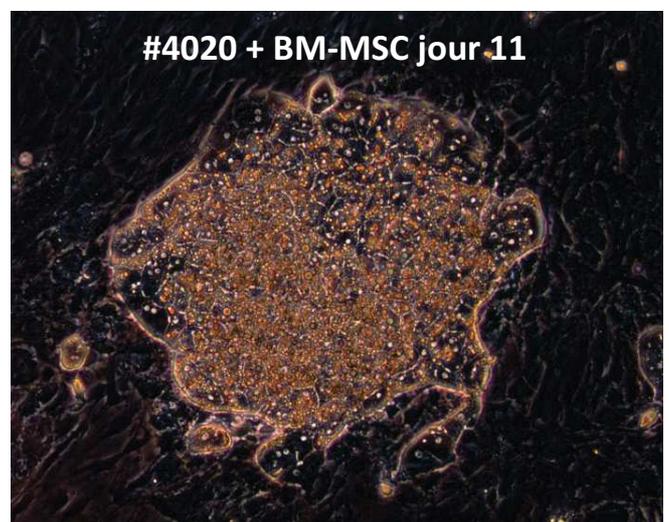
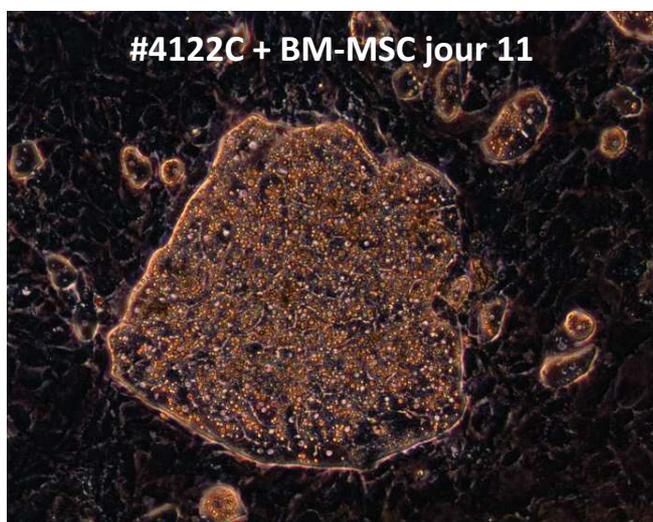
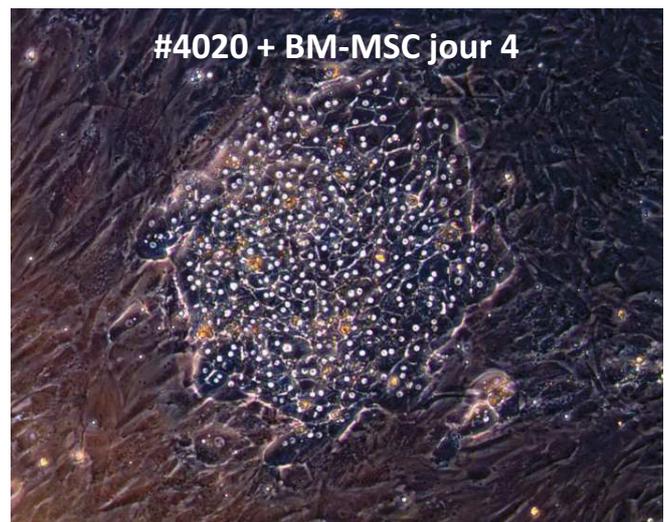
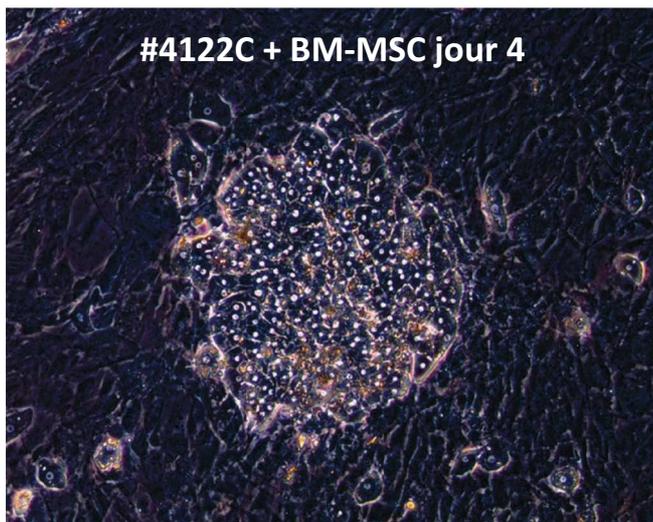


Figure 51 : Suivi morphologique des îlots d'hépatocytes cultivés avec des cellules souches mésenchymateuses humaines de la moelle osseuse (BM-MSC)

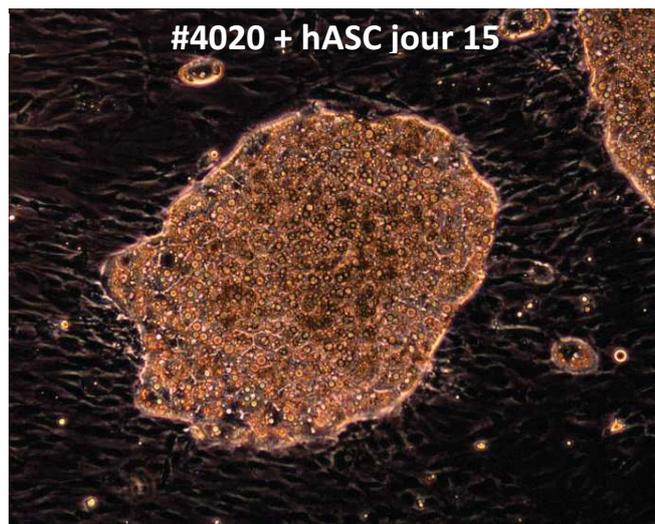
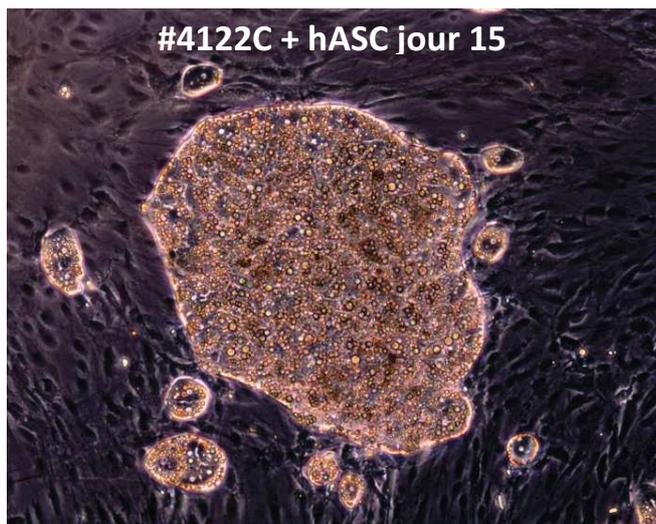
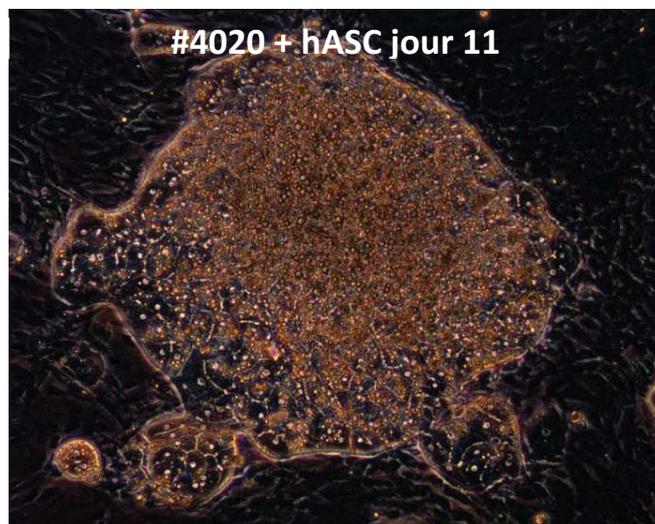
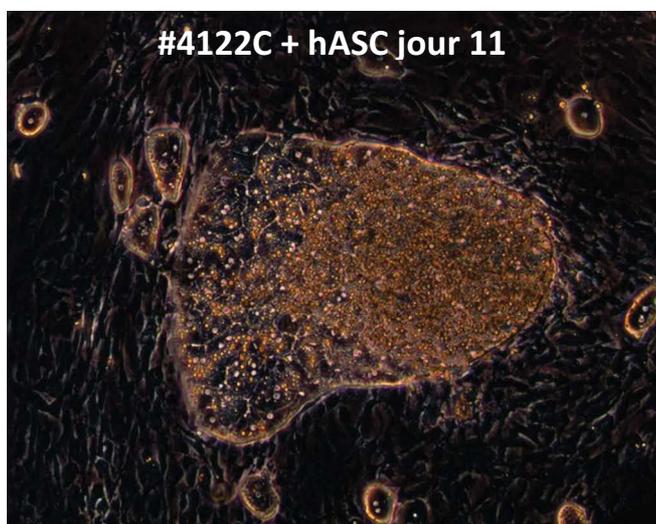
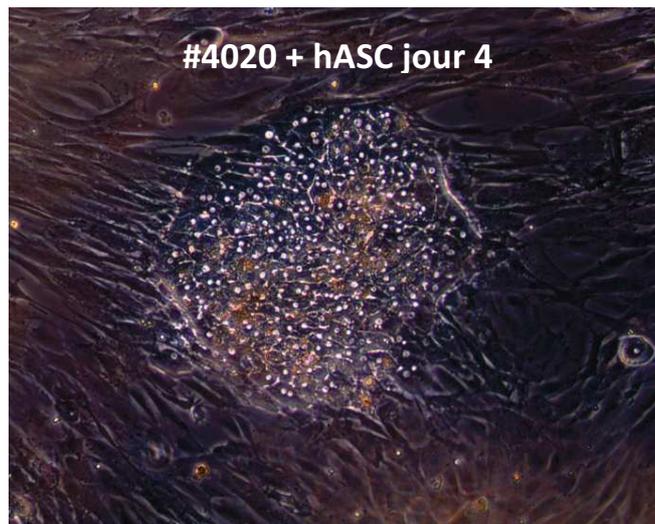
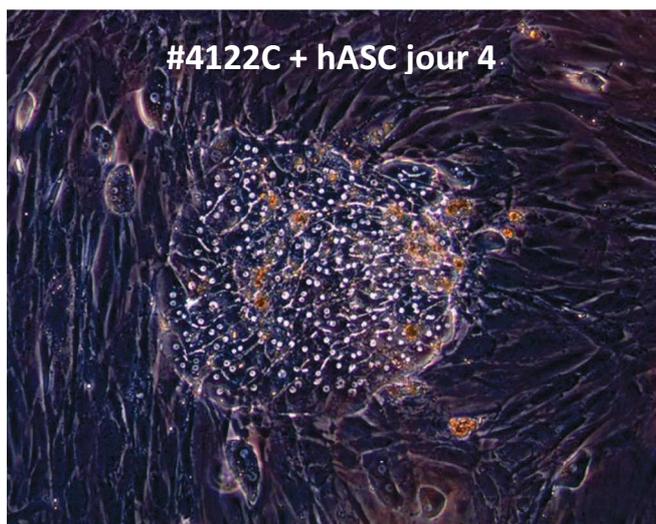


Figure 52 : Suivi morphologique des îlots d'hépatocytes cultivés avec des cellules souches mésenchymateuses humaines dérivées du tissu adipeux (hASC)

**Activités des CYP3A4 et CYP2D6.** Au jour 4, l'activité du CYP3A4 mesurée en présence de MSC humaines est plus faible que sur les cocultures 3T3-J2 et MSC de souris sur les deux lots d'hépatocytes testés (Figure 53). L'activité du CYP3A4 augmente ensuite au cours de la culture et atteint un niveau comparable aux co-cultures avec les 3T3 et les mMSC aux jours 11 et 20. Les hépatocytes cultivés avec les hASC semblent nécessiter plus de temps pour atteindre une activité 3A4 maximale. A l'exception du lot #4020 cultivé avec les hASC, l'activité du CYP2D6 semble être établie et stabilisée dès le jour 4. De plus, cette activité semble aussi importante que celles des MPCC cultivées avec les 3T3 et les mMSC. Il sera nécessaire de générer plus de réplicats afin de conclure mais ces résultats laissent à penser que l'activité ne semble pas diminuer en présence de gouttelettes.

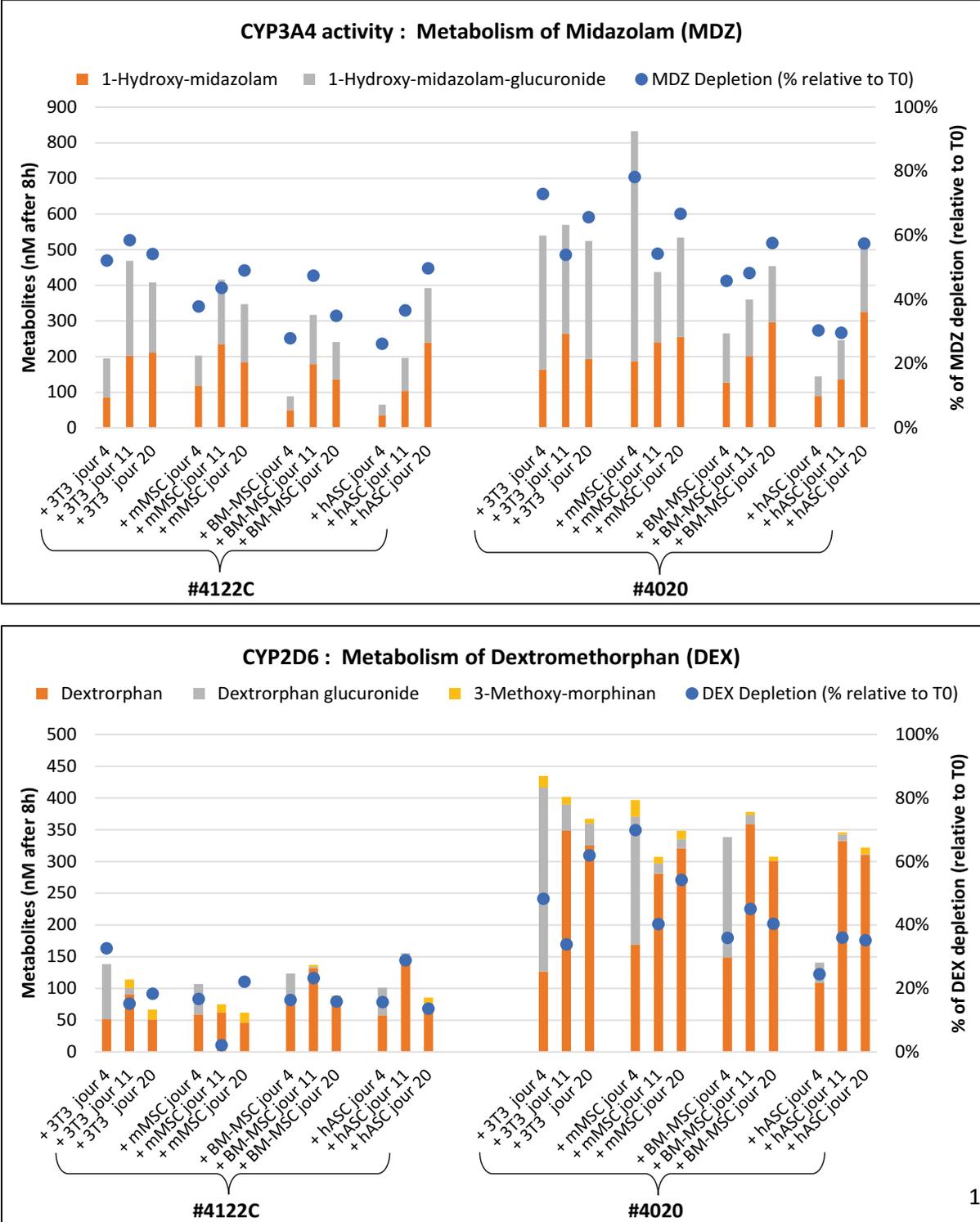


Figure 53 : Activités des CYP3A4 et 2D6 mesurées sur 4 types de cocultures MPCC Activités des CYP3A4 et CYP2D6 mesurées sur 4 types de co-cultures MPCC sur les lots 4020 et 4122C

**Sécrétion d'albumine.** La sécrétion d'albumine a été mesurée sur le lot 4122C cultivé avec les MSC humaines (hASC et BM-ASC) et comparée aux données obtenues sur MPCCs + mMSC de souris. La figure 54 montre que la synthèse d'albumine est moins importante sur les hépatocytes cultivés en présence de MSC humaines. La sécrétion moyenne d'albumine en présence de MSC de souris était d'environ 43 ng/h/puits et a été diminuée à 27 ng/h/puits lorsque les hASC ont été utilisées. La production d'albumine est encore plus faible avec les BM-ASC ( $\approx 18$  ng/h/puits).

La production est en revanche stable sur un minimum de 3 semaines et cela, dans toutes les co-cultures. La sécrétion d'albumine ne semble pas être perturbée par l'apparition de gouttelettes entre les jours 6 et 11.

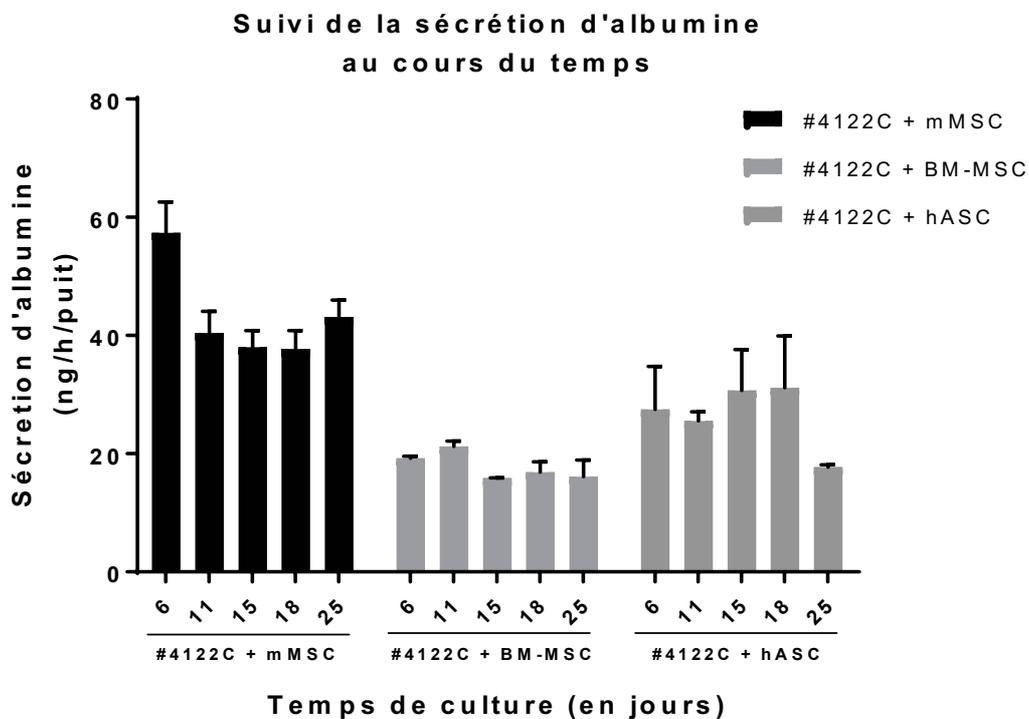


Figure 54 : Suivi de la sécrétion d'albumine sur des MPCC cultivées avec des MSC de souris (mMSC) versus humaines (BM-ASC et hASC)

**Immunofluorescence.** Les immunomarquages présentés à la page suivante ont permis de révéler la présence de lipides neutres (Bodipy, en vert) et de localiser la protéine MRP2 (en rouge). La différence entre les « MPCCs + MSC de souris » et les « MPCCs + MSC humaines » est frappante : les îlots entourés de BM-ASC ou de hASC sont remplis de lipides neutres tandis

que les hépatocytes cultivés avec les MSC de souris en contiennent beaucoup moins. La localisation du signal confirme la présence de gouttelettes lipidiques intracellulaires (Figure 55). La polarisation des hépatocytes est confirmée par l'expression de MRP2 le long des canalicules biliaires. Au 18<sup>ème</sup> jour de culture, le réseau de canalicules est bien établi et est remarquablement dense sur toutes les co-cultures. La présence de gouttelettes ne semble pas impacter le réseau des canalicules biliaires :

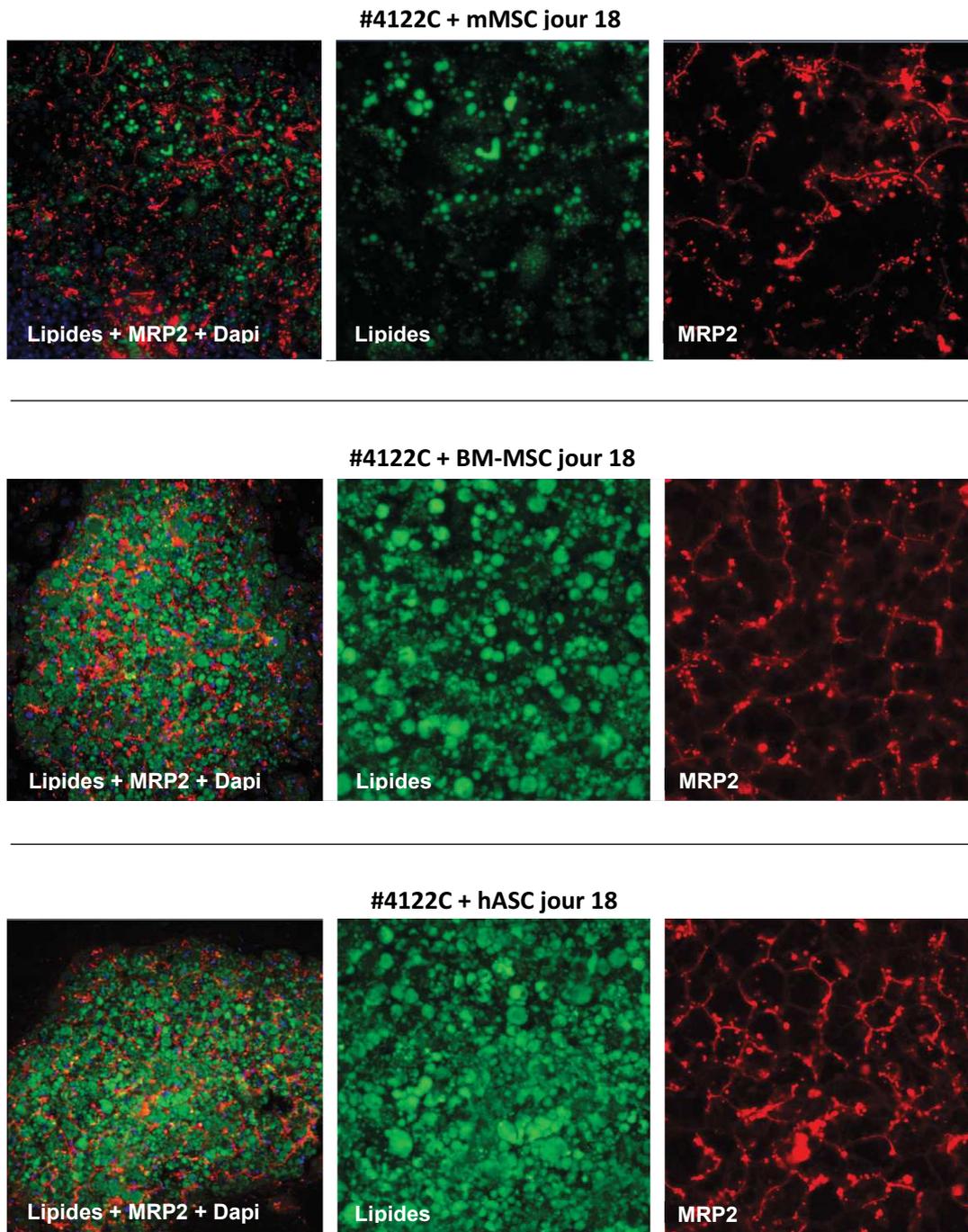


Figure 55 : Marquage de la protéine MRP2 et des lipides neutres sur les MPCCs cultivés avec des MSC humaines ou de souris. Capture à l'objectif 20x (à gauche) et zoom numérique (au milieu et à droite)

**Dosage des triglycérides.** Le dosage devait initialement porter sur les co-cultures aux jours 4, 11, 15 et 20 afin de suivre la cinétique d'apparition de gouttelettes. Malheureusement, à la suite d'un problème technique lors de l'extraction des lipides, seuls les échantillons de la co-culture stoppée au jour 20 ont pu être dosés (sans réplicats). Les résultats de la quantification intracellulaire des triglycérides sont présentés sur la figure 56 : la concentration en triglycérides est au moins deux fois plus importante en présence de MSC humaines. La quantité mesurée sur les hépatocytes #4122C cultivés avec les BM-MSc et les hASC était respectivement de 110 et 127 nmol/puits contre seulement 41 et 30 nmol/puits lorsque ce même lot a été cultivé avec les 3T3-J2 et les MSC de souris. De plus, l'accumulation de triglycérides liée à la présence de MSC humaines est confirmée avec le lot #4020. Pour ce second lot, la concentration en triglycérides dépasse les 200 nmol/puits en présence de BM-MSc et hASC contre 45 et 91 nmol/puits pour les 3T3-J2 et les mMSc. Ces résultats concordent avec le nombre et la taille des gouttelettes ainsi qu'avec le marquage des lipides neutres.

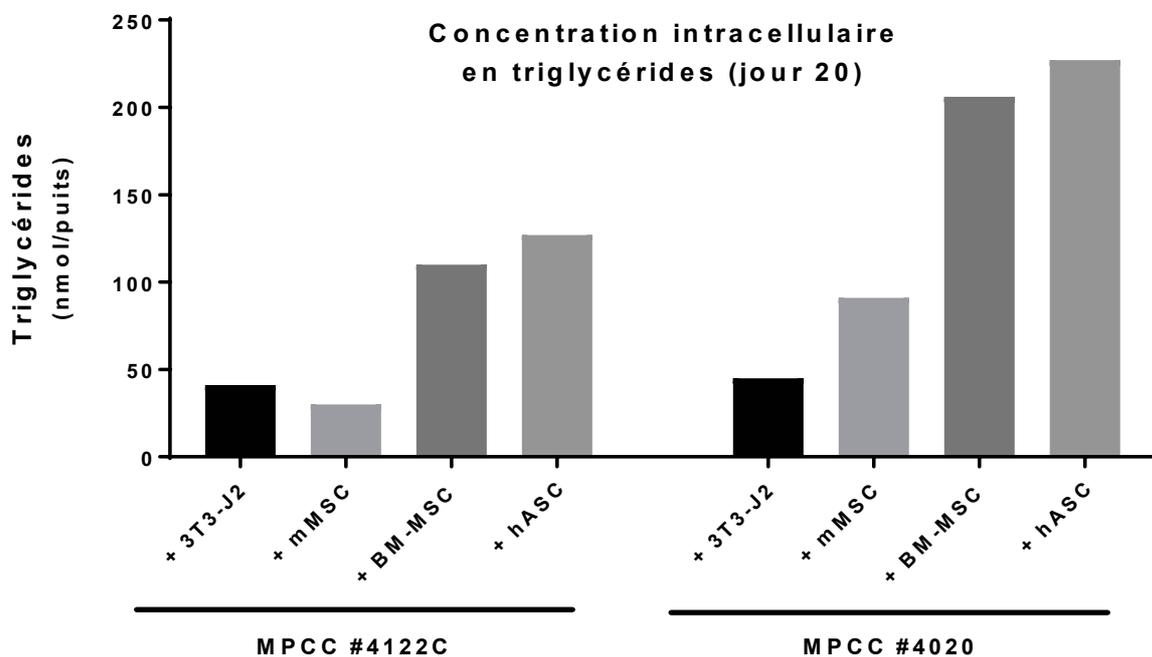


Figure 56 : Concentration intracellulaire en triglycérides mesurée sur les différentes cocultures MPCCs

#### 4. Discussion

Malgré la forte prévalence de la NAFLD, il n'existe actuellement aucun traitement approuvé ni même de consensus clair sur les cibles à viser pour traiter ces maladies hépatiques. Cette latence est en partie causée par le manque de modèles *in vitro* représentatifs de ces pathologies. Pour accélérer la découverte de solutions, les professionnels ont effectivement besoin de systèmes appropriés à l'Homme, faciles à utiliser, accessibles et capables de récapituler les éléments clés de ces maladies stéatosiques. La principale caractéristique de la NAFLD est l'accumulation intra-hépatique de triglycérides (stéatose), qui conduit initialement à un état bénin, mais qui avec des stimuli encore mal connus, peut évoluer vers des états plus avancés de NASH (stéatohépatite non alcoolique) et de fibrose.

L'objectif principal de cette étude était, d'une part, d'analyser la composition des gouttelettes qui apparaissent lors de la co-culture MPCC avec des MSC humaines (hMSC) et d'autre part, de vérifier si cette co-culture était utilisable sur plusieurs semaines. Le marquage au Bodipy a tout d'abord révélé que le cœur des gouttelettes était composé de lipides neutres. L'intensité du signal en fluorescence montre effectivement que la quantité de lipides est nettement supérieure dans les îlots entourés de MSC humaines que dans les hépatocytes entourés de cellules murines. Les dosages des triglycérides réalisés sur des cultures de 3 semaines confirment et concordent parfaitement avec ce qui est observé en fluorescence. Les gouttelettes lipidiques apparaissent entre le 9<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour de culture puis remplissent très rapidement tous les îlots d'hépatocytes.

Contrairement à la plupart des travaux publiés sur les modèles de stéatose, le milieu de culture utilisé dans notre étude n'a pas été chargé en acide palmitique ou en acide oléique pour induire la stéatose. Il faut cependant noter que la solution d'ITS (Corning cat. 354352) utilisée dans la formulation des milieux de culture MPCC contient de l'acide linoléique. Cet acide gras insaturé a peut-être un rôle dans la formation de gouttelettes lipidiques mais la concentration utilisée dans notre étude ( $\approx 20\mu\text{M}$  final) est plus de 10 fois inférieure aux concentrations d'acides oléique et palmitique rapportées dans les publications (200-1000 $\mu\text{M}$ ). De plus, le même milieu de culture a été utilisé pour la culture des « MPCCs + 3T3-J2 » et des « MPCCs + mMSC » sans pour autant entraîner la formation d'une telle quantité de gouttelettes

lipidiques. Ceci suggère un rôle important des MSC humaines dans le processus de formation de gouttelettes lipidiques et ce, indépendamment de la formulation du milieu de culture.

Par manque de temps, les causes et les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces gouttelettes lipidiques n'ont pas pu être investigués dans notre étude. Dans le foie des patients atteints de NASH, les taux d'IL-6 et de la protéine C réactive (CRP) sont augmentés (Yoneda *et al.*, 2007; Wieckowska *et al.*, 2008). De plus, la production de CRP (protéine produite par les hépatocytes lors de la phase aiguë de l'inflammation) semble être augmentée lors d'une élévation du taux d'IL-6 (Schmidt-Arras and Rose-John, 2016). Sur leur modèle de tri-culture micro organisée (PHHs + 3T3-J2 + HSCs activées), Davidson, Kukla et Khetani avaient constaté que les hépatocytes sécrétaient une quantité de CRP et d'IL-6 bien supérieure à ce qui pouvait être mesurée sur le modèle MPCC original (PHHs+ 3T3-J2). Cette sécrétion était « proportionnelle » au nombre de cellules stellaires (HSCs)ensemencées, ce qui suggère que les HSCs contribuent fortement à l'augmentation de la CRP et de l'IL-6 lors de la tri-culture. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que la présence d'HSCs entraînait une diminution de l'activité du CYP3A4 mais que l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IL-6 permettait de retrouver une activité CYP3A4 similaire au modèle MPCC original (Davidson *et al.*, 2017).

Cette analyse du sécrétome est une démarche intéressante qui sera également nécessaire pour clarifier les processus conduisant à l'accumulation de triglycérides dans notre modèle MPCC + MSC humaines. Dans une moindre mesure, les MSC de souris semblent également entraîner la formation de petites gouttelettes lipidiques ce qui sous-entend que l'accumulation de triglycérides n'est pas totalement médiée par des protéines humaines et que de petites molécules peuvent potentiellement être impliquées. La présence de gouttelettes est moindre dans les MPCCs + 3T3-J2 qui pourront ainsi servir de contrôle pour de futures analyses. Si le projet continue après cette thèse, il sera intéressant de confier une analyse protéomique et métabolomique à des spécialistes dans le but de comparer les profils de sécrétions entre les différentes co-cultures micro organisées : « PHHs + 3T3-J2 » vs « PHHs + mMSC » vs « PHHs + BM-MSC » vs « PHHs + hASC ». En s'inspirant du papier de Davidson *et al.*, l'effet paracrine des MSC pourra également être étudié en cultivant ces cellules sur un support type « Transwell » placé dans un puits contenant des MPCC + 3T3-J2. Une autre

solution est de remplacer le milieu de maintenance par du milieu préalablement incubé/conditionné avec des MSC cultivées seules.

Les MSC humaines conduisent à une augmentation de la concentration intracellulaire en lipides mais entraînent également une diminution de la synthèse d'albumine. En comparaison avec les MSC de souris, la vitesse de sécrétion de cette protéine est 2 fois moins importante lorsque les îlots d'hépatocytes sont cultivés avec des MSC humaines. Ceci est observé dès le début de la culture avant même l'apparition de gouttelettes lipidiques et il est ainsi difficile de déterminer les causes de cette baisse de production. Ce phénomène peut par exemple être liée au processus de stéatose (même si imperceptible avant l'apparition des gouttelettes) ou tout simplement au fait que les MSC humaines soient moins intéressantes que les MSC de souris pour supporter la culture des îlots d'hépatocytes. En effet, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, les interactions hétérotypiques entre les cellules parenchymateuses et non parenchymateuses (NPC) sont essentielles à la physiologie et à la physiopathologie hépatique. Dans l'étude précédente nous avons vu que les MSC de souris semblaient tout aussi intéressantes que les 3T3-J2 pour supporter les îlots d'hépatocytes. Les fibroblastes 3T3-J2 participent au maintien des hépatocytes grâce aux interactions hétérotypique et à leur capacité à exprimer diverses molécules présentes dans le foie, comme par exemple, la decorine et la T-cadherine toutes deux connues pour supporter certaines fonctions hépatocytaires (Khetani *et al.*, 2004, 2008).

Les MSC que nous avons testées dans cette étude et la précédente n'ont pas été choisies par hasard. Ces cellules sont en effet connues pour leurs effets bénéfiques sur les hépatocytes tant au niveau *in vivo* que *in vitro*. Les encadrants Inserm de cette thèse ont par exemple participé à la mise au point d'un patch composé d'une membrane amniotique humaine recouverte de MSC de souris qui améliore la régénération hépatique et la survie de souris après une hépatectomie de 80% (Despeyroux *et al.*, 2018). De nombreuses publications démontrent que les fonctions hépatiques sont supportées par l'effet paracrine des cellules souches mésenchymateuses ainsi que par le contact cellule-cellule entre les MSC et les hépatocytes. Les MSC sont capables de produire des cytokines importantes dans l'hématopoïèse qui interviennent également dans la prolifération et la différenciation des hépatocytes. Les BM-MSc sécrètent par exemple de l'HGF (Hepatocyte growth factor), un mitogène puissant des cellules parenchymateuses capable d'induire la maturation des

hépatocytes en agissant de manière synergique avec d'autres facteurs (Zarnegar and Michalopoulos, 1995; Takai *et al.*, 1997; Kamiya *et al.*, 2001; Gómez-Aristizábal *et al.*, 2009). Ces cellules synthétisent également du TNF- $\alpha$  qui stimule la sécrétion d'IL-6 par les cellules hépatiques non parenchymateuses. Les BM-MSc produisent aussi du collagène type-I, de la laminine et de la fibronectine qui constituent la matrice extracellulaire et qui sont utilisées pour prolonger la culture d'hépatocytes en monocouche via la méthode « sandwich » (Mizuguchi *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2009). Les possibles mécanismes par lesquels les MSC supportent les hépatocytes sont résumés dans la figure suivante :

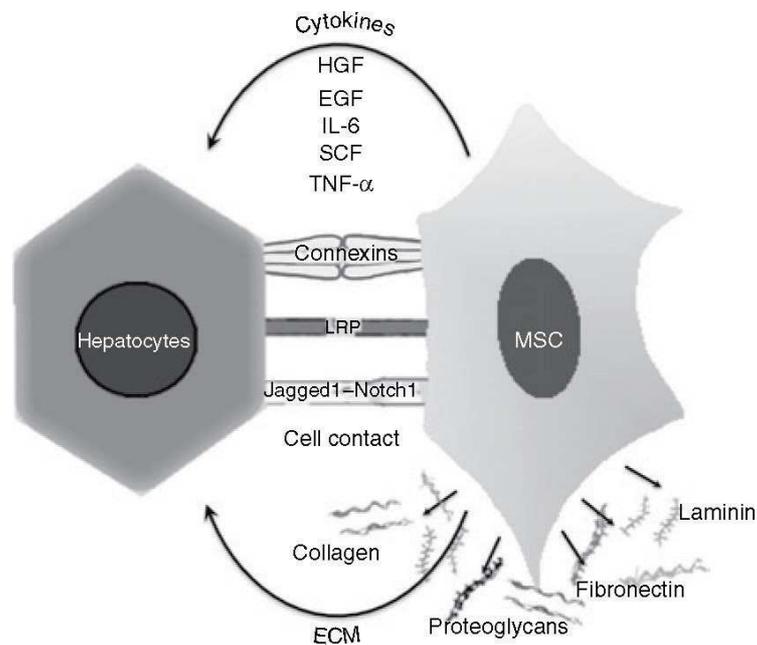


Figure 57 : Effets bénéfiques des MSC sur les hépatocytes et mécanismes potentiellement impliqués dans la symbiose source : Gómez-Aristizábal *et al.*, 2009

Bien que la production soit diminuée par rapport aux cellules murines, la sécrétion d'albumine synthétisée par les hépatocytes entourés de MSC humaines (BM-MSc ou hASC) est restée remarquablement stable sur plus de 3 semaines. Nos résultats montrent également que les activités des CYP3A4 et CYP2D6 mettent plus de temps à s'établir en présence de MSC humaines et évoluent tout au long de la culture. Les activités métaboliques mesurées au 20<sup>ème</sup> jour de culture sont très proches entre les différentes co-cultures. L'apparition des gouttelettes lipidiques au cours de la culture ne semble pas impacter la synthèse d'albumine ou l'activité des CYPs, ni même la formation de canalicules biliaires. Le réseau MRP2 est en effet resté très dense jusqu'aux derniers jours de l'expérimentation ce qui diffère des observations faites par Davidson *et al.* sur leur modèle de tri-culture (Davidson *et al.*, 2017).

## 5. Conclusion

Nous n'avons pas terminé la caractérisation de cette co-culture au moment de l'écriture de ce manuscrit mais nous espérons que les travaux en cours confirmeront rapidement l'intérêt de ce modèle pour l'étude des maladies stéatosiques. La compilation des différentes données générées au cours de cette étude montre que notre modèle MPCC utilisant des MSC humaines est utilisable sur une période minimum de 3 semaines. Avec cette co-culture, les hépatocytes accumulent une grande quantité de triglycérides dans des gouttelettes lipidiques. De plus, notre méthode de spotting a confirmé son intérêt pour inventer et explorer efficacement de nouvelles applications en lien avec la co-culture micro organisée.

Il reste néanmoins beaucoup de paramètres à explorer. Des solutions doivent encore être imaginées pour distinguer les ARN des différentes populations et faciliter l'interprétation des analyses mRNA. L'irradiation ou le traitement par la mitomycine pourra aussi nous aider à bloquer la prolifération des cellules partenaires (mMSC, 3T3-J2, BM-MSC, hASC) dans le but d'augmenter la stabilité de la coculture. Pour se rapprocher des conditions physiopathologiques de la NASH, il est également possible d'inclure d'autres cellules (Stellaires et Kupffer par exemple) dans le but de mimer l'environnement inflammatoire de cette pathologie.

Le format MPCC pourrait s'avérer très intéressant pour la recherche de nouvelles cibles et la sélection de candidats médicament anti-NASH. Si le lien avec la stéatose est établi, le screening de candidats pourra par exemple être réalisé en deux phases : la première consistera à attendre l'apparition de gouttelettes ( $\approx 12$  jours) et la seconde au traitement des hépatocytes par les molécules à tester. Nous pouvons imaginer des « readout » relativement simples à mesurer tels que la teneur en gouttelettes lipidiques ou la concentration intracellulaire en triglycérides.

Enfin, face à la prévalence de la NASH qui ne cesse d'augmenter, il devient urgent de développer des méthodes de diagnostic robustes et non invasives. L'analyse histologique citée en référence nécessite une biopsie hépatique qui est souvent réalisée à un stade avancé de la maladie. L'identification de biomarqueurs spécifiques de la NASH et capables d'être détectés par un simple test sanguin serait une grande avancée pour les patients et les médecins (Verhaegh *et al.*, 2018). S'ils confirment leur prédictivité pour la stéatose, les MPCCs

permettront de se focaliser sur certains aspects physiopathologiques aidant ainsi les chercheurs à identifier des biomarqueurs dont le taux évolue spécifiquement avec la maladie. L'utilisation de biomarqueurs est un réel atout pour sélectionner les patients à intégrer dans les phases cliniques et évaluer l'efficacité du candidat médicament. Disposer d'un biomarqueur capable d'identifier les patients qui répondront positivement au traitement augmente les chances de réussite pour l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM).

### III. Discussion et conclusions générales

Les travaux menés dans le cadre de ce projet de thèse nous ont permis d'étoffer nos connaissances sur les modèles *in vitro* et les méthodes d'extrapolation usuels mais aussi de découvrir et de développer de nouvelles stratégies de prédiction. L'objectif général était d'améliorer la prédiction de la clairance métabolique en se concentrant notamment sur les molécules faiblement métabolisées encore difficiles à étudier.

Les laboratoires pharmaceutiques sont assez unanimes sur la définition du profil pharmacocinétique que doit avoir un « bon » candidat médicament. Par exemple, la molécule ne doit pas être trop sensible à l'effet de premier passage hépatique mais doit être suffisamment soluble pour espérer être administrée aisément (par voie orale préférentiellement) et atteindre une biodisponibilité adéquate. De plus, pour réduire le risque d'interactions médicamenteuses, un candidat médicament doit idéalement être métabolisé par plusieurs CYP450 et être si possible éliminé par plusieurs voies (hépatique, rénale et biliaire). Enfin, il faut également éviter les métabolites réactifs potentiellement toxiques et les molécules susceptibles d'inhiber ou d'induire trop fortement les transporteurs ou les enzymes du métabolisme. Les entreprises pharmaceutiques ont appris des erreurs passées et sont donc vigilantes à respecter un maximum de ces critères. Pour maximiser la réussite des projets, des modèles hépatiques sont utilisés tout au long du processus de R&D : dès le début du projet pour prédire le profils pharmacocinétiques des nouvelles entités chimiques jusqu'aux phases de développement pour supporter le design des études cliniques.

Dans ce manuscrit nous avons vu que trois modèles sont largement utilisés par les entreprises pharmaceutiques. Il s'agit des microsomes, des hépatocytes en suspension et des hépatocytes en monocouche. Ce constat est facilement dressé au cours de congrès et de rencontres scientifiques mais aussi en parcourant la littérature où l'on peut remarquer que ces modèles sont utilisés depuis plus de 30 ans par ces compagnies (D Zhang *et al.*, 2012; Godoy *et al.*, 2013; Bale *et al.*, 2014). En pratique, l'utilisation de ces modèles par les big pharma n'a guère évolué alors que paradoxalement la recherche liée aux modèles hépatiques est très active et des centaines d'articles sont publiés chaque année. L'industrie pharmaceutique collabore pourtant activement avec les académiques et les autres acteurs de l'innovation pour améliorer les modèles. Les différents travaux menés dans ce manuscrit soulèvent des pistes de réflexion permettant de comprendre pourquoi ces innovations ont du mal à être pleinement utilisées par les laboratoires pharmaceutiques. Par rapport aux modèles de routine, les nouveaux systèmes 3D et/ou fluidiques démontrent pourtant une nette supériorité pour supporter les fonctions hépatocytaires. En contrepartie, ces systèmes sont cependant plus difficiles à utiliser et surtout plus complexes sur le plan matériel (hydrogels, polymères, encapsulation, scaffolds, pompes...). Le fait qu'ils soient utilisés sur plusieurs semaines augmente par exemple le risque de contamination et demande une maintenance parfois lourde. De plus, le risque de « fixation non spécifique » des nouvelles entités chimiques est largement augmenté sur ces systèmes plus sophistiqués (ex : sur les tubes en silicone, le PDMS, les matrices...). S'ils ne sont pas corrigés, ces problèmes « annexes » peuvent impacter négativement les prédictions et gêner le bénéfice apporté par la 3D et la culture en flux (Bachmann *et al.*, 2015; Vivares *et al.*, 2015). Face aux remarques des utilisateurs, des efforts très importants ont été réalisés pour réduire les biais et les inconvénients. Les nouveaux systèmes commercialisés sont ainsi très prometteurs et de plus en plus robustes.

En attendant de valider ces nouveaux systèmes, les modèles de routine continuent donc d'être utilisés. Nous avons évalué leur prédictivité et avons vu que les performances étaient suffisantes pour sélectionner efficacement les candidats médicaments présentant un profil pharmacocinétique prometteur. Ils sont simples à utiliser, leur coût est maîtrisé et leur format est particulièrement adapté au screening de masse. Après les phases de recherche, les designs expérimentaux deviennent plus précis et les hépatocytes en suspension ou monocouche peuvent alors être utilisés pour prédire la clairance avec plus de précision. Alors que le modèle

en monocouche a longtemps été favorisé, nos résultats montrent que les hépatocytes en suspension peuvent maintenant surpasser les performances de prédiction des hépatocytes adhérents. Ce gain de performance peut sans doute être attribué à la mise à disposition récente de pool d'hépatocytes cryopréservés. Dans notre étude nous avons par exemple utilisé un pool de 50 donneurs en suspension alors que 4 donneurs individuels ont été testés en monocouche. Les efforts réalisés dans le domaine de la cryopréservation participent donc à améliorer les prédictions en nous permettant de prendre plus facilement en compte la forte variabilité interindividuelle en lien avec la clairance.

Les modèles de routine actuels ne sont en revanche pas adaptés aux molécules à faible clairance car leur durée d'utilisation est trop courte pour pouvoir observer la déplétion de molécules très stables. Compte tenu de la stratégie de sélection, le nombre de molécules faiblement métabolisées continue d'augmenter et la nécessité de valider un modèle adéquat se faisait de plus en plus ressentir. Nous avons ainsi testé le modèle Hepatopac™ et démontré son efficacité pour prédire la clairance d'une grande variété de molécules. Ce modèle de co-culture microorganisée (MPCC) se manipule aussi simplement que les hépatocytes en monocouche tout en permettant de maintenir les fonctions hépatocytaires suffisamment longtemps pour conduire de longues incubations. Le format 96-puits que nous avons utilisé est adapté à une grande majorité de molécules mais en raison du très faible nombre d'hépatocytes par puits ( $\approx 3200$  PHHs) il faudra préférer le format 24-puits ( $\approx 20\ 000$  PHHs) pour étudier les clairances très faibles. En effet, ceci fait partie des inconvénients de la co-culture : les cellules partenaires occupent de la surface et il reste moins de place pour les cellules hépatiques. Il faut également rester vigilant sur la capacité des fibroblastes 3T3-J2 à métaboliser et dégrader le composé d'intérêt. Des puits « contrôles » contenant uniquement les cellules partenaires doivent être utilisés en parallèle pour garantir que seuls les hépatocytes sont responsables de la déplétion de la molécule testée. En revanche, même s'ils ne sont pas nombreux, les hépatocytes cultivés dans le modèle Hepatopac™ synthétisent de l'albumine à une vitesse proche de ce qui peut être observé *in vivo*.

Grâce à cette capacité proche de la physiologie, le modèle Hepatopac™ nous a permis de développer et de publier une méthode d'extrapolation (IVIVE) originale. En se référant à la théorie de « l'uptake facilité par l'albumine » décrite initialement par P. Poulin nous proposons en effet d'adapter et de personnaliser les extrapolations aux capacités de chaque

lot d'hépatocytes. L'albumine est ainsi utilisée comme un marqueur de référence pour corriger le gap entre les modèles *in vitro* et les capacités des hépatocytes *in vivo*. Nous estimons que cette démarche n'est envisageable que sur les modèles dit « stables » et donc capables de maintenir leur fonction hépatique tout au long de l'expérimentation. En raison de leur dédifférenciation rapide, l'approche que nous avons publiée n'est par exemple pas utilisable avec les hépatocytes en monocouche dont les capacités métaboliques sont très différentes entre le début et la fin de l'expérimentation. Nous espérons que nos travaux motiveront d'autres équipes à challenger la méthode Poulin et à investiguer plus profondément la théorie de l'«uptake facilité par l'albumine» qui est encore assez controversée. Au moment de l'écriture de ce mémoire de thèse, notre article publié en Mars 2018 a été cité à 3 reprises. Une première fois dans l'article de Poulin & Haddad, 2018 (J Pharm Sci, 2018) qui compare et discute de deux modèles d'extrapolation basées sur la théorie de l'uptake facilité par l'albumine. Nous sommes également cités dans l'article de Fischer *et al.* (Chem Res Toxicol, 2018) dédié à la cinétique d'uptake et où ils ont remarqué que l'augmentation de la concentration en FBS entraînait une accélération de l'uptake de certains composés. Plus récemment, notre publication a été citée par Leslie Zachary Benet (J Pharm Sci, 2018) qui est un grand professeur de pharmacocinétique et dont les compétences sont largement reconnues à l'international par les experts du domaine. L'article qu'il a co-rédigé avec Bowman est une analyse détaillée sur la théorie de l'«uptake facilité par l'albumine». La publication traite notamment de l'évolution liée à l'utilisation du fup dans les méthodes IVIVE et explore également les mécanismes potentiellement impliqués dans l'«uptake facilité». Les auteurs encouragent aussi les laboratoires à déterminer la fraction libre plasmatique plus précocement ce qui va dans le sens de notre étude dédiée au fup et au Transil<sup>XL</sup> présentée au début de ce mémoire. Grâce à l'influence de L.Z. Benet et au gain de visibilité que leur publication va apporter, de nouveaux chercheurs vont sans doute s'intéresser et explorer la théorie de l'«uptake facilité». Cette hypothèse est appuyée par bon nombre de travaux appliqués (tels que le nôtre) mais nécessite maintenant d'être investiguée sur un plan plus fondamental. Le but étant d'élucider les mécanismes impliqués dans l'interaction entre la cellule, l'albumine et le composé lié afin d'établir la véracité de cette théorie de manière complète. Ces mécanismes pourront par exemple être étudiés via le modèle Hepatopac<sup>TM</sup> ou grâce aux co-cultures microorganisées (MPCCs) que nous sommes maintenant capables de fabriquer en interne.

Les efforts déployés sur les derniers mois de thèse ont effectivement permis de développer une méthode de spotting suffisamment robuste pour produire tous types de MPCCs. En déposant des nanogouttes de collagène, le robot D300e nous a permis de coater divers supports de culture cellulaire avec des motifs très précis. Notre méthode offre un gain de flexibilité très apprécié et s'avère bien plus accessible que les techniques de photolithographie habituellement utilisées. Grâce à l'intuitivité du logiciel, les projets de co-culture et les idées imaginées par les utilisateurs pourront se concrétiser rapidement et simplement. Le développement de cette méthode n'a cependant pas été mené sans difficulté puisque nous avons dû faire face à l'impossibilité de spotter directement le fond des plaques de culture cellulaire. Cet obstacle a été contourné par l'utilisation de coverslips en verre bien plus adaptés au spotting. Le débit de production de plaques MPCC est toutefois ralenti par la manipulation de ces supports qui demandent beaucoup de minutie.

Les caractérisations des MPCCs initiées en toute fin de projet sont très encourageantes et démontrent que la création de co-cultures microorganisées par la méthode de spotting est un succès. Nous sommes proches des performances d'Hepatopac™ lorsque nous utilisons le même clone de fibroblastes (3T3-J2) et nous arrivons également à nous démarquer du modèle original grâce à l'emploi de cellules souches mésenchymateuses. Les mMSC (souris) supportent les hépatocytes sur le long terme : les canalicules biliaires ainsi que les activités métaboliques (3A4 et 2D6) et anaboliques (synthèse de l'albumine) sont maintenues sur un minimum de 3 semaines. S'ils confirment leurs intérêts pour les études DMPK, les mMSC beaucoup plus rapides à amplifier que les 3T3-J2 seront une alternative intéressante aux fibroblastes.

En poursuivant les travaux d'investigations et en incorporant d'autres types cellulaires, les MPCCs fabriquées par spotting pourront sans doute s'avérer utiles dans des domaines autres que le DMPK. En toxicologie prédictive, les MPCCs pourront par exemple être adaptées pour étudier le potentiel cytotoxique, cholestatique et stéatosique des molécules en cours de développement. Récemment, une étude a par exemple montré que le traitement du modèle Hepatopac™ par la molécule Tolvaptan entraînait une libération importante de miR-122 et ce, en absence de nécrose cellulaire manifeste (Mosedale *et al.*, 2018). Le Tolvaptan est un médicament (JINARC) sur lequel il existe encore des incertitudes concernant la tolérance hépatique du produit à long terme. Le modèle de MPCC a permis d'étudier le stress

hépatocytaire induit par la molécule mais aussi d'en savoir plus sur les mécanismes impliqués dans la toxicité « idiosyncrasique » (= hépatotoxicité rare et imprévisible).

Les expérimentations que nous avons menées avec les MSC humaines illustrent quant à elles le potentiel des MPCC dans le domaine de la modélisation de maladies hépatiques. La présence de BM-MSK et hASC a entraîné la formation de gouttelettes lipidiques et une accumulation de triglycérides qui concordent bien avec un état de stéatose. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de caractériser plus profondément les co-cultures mais nous espérons que des travaux complémentaires confirmeront rapidement l'intérêt de ce modèle pour l'étude des maladies stéatosiques et l'identification de biomarqueurs.

En conclusion, les travaux menés tout au long de ce projet de recherche ont démontré la capacité prédictive de nouveaux modèles hépatiques. Même si des efforts sont réalisés, les stratégies de prédiction souffrent globalement d'un manque d'harmonisation de la communauté scientifique, tant sur le choix des modèles *in vitro* que sur les méthodes d'extrapolation (IVIVE) à adopter. Cette thèse a permis de nous concentrer en profondeur sur la clairance métabolique et à tout ce qui impacte les prédictions. Le modèle Hepatopac™ a ainsi été identifié comme une alternative judicieuse aux modèles de routine lorsque les molécules ne peuvent pas être étudiées en culture classique. L'intégration de nouvelles hypothèses physiologiques tel que la théorie de « l'uptake facilité par l'albumine » a également participé à améliorer les prédictions. Enfin, notre approche innovante basée sur le spotting de précision a rempli ses objectifs. Il s'agit en effet d'une méthode simple, robuste et accessible qui facilite l'innovation en permettant la production de tous types de cocultures microorganisées. Les caractérisations que nous avons initiées vont sans doute se poursuivre et laisser place à des sujets de stage, de thèse ou de post-doc très enrichissant et captivant.

## Références bibliographiques

- Abu-Absi SF, Hansen LK, and Hu W-S (2004) Three-dimensional co-culture of hepatocytes and stellate cells. *Cytotechnology* **45**:125–140.
- Alzebedeh DA, and Matthew HW (2017) Metabolic Oscillations in Co-Cultures of Hepatocytes and Mesenchymal Stem Cells: Effects of Seeding Arrangement and Culture Mixing. *J Cell Biochem* **118**:3003–3015.
- Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, and Crison JR (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* **12**:413–420.
- Andria B, Bracco A, Cirino G, and Chamuleau RAFM (2010) Liver Cell Culture Devices. *Cell Med* **1**:55–70.
- Austin RP, Barton P, Cockroft SL, Wenlock MC, and Riley RJ (2002) The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties. *Drug Metab Dispos* **30**:1497–1503.
- Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, Burkhardt B, Sánchez JJM, Ladurner R, Thasler W, Damm G, and Nussler AK (2015) 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays (Basel)* **4**:64–83.
- Bale SS, Verneti L, Senutovitch N, Jindal R, Hegde M, Gough A, McCarty WJ, Bakan A, Bhushan A, Shun TY, Golberg I, DeBiasio R, Usta BO, Taylor DL, and Yarmush ML (2014) *In vitro* platforms for evaluating liver toxicity. *Exp Biol Med (Maywood)* **239**:1180–1191.
- Bedossa P (2013) Current histological classification of NAFLD: strength and limitations. *Hepatol Int* **7 Suppl 2**:765–770.
- Benet LZ (2010) Clearance (née Rowland) concepts: a downdate and an update. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **37**:529–539.
- Benet LZ (2018) Predicting Pharmacokinetics/Pharmacodynamics in the Individual Patient: Separating Reality From Hype. *J Clin Pharmacol*, doi: 10.1002/jcph.1105.
- Benhamouche S, Decaens T, Perret C, and Colnot S (2006) [Wnt/beta-catenin pathway and liver metabolic zonation: a new player for an old concept]. *Med Sci (Paris)* **22**:904–906.
- Berezhkovskiy LM (2011) The corrected traditional equations for calculation of hepatic clearance that account for the difference in drug ionization in extracellular and intracellular tissue water and the corresponding corrected PBPK equation. *J Pharm Sci* **100**:1167–1183.
- Bhatia SN, Yarmush ML, and Toner M (1997) Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J Biomed Mater Res* **34**:189–199.
- Boden G, Scapa EF, Kanno K, Cohen DE, Brosnan ME, Brosnan JT, Pessayre D, Roy-Chowdhury N, Lu Y, Roy-Chowdhury J, Jansen PLM, Faber KN, Häussinger D, Lingappa VR, Fernández-Checa JC, García-Ruiz C, Puy H, Deybach J-C, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Kojima S, Brown KE, Brewer GJ, Harris ED, Askari FK, Neuschwander-Tetri BA, Liddle C, and Stedman CAM (2008) Metabolism, in *Textbook of Hepatology* pp 129–249, Wiley-Blackwell.

- Boeckmans J, Natale A, Buyl K, Rogiers V, De Kock J, Vanhaecke T, and Rodrigues RM (2018) Human-based systems: Mechanistic NASH modelling just around the corner? *Pharmacol Res* **134**:257–267.
- Boffito M, Back DJ, Blaschke TF, Rowland M, Bertz RJ, Gerber JG, and Miller V (2003) Protein binding in antiretroviral therapies. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:825–835.
- Bohnert T, and Gan L-S (2013) Plasma protein binding: from discovery to development. *J Pharm Sci* **102**:2953–2994.
- Bonn B, Svanberg P, Janefeldt A, Hultman I, and Grime K (2016) Determination of Human Hepatocyte Intrinsic Clearance for Slowly Metabolized Compounds: Comparison of a Primary Hepatocyte/Stromal Cell Co-culture with Plated Primary Hepatocytes and HepaRG. *Drug Metab Dispos* **44**:527–533.
- Böttcher JP, Knolle PA, and Stabenow D (2011) Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver. *Dig Dis* **29**:384–390.
- Bounakta S, Bteich M, Mantha M, Poulin P, and Haddad S (2018) Predictions of bisphenol A hepatic clearance in the isolated perfused rat liver (IPRL): impact of albumin binding and of co-administration with naproxen. *Xenobiotica* **48**:135–147.
- Bow DAJ, Perry JL, Simon JD, and Pritchard JB (2006) The impact of plasma protein binding on the renal transport of organic anions. *J Pharmacol Exp Ther* **316**:349–355.
- Bowman CM, and Benet LZ (2018) An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to *in vitro-in vivo* extrapolation. *Eur J Pharm Sci* **123**:502–514.
- Bowman CM, and Benet LZ (2016) Hepatic Clearance Predictions from *In Vitro-In Vivo* Extrapolation and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Drug Metab Dispos* **44**:1731–1735.
- Braet F, and Wisse E (2002) Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* **1**:1.
- Braeuning A, Ittrich C, Köhle C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, and Schwarz M (2006) Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J* **273**:5051–5061.
- Bredesen JE, and Kierulf P (1986) Relationship between alpha 1-acid glycoprotein and distribution of disopyramide and mono-N-dealkyldisopyramide in whole blood. *Br J Clin Pharmacol* **22**:281–286.
- Brinkmann U, and Eichelbaum M (2001) Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J* **1**:59–64.
- Brophy CM, Luebke-Wheeler JL, Amiot BP, Khan H, Remmel RP, Rinaldo P, and Nyberg SL (2009) Rat hepatocyte spheroids formed by rocked technique maintain differentiated hepatocyte gene expression and function. *Hepatology* **49**:578–586.
- Brown HS, Griffin M, and Houston JB (2007) Evaluation of cryopreserved human hepatocytes as an alternative *in vitro* system to microsomes for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispos* **35**:293–301.

- Bruno R, Olivares R, Berille J, Chaikin P, Vivier N, Hammershaimb L, Rhodes GR, and Rigas JR (2003) Alpha-1-acid glycoprotein as an independent predictor for treatment effects and a prognostic factor of survival in patients with non-small cell lung cancer treated with docetaxel. *Clin Cancer Res* **9**:1077–1082.
- Calzadilla Bertot L, and Adams LA (2016) The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J Mol Sci* **17**.
- Camenisch GP (2016) Drug Disposition Classification Systems in Discovery and Development: A Comparative Review of the BDDCS, ECCS and ECCCS Concepts. *Pharm Res* **33**:2583–2593.
- Capone SH, Dufresne M, Rechel M, Fleury M-J, Salsac A-V, Paullier P, Daujat-Chavanieu M, and Legallais C (2013) Impact of Alginate Composition: From Bead Mechanical Properties to Encapsulated HepG2/C3A Cell Activities for *In Vivo* Implantation. *PLoS One* **8**.
- Cassidy S, and Syed BA (2016) Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) drugs market. *Nat Rev Drug Discov* **15**:745–746.
- Catapano G, Patzer JF, and Gerlach JC (2009) Transport advances in disposable bioreactors for liver tissue engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **115**:117–143.
- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, and Sanyal AJ (2012) The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **55**:2005–2023.
- Chavez-Tapia NC, Rosso N, and Tiribelli C (2012) Effect of intracellular lipid accumulation in a new model of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* **12**:20.
- Cheng X, Kim SY, Okamoto H, Xin Y, Yancopoulos GD, Murphy AJ, and Gromada J (2018) Glucagon contributes to liver zonation. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**:E4111–E4119.
- Chiba M, Ishii Y, and Sugiyama Y (2009) Prediction of Hepatic Clearance in Human From *In Vitro* Data for Successful Drug Development. *AAPS J* **11**.
- Christensen H, Baker M, Tucker GT, and Rostami-Hodjegan A (2006) Prediction of plasma protein binding displacement and its implications for quantitative assessment of metabolic drug–drug interactions from *in vitro* data. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **95**:2778–2787.
- Chu X, Korzekwa K, Elsbey R, Fenner K, Galetin A, Lai Y, Matsson P, Moss A, Nagar S, Rosania GR, Bai JPF, Polli JW, Sugiyama Y, Brouwer KLR, and International Transporter Consortium (2013) Intracellular drug concentrations and transporters: measurement, modeling, and implications for the liver. *Clin Pharmacol Ther* **94**:126–141.
- Dalet C, Fehlmann M, and Debey P (1982) Use of Percoll density gradient centrifugation for preparing isolated rat hepatocytes having long-term viability. *Anal Biochem* **122**:119–123.
- Dash A, Simmers MB, Deering TG, Berry DJ, Feaver RE, Hastings NE, Pruett TL, LeCluyse EL, Blackman BR, and Wamhoff BR (2013) Hemodynamic flow improves rat hepatocyte morphology, function, and metabolic activity *in vitro*. *Am J Physiol Cell Physiol* **304**:C1053–C1063.
- Da-Silva F, Boulenc X, Vermet H, Compigne P, Gerbal-Chaloin S, Daujat-Chavanieu M, Klieber S, and Poulin P (2018) Improving Prediction of Metabolic Clearance Using Quantitative

- Extrapolation of Results Obtained From Human Hepatic Micropatterned Cocultures Model and by Considering the Impact of Albumin Binding. *J Pharm Sci* **107**:1957–1972.
- Davidson MD, Ballinger KR, and Khetani SR (2016) Long-term exposure to abnormal glucose levels alters drug metabolism pathways and insulin sensitivity in primary human hepatocytes. *Sci Rep* **6**:28178.
- Davidson MD, Kukla DA, and Khetani SR (2017) Microengineered cultures containing human hepatic stellate cells and hepatocytes for drug development. *Integr Biol (Camb)* **9**:662–677.
- De Bartolo L, Salerno S, Curcio E, Piscioneri A, Rende M, Morelli S, Tasselli F, Bader A, and Drioli E (2009) Human hepatocyte functions in a crossed hollow fiber membrane bioreactor. *Biomaterials* **30**:2531–2543.
- Despeyroux A, Duret C, Gondeau C, Perez-Gracia E, Chuttoo L, de Boussac H, Briolotti P, Bony C, Noël D, Jorgensen C, Larrey D, Daujat-Chavanieu M, and Herrero A (2018) Mesenchymal stem cells seeded on a human amniotic membrane improve liver regeneration and mouse survival after extended hepatectomy. *J Tissue Eng Regen Med* **12**:1062–1073.
- Di L, Atkinson K, Orozco CC, Funk C, Zhang H, McDonald TS, Tan B, Lin J, Chang C, and Obach RS (2013) *In vitro-in vivo* correlation for low-clearance compounds using hepatocyte relay method. *Drug Metab Dispos* **41**:2018–2023.
- Di L, Breen C, Chambers R, Eckley ST, Fricke R, Ghosh A, Harradine P, Kalvass JC, Ho S, Lee CA, Marathe P, Perkins EJ, Qian M, Tse S, Yan Z, and Zamek-Gliszczynski MJ (2017) Industry Perspective on Contemporary Protein-Binding Methodologies: Considerations for Regulatory Drug-Drug Interaction and Related Guidelines on Highly Bound Drugs. *J Pharm Sci* **106**:3442–3452.
- Di L, Trapa P, Obach RS, Atkinson K, Bi Y-A, Wolford AC, Tan B, McDonald TS, Lai Y, and Tremaine LM (2012) A novel relay method for determining low-clearance values. *Drug Metab Dispos* **40**:1860–1865.
- Dresser GK, Spence JD, and Bailey DG (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* **38**:41–57.
- Duval DL, Sieg DJ, and Billings RE (1995) Regulation of hepatic nitric oxide synthase by reactive oxygen intermediates and glutathione. *Arch Biochem Biophys* **316**:699–706.
- Elaut G, Papeleu P, Vinken M, Henkens T, Snykers S, Vanhaecke T, and Rogiers V (2006) Hepatocytes in suspension. *Methods Mol Biol* **320**:255–263.
- Emoto C, Murayama N, Rostami-Hodjegan A, and Yamazaki H (2010) Methodologies for investigating drug metabolism at the early drug discovery stage: prediction of hepatic drug clearance and P450 contribution. *Curr Drug Metab* **11**:678–685.
- Feaver RE, Cole BK, Lawson MJ, Hoang SA, Marukian S, Blackman BR, Figler RA, Sanyal AJ, Wamhoff BR, and Dash A (2016) Development of an *in vitro* human liver system for interrogating nonalcoholic steatohepatitis. *JCI Insight* **1**:e90954.
- Figaro S, Pereira U, Rada H, Semenzato N, Pouchoulin D, and Legallais C (2015) Development and validation of a bioartificial liver device with fluidized bed bioreactors hosting alginate-encapsulated hepatocyte spheroids. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2015**:1335–1338.

- Fischer FC, Abele C, Droge STJ, Henneberger L, König M, Schlichting R, Scholz S, and Escher BI (2018) Cellular Uptake Kinetics of Neutral and Charged Chemicals in *in Vitro* Assays Measured by Fluorescence Microscopy. *Chem Res Toxicol* **31**:646–657.
- Fitzpatrick E, Wu Y, Dhadda P, Hughes RD, Mitry RR, Qin H, Lehec SC, Heaton ND, and Dhawan A (2015) Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes. *Cell Transplant* **24**:73–83.
- Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**:125–172.
- Fukuchi Y, Toshimoto K, Mori T, Kakimoto K, Tobe Y, Sawada T, Asaumi R, Iwata T, Hashimoto Y, Nunoya K-I, Imawaka H, Miyauchi S, and Sugiyam Y (2017) Analysis of Nonlinear Pharmacokinetics of a Highly Albumin-Bound Compound: Contribution of Albumin-Mediated Hepatic Uptake Mechanism. *J Pharm Sci* **106**:2704–2714.
- Geier A, and Rau M (2017) Emerging therapies for NASH - the future is now. *Expert Rev Clin Pharmacol* **10**:467–469.
- Gillette JR (1971) Factors affecting drug metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **179**:43–66.
- Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho C-S, Choi Y-J, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CEP, Gómez-Lechón MJ, Groothuis GMM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Häussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhütter H-G, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EHK, Stieger B, Stöber R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, and Hengstler JG (2013) Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* **87**:1315–1530.
- Godoy P, Widera A, Schmidt-Heck W, Campos G, Meyer C, Cadenas C, Reif R, Stöber R, Hammad S, Pütter L, Gianmoena K, Marchan R, Ghallab A, Edlund K, Nüssler A, Thasler WE, Damm G, Seehofer D, Weiss TS, Dirsch O, Dahmen U, Gebhardt R, Chaudhari U, Meganathan K, Sachinidis A, Kelm J, Hofmann U, Zahedi RP, Guthke R, Blüthgen N, Dooley S, and Hengstler JG (2016) Gene network activity in cultivated primary hepatocytes is highly similar to diseased mammalian liver tissue. *Arch Toxicol* **90**:2513–2529.
- Gómez-Aristizábal A, Keating A, and Davies JE (2009) Mesenchymal stromal cells as supportive cells for hepatocytes. *Mol Ther* **17**:1504–1508.
- Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, and O'Connor J-E (2007) A human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* **165**:106–116.

- Goral VN, Hsieh Y-C, Petzold ON, Clark JS, Yuen PK, and Faris RA (2010) Perfusion-based microfluidic device for three-dimensional dynamic primary human hepatocyte cell culture in the absence of biological or synthetic matrices or coagulants. *Lab Chip* **10**:3380–3386.
- Gu J, Shi X, Chu X, Zhang Y, and Ding Y (2009) Contribution of bone marrow mesenchymal stem cells to porcine hepatocyte culture *in vitro*. *Biochem Cell Biol* **87**:595–604.
- Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JMA, Batt A-M, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, and Souidi M (2006) [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)* **64**:535–548.
- Guguen-Guillouzo C, Clément B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, and Guillouzo A (1983) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes cocultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res* **143**:47–54.
- Guillouzo A, Rialland L, Fautrel A, and Guyomard C (1999) Survival and function of isolated hepatocytes after cryopreservation. *Chem Biol Interact* **121**:7–16.
- Hailfinger S, Jaworski M, Braeuning A, Buchmann A, and Schwarz M (2006) Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology* **43**:407–414.
- Hallifax D, and Houston JB (2006) Binding of drugs to hepatic microsomes: comment and assessment of current prediction methodology with recommendation for improvement. *Drug Metab Dispos* **34**:724–726; author reply 727.
- Hardwick RN, Fisher CD, Canet MJ, Scheffer GL, and Cherrington NJ (2011) Variations in ATP-binding cassette transporter regulation during the progression of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos* **39**:2395–2402.
- Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, Swales N, Fischer T, Biefang K, Gerl M, Böttger T, and Oesch F (2000) Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available *in vitro* model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* **32**:81–118.
- Herrero A, Gerbal-Chaloin S and Daujat-Chavanieu M. Bioinspired Liver Tissue Engineering. Book chapter in Handbook of Biomimetics and Bioinspiration. 2014. Eds Jabbari E, Khademhosseini A, Lee LP, Kim DH, Ghaemmaghami A. World Scientific Publishing Co, Pte, Ltd..
- Hoffmann SA, Müller-Vieira U, Biemel K, Knobloch D, Heydel S, Lübberstedt M, Nüssler AK, Andersson TB, Gerlach JC, and Zeilinger K (2012) Analysis of drug metabolism activities in a miniaturized liver cell bioreactor for use in pharmacological studies. *Biotechnol Bioeng* **109**:3172–3181.
- Huang Z, and Ung T (2013) Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Curr Drug Metab* **14**:226–238.
- Ito K, and Houston JB (2004) Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using *in vitro* kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm Res* **21**:785–792.
- Ito K, and Houston JB (2005) Prediction of human drug clearance from *in vitro* and preclinical data using physiologically based and empirical approaches. *Pharm Res* **22**:103–112.

- Jauregui HO, McMillan PN, Hevey K, and Naik S (1988) A quantitative analysis of lectin binding to adult rat hepatocyte cell surfaces. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**:401–412.
- Johnson JA, and Livingston TN (1997) Differences between blacks and whites in plasma protein binding of drugs. *Eur J Clin Pharmacol* **51**:485–488.
- Kamiya A, Kinoshita T, and Miyajima A (2001) Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* **492**:90–94.
- Keemink J, Oorts M, and Annaert P (2015) Primary Hepatocytes in Sandwich Culture. *Methods Mol Biol* **1250**:175–188.
- Kerb R, Hoffmeyer S, and Brinkmann U (2001) ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* **2**:51–64.
- Khetani SR, Berger DR, Ballinger KR, Davidson MD, Lin C, and Ware BR (2015) Microengineered liver tissues for drug testing. *J Lab Autom* **20**:216–250.
- Khetani SR, and Bhatia SN (2008) Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat Biotechnol* **26**:120–126.
- Khetani SR, Chen AA, Ranscht B, and Bhatia SN (2008) T-cadherin modulates hepatocyte functions *in vitro*. *FASEB J* **22**:3768–3775.
- Khetani SR, Kanchagar C, Ukairo O, Krzyzewski S, Moore A, Shi J, Aoyama S, Aleo M, and Will Y (2013) Use of micropatterned cocultures to detect compounds that cause drug-induced liver injury in humans. *Toxicol Sci* **132**:107–117.
- Khetani SR, Szulgit G, Del Rio JA, Barlow C, and Bhatia SN (2004) Exploring interactions between rat hepatocytes and nonparenchymal cells using gene expression profiling. *Hepatology* **40**:545–554.
- Kim RB (2003) Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. *Eur J Clin Invest* **33 Suppl 2**:1–5.
- Kola I, and Landis J (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **3**:711–715.
- Kolios G, Valatas V, and Kouroumalis E (2006) Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* **12**:7413–7420.
- Koo S-H (2013) Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* **19**:210–215.
- Kostrzewski T, Cornforth T, Snow SA, Ouro-Gnao L, Rowe C, Large EM, and Hughes DJ (2017) Three-dimensional perfused human *in vitro* model of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **23**:204–215.
- Kratochwil NA, Meille C, Fowler S, Klammers F, Ekiciler A, Molitor B, Simon S, Walter I, McGinnis C, Walther J, Leonard B, Triyatni M, Javanbakht H, Funk C, Schuler F, Lavé T, and Parrott NJ (2017) Metabolic Profiling of Human Long-Term Liver Models and Hepatic Clearance Predictions from *In Vitro* Data Using Nonlinear Mixed-Effects Modeling. *AAPS J* **19**:534–550.

- Krause P, Saghatolislam F, Koenig S, Unthan-Fechner K, and Probst I (2009) Maintaining hepatocyte differentiation *in vitro* through co-culture with hepatic stellate cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **45**:205–212.
- Kremer JM, Wilting J, and Janssen LH (1988) Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* **40**:1–47.
- LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, and Powers MJ (2012) Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol* **42**:501–548.
- Lee K-W, Lee SK, Joh J-W, Kim S-J, Lee B-B, Kim K-W, and Lee KU (2004) Influence of pancreatic islets on spheroid formation and functions of hepatocytes in hepatocyte-pancreatic islet spheroid culture. *Tissue Eng* **10**:965–977.
- Lerche-Langrand C, and Toutain HJ (2000) Precision-cut liver slices: characteristics and use for *in vitro* pharmaco-toxicology. *Toxicology* **153**:221–253.
- Li AP (1999) Overview: hepatocytes and cryopreservation--a personal historical perspective. *Chem Biol Interact* **121**:1–5.
- Lin C, and Khetani SR (2017) Micropatterned Co-Cultures of Human Hepatocytes and Stromal Cells for the Assessment of Drug Clearance and Drug-Drug Interactions. *Curr Protoc Toxicol* **72**:14.17.1-14.17.23.
- Lin C, Shi J, Moore A, and Khetani SR (2016) Prediction of Drug Clearance and Drug-Drug Interactions in Microscale Cultures of Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **44**:127–136.
- Lipomi DJ, Martinez RV, Cademartiri L, and Whitesides GM (2012) Soft Lithographic Approaches to Nanofabrication, in *Polymer Science: A Comprehensive Reference* pp 211–231, Elsevier.
- Liu L, and Pang KS (2005) The roles of transporters and enzymes in hepatic drug processing. *Drug Metab Dispos* **33**:1–9.
- Liu X, Wright M, and Hop CECA (2014) Rational use of plasma protein and tissue binding data in drug design. *J Med Chem* **57**:8238–8248.
- Loomba R, and Sanyal AJ (2013) The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**:686–690.
- Loos WJ, Baker SD, Verweij J, Boonstra JG, and Sparreboom A (2003) Clinical pharmacokinetics of unbound docetaxel: role of polysorbate 80 and serum proteins. *Clin Pharmacol Ther* **74**:364–371.
- Lu C, Li P, Gallegos R, Uttamsingh V, Xia CQ, Miwa GT, Balani SK, and Gan L-S (2006) Comparison of intrinsic clearance in liver microsomes and hepatocytes from rats and humans: evaluation of free fraction and uptake in hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **34**:1600–1605.
- Lu H-F, Chua K-N, Zhang P-C, Lim W-S, Ramakrishna S, Leong KW, and Mao H-Q (2005) Three-dimensional co-culture of rat hepatocyte spheroids and NIH/3T3 fibroblasts enhances hepatocyte functional maintenance. *Acta Biomater* **1**:399–410.
- Lübberstedt M, Müller-Vieira U, Biemel KM, Darnell M, Hoffmann SA, Knöspel F, Wönne EC, Knobloch D, Nüssler AK, Gerlach JC, Andersson TB, and Zeilinger K (2015) Serum-free culture

- of primary human hepatocytes in a miniaturized hollow-fibre membrane bioreactor for pharmacological *in vitro* studies. *J Tissue Eng Regen Med* **9**:1017–1026.
- Maeda K, Ikeda Y, Fujita T, Yoshida K, Azuma Y, Haruyama Y, Yamane N, Kumagai Y, and Sugiyama Y (2011) Identification of the rate-determining process in the hepatic clearance of atorvastatin in a clinical cassette microdosing study. *Clin Pharmacol Ther* **90**:575–581.
- March S, Ramanan V, Trehan K, Ng S, Galstian A, Gural N, Scull MA, Shlomai A, Mota MM, Fleming HE, Khetani SR, Rice CM, and Bhatia SN (2015) Micropatterned coculture of primary human hepatocytes and supportive cells for the study of hepatotropic pathogens. *Nat Protoc* **10**:2027–2053.
- Marra F, and Parola M (2011) Cells in the Liver—Functions in Health and Disease, in *Chronic Liver Failure: Mechanisms and Management* (Ginès P, Kamath PS, and Arroyo V eds) pp 3–32, Humana Press, Totowa, NJ.
- Mathijs K, Kienhuis AS, Brauers KJJ, Jennen DGJ, Lahoz A, Kleinjans JCS, and van Delft JHM (2009) Assessing the metabolic competence of sandwich-cultured mouse primary hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **37**:1305–1311.
- McLure JA, Miners JO, and Birkett DJ (2000) Nonspecific binding of drugs to human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **49**:453–461.
- Mehvar R (2018) Clearance Concepts: Fundamentals and Application to Pharmacokinetic Behavior of Drugs. *J Pharm Pharm Sci* **21**:88s-102s.
- Mehvar R (2006) Interdependency of pharmacokinetic parameters: a chicken-and-egg problem? Not! *J Pharm Pharm Sci* **9**:113–118.
- Mehvar R (1991) Relationship of apparent systemic clearance to individual organ clearances: effect of pulmonary clearance and site of drug administration and measurement. *Pharm Res* **8**:306–312.
- Merrell MD, and Cherrington NJ (2011) Drug metabolism alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Rev* **43**:317–334.
- Miyauchi S, Masuda M, Kim S-J, Tanaka Yuudai, Lee K-R, Iwakado S, Nemoto M, Sasaki S, Shimono K, Tanaka Yoshio, and Sugiyama Y (2018) The Phenomenon of Albumin-Mediated Hepatic Uptake of Organic Anion Transport Polypeptide Substrates: Prediction of the *In Vivo* Uptake Clearance from the *In Vitro* Uptake by Isolated Hepatocytes Using a Facilitated-Dissociation Model. *Drug Metab Dispos* **46**:259–267.
- Mizuguchi T, Palm K, Hui T, Aoki T, Mochizuki Y, Mitaka T, Demetriou AA, and Rozga J (2002) Effects of bone marrow stromal cells on the structural and functional polarity of primary rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**:62–65.
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, and Sugiyama Y (2003) Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* **55**:425–461.
- Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, and Lotková H (2015) The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res* **64 Suppl 5**:S627-636.

- Mosedale M, Eaddy JS, Trask OJ, Holman NS, Wolf KK, LeCluyse E, Ware BR, Khetani SR, Lu J, Brock WJ, Roth SE, and Watkins PB (2018) miR-122 Release in Exosomes Precedes Overt Tolvaptan-Induced Necrosis in a Primary Human Hepatocyte Micropatterned Coculture Model. *Toxicol Sci* **161**:149–158.
- Nagar S, and Korzekwa K (2017) Drug Distribution. Part 1. Models to Predict Membrane Partitioning. *Pharm Res* **34**:535–543.
- Nair PC, McKinnon RA, and Miners JO (2016) A Fragment-Based Approach for the Computational Prediction of the Nonspecific Binding of Drugs to Hepatic Microsomes. *Drug Metab Dispos* **44**:1794–1798.
- Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, and Sugiyama Y (2001) Prediction of human hepatic clearance from *in vivo* animal experiments and *in vitro* metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metab Dispos* **29**:1316–1324.
- Neff EP (2017) Printing cures: Organovo advances with 3D-printed liver tissue.
- Nguyen DG, Funk J, Robbins JB, Crogan-Grundy C, Presnell SC, Singer T, and Roth AB (2016) Bioprinted 3D Primary Liver Tissues Allow Assessment of Organ-Level Response to Clinical Drug Induced Toxicity *In Vitro*. *PLOS ONE* **11**:e0158674.
- Norona LM, Nguyen DG, Gerber DA, Presnell SC, and LeCluyse EL (2016) Editor’s Highlight: Modeling Compound-Induced Fibrogenesis *In Vitro* Using Three-Dimensional Bioprinted Human Liver Tissues. *Toxicol Sci* **154**:354–367.
- Novik E, Maguire TJ, Chao P, Cheng KC, and Yarmush ML (2010) A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochem Pharmacol* **79**:1036–1044.
- Obach RS (1997) Nonspecific binding to microsomes: impact on scale-up of *in vitro* intrinsic clearance to hepatic clearance as assessed through examination of warfarin, imipramine, and propranolol. *Drug Metab Dispos* **25**:1359–1369.
- Obach RS (1999) Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* **27**:1350–1359.
- Obach RS, Lombardo F, and Waters NJ (2008) Trend analysis of a database of intravenous pharmacokinetic parameters in humans for 670 drug compounds. *Drug Metab Dispos* **36**:1385–1405.
- Obach RS, Walsky RL, and Venkatakrishnan K (2007) Mechanism-based inactivation of human cytochrome p450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* **35**:246–255.
- Ortega-Prieto AM, Skelton JK, Wai SN, Large E, Lussignol M, Vizcay-Barrena G, Hughes D, Fleck RA, Thursz M, Catanese MT, and Dorner M (2018) 3D microfluidic liver cultures as a physiological preclinical tool for hepatitis B virus infection. *Nature Communications* **9**:682.
- Pang KS, and Rowland M (1977) Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a “well-stirred” model and a “parallel tube” model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **5**:625–653.

- Pang KS, Weiss M, and Macheras P (2007) Advanced pharmacokinetic models based on organ clearance, circulatory, and fractal concepts. *AAPS J* **9**:E268–E283.
- Parmentier Y, Pothier C, Delmas A, Caradec F, Trancart M-M, Guillet F, Bouaita B, Chesne C, Brian Houston J, and Walther B (2017) Direct and quantitative evaluation of the human CYP3A4 contribution (fm) to drug clearance using the *in vitro* SILENSOMES model. *Xenobiotica* **47**:562–575.
- Peng C-C, Doshi U, Prakash C, and Li AP (2016) A Novel Plated Hepatocyte Relay Assay (PHRA) for *In Vitro* Evaluation of Hepatic Metabolic Clearance of Slowly Metabolized Compounds. *Drug Metab Lett* **10**:3–15.
- Peng H, Wisse E, and Tian Z (2016) Liver natural killer cells: subsets and roles in liver immunity. *Cell Mol Immunol* **13**:328–336.
- Peters T (1995) 2 - The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties, in *All About Albumin* (Peters T ed) pp 9–11, Academic Press, San Diego.
- Peyret T, Poulin P, and Krishnan K (2010) A unified algorithm for predicting partition coefficients for PBPK modeling of drugs and environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* **249**:197–207.
- Piafsky KM, and Borgå O (1977) Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of alpha 1-acid glycoprotein for interindividual variation. *Clin Pharmacol Ther* **22**:545–549.
- Piafsky KM, Borgå O, Odar-Cederlöf I, Johansson C, and Sjöqvist F (1978) Increased plasma protein binding of propranolol and chlorpromazine mediated by disease-induced elevations of plasma alpha1 acid glycoprotein. *N Engl J Med* **299**:1435–1439.
- Picard N, Ratanasavanh D, Prémaud A, Le Meur Y, and Marquet P (2005) Identification of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in mycophenolic acid phase II metabolism. *Drug Metab Dispos* **33**:139–146.
- Ploss A, Khetani SR, Jones CT, Syder AJ, Trehan K, Gaysinskaya VA, Mu K, Ritola K, Rice CM, and Bhatia SN (2010) Persistent hepatitis C virus infection in microscale primary human hepatocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:3141–3145.
- Poulin P, and Haddad S (2018) Extrapolation of the Hepatic Clearance of Drugs in the Absence of Albumin *In Vitro* to That in the Presence of Albumin *In Vivo*: Comparative Assessment of 2 Extrapolation Models Based on the Albumin-Mediated Hepatic Uptake Theory and Limitations and Mechanistic Insights. *J Pharm Sci* **107**:1791–1797.
- Poulin P, and Haddad S (2013a) Hepatocyte composition-based model as a mechanistic tool for predicting the cell suspension: aqueous phase partition coefficient of drugs in *in vitro* metabolic studies. *J Pharm Sci* **102**:2806–2818.
- Poulin P, and Haddad S (2011) Microsome composition-based model as a mechanistic tool to predict nonspecific binding of drugs in liver microsomes. *J Pharm Sci* **100**:4501–4517.
- Poulin P, and Haddad S (2013b) Toward a new paradigm for the efficient *in vitro-in vivo* extrapolation of metabolic clearance in humans from hepatocyte data. *J Pharm Sci* **102**:3239–3251.

- Poulin P, Hop CECA, Ho Q, Halladay JS, Haddad S, and Kenny JR (2012) Comparative assessment of *In Vitro-In Vivo* extrapolation methods used for predicting hepatic metabolic clearance of drugs. *J Pharm Sci* **101**:4308–4326.
- Poulin P, Kenny JR, Hop CECA, and Haddad S (2012) *In vitro-in vivo* extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. *J Pharm Sci* **101**:838–851.
- Proctor WR, Foster AJ, Vogt J, Summers C, Middleton B, Pilling MA, Shienson D, Kijanska M, Ströbel S, Kelm JM, Morgan P, Messner S, and Williams D (2017) Utility of spherical human liver microtissues for prediction of clinical drug-induced liver injury. *Arch Toxicol* **91**:2849–2863.
- Puche JE, Saiman Y, and Friedman SL (2013) Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol* **3**:1473–1492.
- Qin HH, Filippi C, Sun S, Lehec S, Dhawan A, and Hughes RD (2015) Hypoxic preconditioning potentiates the trophic effects of mesenchymal stem cells on co-cultured human primary hepatocytes. *Stem Cell Res Ther* **6**:237.
- Rashidi H, Alhaque S, Szkolnicka D, Flint O, and Hay DC (2016) Fluid shear stress modulation of hepatocyte-like cell function. *Arch Toxicol* **90**:1757–1761.
- Rebelo SP, Costa R, Silva MM, Marcelino P, Brito C, and Alves PM (2017) Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: improved functionality in long-term bioreactor cultures. *J Tissue Eng Regen Med* **11**:2034–2045.
- Richert L, Liguori MJ, Abadie C, Heyd B, Manton G, Halkic N, and Waring JF (2006) Gene expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. *Drug Metab Dispos* **34**:870–879.
- Riley RJ, McGinnity DF, and Austin RP (2005) A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from *in vitro* intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispos* **33**:1304–1311.
- Ring BJ, Chien JY, Adkison KK, Jones HM, Rowland M, Jones RD, Yates JWT, Ku MS, Gibson CR, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Björnsson T, Lavé T, and Poulin P (2011) PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 3: comparative assessment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci* **100**:4090–4110.
- Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, and Klaunig JE (2007) Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci* **96**:2–15.
- Rodgers T, and Rowland M (2006) Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions. *J Pharm Sci* **95**:1238–1257.
- Rogue A, Anthérieu S, Vluggens A, Umbdenstock T, Claude N, de la Moureyre-Spire C, Weaver RJ, and Guillouzo A (2014) PPAR agonists reduce steatosis in oleic acid-overloaded HepaRG cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **276**:73–81.

- Rose KA, Holman NS, Green AM, Andersen ME, and LeCluyse EL (2016) Co-culture of Hepatocytes and Kupffer Cells as an *In Vitro* Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity. *J Pharm Sci* **105**:950–964.
- Rowe C, Shaeri M, Large E, Cornforth T, Robinson A, Kostrzewski T, Sison-Young R, Goldring C, Park K, and Hughes D (2018) Perfused human hepatocyte microtissues identify reactive metabolite-forming and mitochondria-perturbing hepatotoxins. *Toxicology in Vitro* **46**:29–38.
- Rowland M, Benet LZ, and Graham GG (1973) Clearance concepts in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **1**:123–136.
- Sahi J, Grepper S, and Smith C (2010) Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport and safety evaluations in drug discovery. *Curr Drug Discov Technol* **7**:188–198.
- Schmid K, Kaufmann H, Isemura S, Bauer F, Emura J, Motoyama T, Ishiguro M, and Nanno S (2002) Structure of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. Complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with the immunoglobulins.
- Schmidt A, Braeuning A, Ruck P, Seitz G, Armeanu-Ebinger S, Fuchs J, Warmann SW, and Schwarz M (2011) Differential expression of glutamine synthetase and cytochrome P450 isoforms in human hepatoblastoma. *Toxicology* **281**:7–14.
- Schmidt-Arras D, and Rose-John S (2016) IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J Hepatol* **64**:1403–1415.
- Senoo H, Kojima N, and Sato M (2007) Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm* **75**:131–159.
- Shen C, Zhang G, and Meng Q (2010) Enhancement of the predicted drug hepatotoxicity in gel entrapped hepatocytes within polysulfone-g-poly (ethylene glycol) modified hollow fiber. *Toxicol Appl Pharmacol* **249**:140–147.
- Shitara Y, Horie T, and Sugiyama Y (2006) Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur J Pharm Sci* **27**:425–446.
- Shlomai A, Schwartz RE, Ramanan V, Bhatta A, de Jong YP, Bhatia SN, and Rice CM (2014) Modeling host interactions with hepatitis B virus using primary and induced pluripotent stem cell-derived hepatocellular systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:12193–12198.
- Singh JK, Solanki A, Maniyar RC, Banerjee D, and Shirsath VS (2012) Rapid Equilibrium Dialysis (RED): an In-vitro High-Throughput Screening Technique for Plasma Protein Binding using Human and Rat Plasma. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability* **0**.
- Sirianni GL, and Pang KS (1997) Organ clearance concepts: new perspectives on old principles. *J Pharmacokinet Biopharm* **25**:449–470.
- Smith DA, Di L, and Kerns EH (2010) The effect of plasma protein binding on *in vivo* efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **9**:929–939.
- Sohlenius-Sternbeck A-K, Jones C, Ferguson D, Middleton BJ, Projean D, Floby E, Bylund J, and Afzelius L (2012) Practical use of the regression offset approach for the prediction of *in vivo* intrinsic clearance from hepatocytes. *Xenobiotica* **42**:841–853.

- Soldatow VY, Lecluyse EL, Griffith LG, and Rusyn I (2013) *In vitro* models for liver toxicity testing. *Toxicol Res (Camb)* **2**:23–39.
- Staudinger JL, Madan A, Carol KM, and Parkinson A (2003) Regulation of Drug Transporter Gene Expression by Nuclear Receptors. *Drug Metab Dispos* **31**:523–527.
- Stringer R, Nicklin PL, and Houston JB (2008) Reliability of human cryopreserved hepatocytes and liver microsomes as *in vitro* systems to predict metabolic clearance. *Xenobiotica* **38**:1313–1329.
- Summerfield SG, Stevens AJ, Cutler L, del Carmen Osuna M, Hammond B, Tang S-P, Hersey A, Spalding DJ, and Jeffrey P (2006) Improving the *in vitro* prediction of *in vivo* central nervous system penetration: integrating permeability, P-glycoprotein efflux, and free fractions in blood and brain. *J Pharmacol Exp Ther* **316**:1282–1290.
- Syn W-K, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fearing CM, Teaberry V, Pereira FEL, Adams DH, and Diehl AM (2010) Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**:1998–2007.
- Takahashi Y, Soejima Y, and Fukusato T (2012) Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **18**:2300–2308.
- Takai K, Hara J, Matsumoto K, Hosoi G, Osugi Y, Tawa A, Okada S, and Nakamura T (1997) Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood* **89**:1560–1565.
- Tanaka Y, Yamato M, Okano T, Kitamori T, and Sato K (2006) Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system. *Meas Sci Technol* **17**:3167.
- Tetsuka K, Ohbuchi M, and Tabata K (2017) Recent Progress in Hepatocyte Culture Models and Their Application to the Assessment of Drug Metabolism, Transport, and Toxicity in Drug Discovery: The Value of Tissue Engineering for the Successful Development of a Microphysiological System. *J Pharm Sci* **106**:2302–2311.
- Thummel KE, Shen DD, and Isoherranen N (2015) Design and Optimization of Dosage Regimens: Pharmacokinetic Data, in *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Brunton LL, Chabner BA, and Knollmann BC eds) p, McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemski FA, Zhang JG, and Fariss MW (2000) Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chem Biol Interact* **127**:201–217.
- Tirona RG, and Kim RB (2002) Pharmacogenomics of organic anion-transporting polypeptides (OATP). *Adv Drug Deliv Rev* **54**:1343–1352.
- Tostões RM, Leite SB, Serra M, Jensen J, Björquist P, Carrondo MJT, Brito C, and Alves PM (2012) Human liver cell spheroids in extended perfusion bioreactor culture for repeated-dose drug testing. *Hepatology* **55**:1227–1236.
- Tran N-M, Dufresne M, Helle F, Hoffmann TW, François C, Brochot E, Paullier P, Legallais C, Duverlie G, and Castelain S (2014) Alginate Hydrogel Protects Encapsulated Hepatic HuH-7 Cells against Hepatitis C Virus and Other Viral Infections. *PLOS ONE* **9**:e109969.

- Tsamandouras N, Kostrzewski T, Stokes CL, Griffith LG, Hughes DJ, and Cirit M (2017) Quantitative Assessment of Population Variability in Hepatic Drug Metabolism Using a Perfused Three-Dimensional Human Liver Microphysiological System. *J Pharmacol Exp Ther* **360**:95–105.
- Tzanakakis ES, Hansen LK, and Hu WS (2001) The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* **48**:175–189.
- van Liempd S, Morrison D, Sysmans L, Nelis P, and Mortishire-Smith R (2011) Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. *J Lab Autom* **16**:56–67.
- Varma MV, Steyn SJ, Allerton C, and El-Kattan AF (2015) Predicting Clearance Mechanism in Drug Discovery: Extended Clearance Classification System (ECCS). *Pharm Res* **32**:3785–3802.
- Venkatakrishnan K, Pickard MD, and von Moltke LL (2010) A quantitative framework and strategies for management and evaluation of metabolic drug-drug interactions in oncology drug development: new molecular entities as object drugs. *Clin Pharmacokinet* **49**:703–727.
- Verhaegh P, Bavalia R, Winkens B, Masclee A, Jonkers D, and Koek G (2018) Noninvasive Tests Do Not Accurately Differentiate Nonalcoholic Steatohepatitis From Simple Steatosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **16**:837–861.
- Vinci B, Duret C, Klieber S, Gerbal-Chaloin S, Sa-Cunha A, Laporte S, Suc B, Maurel P, Ahluwalia A, and Daujat-Chavanieu M (2011) Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: Medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes. *Biotechnol J* **6**:554–564.
- Vivares A, Salle-Lefort S, Arabeyre-Fabre C, Ngo R, Penarier G, Bremond M, Moliner P, Gallas J-F, Fabre G, and Klieber S (2015) Morphological behaviour and metabolic capacity of cryopreserved human primary hepatocytes cultivated in a perfused multiwell device. *Xenobiotica* **45**:29–44.
- Voulgari F, Cummins P, Gardecki TI, Beeching NJ, Stone PC, and Stuart J (1982) Serum levels of acute phase and cardiac proteins after myocardial infarction, surgery, and infection. *Br Heart J* **48**:352–356.
- Wan H, and Rehngren M (2006) High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1102**:125–134.
- Wang WW, Khetani SR, Krzyzewski S, Duignan DB, and Obach RS (2010) Assessment of a micropatterned hepatocyte coculture system to generate major human excretory and circulating drug metabolites. *Drug Metab Dispos* **38**:1900–1905.
- Waring MJ, Arrowsmith J, Leach AR, Leeson PD, Mandrell S, Owen RM, Paireudeau G, Pennie WD, Pickett SD, Wang J, Wallace O, and Weir A (2015) An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov* **14**:475–486.
- Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Shitara Y, and Sugiyama Y (2009) Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther* **328**:652–662.

- Waters NJ, Jones R, Williams G, and Sohal B (2008) Validation of a Rapid Equilibrium Dialysis Approach for the Measurement of Plasma Protein Binding. *JPharmSci* **97**:4586–4595.
- Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, and Feldstein AE (2008) Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* **103**:1372–1379.
- Wienkers LC, and Heath TG (2005) Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov* **4**:825–833.
- Wilkinson GR, and Shand DG (1975) Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin Pharmacol Ther* **18**:377–390.
- Willebrords J, Pereira IVA, Maes M, Crespo Yanguas S, Colle I, Van Den Bossche B, Da Silva TC, de Oliveira CPMS, Andraus W, Alves VA, Cogliati B, and Vinken M (2015) Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Prog Lipid Res* **59**:106–125.
- Williamson B, and Riley RJ (2017) Hepatic transporter drug-drug interactions: an evaluation of approaches and methodologies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **13**:1237–1250.
- Winer BY, Huang TS, Pludwinski E, Heller B, Wojcik F, Lipkowitz GE, Parekh A, Cho C, Shrirao A, Muir TW, Novik E, and Ploss A (2017) Long-term hepatitis B infection in a scalable hepatic co-culture system. *Nat Commun* **8**:125.
- Winkler K, Keiding S, and Tygstrup N (1973) Clearance as a Quantitative Measure of Liver Function. *The Liver Quantitative Aspects of Structure and Function* 144–155.
- Wlcek K, and Stieger B (2014) ATP-binding cassette transporters in liver. *Biofactors* **40**:188–198.
- Wood FL, Houston JB, and Hallifax D (2017) Clearance Prediction Methodology Needs Fundamental Improvement: Trends Common to Rat and Human Hepatocytes/Microsomes and Implications for Experimental Methodology. *Drug Metab Dispos* **45**:1178–1188.
- Wood M, and Wood AJ (1981) Changes in plasma drug binding and alpha 1-acid glycoprotein in mother and newborn infant. *Clin Pharmacol Ther* **29**:522–526.
- Wree A, Broderick L, Canbay A, Hoffman HM, and Feldstein AE (2013) From NAFLD to NASH to cirrhosis-new insights into disease mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**:627–636.
- Wu C-Y, and Benet LZ (2005) Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res* **22**:11–23.
- Yamagata T, Zanelli U, Galleman D, Perrin D, Dolgos H, and Petersson C (2017) Comparison of methods for the prediction of human clearance from hepatocyte intrinsic clearance for a set of reference compounds and an external evaluation set. *Xenobiotica* **47**:741–751.
- Yamazaki M, Akiyama S, Nishigaki R, and Sugiyama Y (1996) Uptake is the rate-limiting step in the overall hepatic elimination of pravastatin at steady-state in rats. *Pharm Res* **13**:1559–1564.

- Yang N, Sun R, Liao X, Aa J, and Wang G (2017) UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and their related metabolic cross-talk with internal homeostasis: A systematic review of UGT isoforms for precision medicine. *Pharmacol Res* **121**:169–183.
- Ye Z, Zetterberg C, and Gao H (2017) Automation of plasma protein binding assay using rapid equilibrium dialysis device and Tecan workstation. *J Pharm Biomed Anal* **140**:210–214.
- Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, and Nakajima A (2007) High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* **42**:573–582.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, and Wymer M (2016) Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**:73–84.
- Zanger UM, and Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* **138**:103–141.
- Zarnegar R, and Michalopoulos GK (1995) The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* **129**:1177–1180.
- Zhang D, Luo G, Ding X, and Lu C (2012) Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2**:549–561.
- Zhang F, Xue J, Shao J, and Jia L (2012) Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discov Today* **17**:475–485.
- Zhang Y, Huo M, Zhou J, and Xie S (2010) PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* **99**:306–314.
- Zhou HH, Adedoyin A, and Wilkinson GR (1990) Differences in plasma binding of drugs between Caucasians and Chinese subjects. *Clin Pharmacol Ther* **48**:10–17.

## Résumé en Français

La sélection des meilleurs candidats médicament se base sur des choix multiparamétriques réunissant l'efficacité potentielle, les caractéristiques ADME et le profil de sécurité des nouvelles entités chimiques. En ce sens, la prédiction précoce de la pharmacocinétique est élémentaire pour orienter les prises de décision et donner un cap pertinent aux projets. En raison de son rôle central dans le devenir des médicaments, la clairance métabolique médiée principalement par le foie est l'un des paramètres les plus importants. L'objectif de ce projet était d'améliorer la prédiction de la clairance en se concentrant notamment sur les molécules présentant une bonne stabilité métabolique et qui sont de ce fait encore difficiles à étudier. Les travaux menés dans cette thèse nous ont permis d'étoffer nos connaissances sur les modèles hépatiques *in vitro* et les méthodes d'extrapolation usuelles mais aussi de découvrir et de développer de nouvelles stratégies de prédiction. Nous nous sommes concentrés en profondeur sur la clairance métabolique et à tout ce qui impacte les prédictions. Le modèle de co-culture microorganisée (MPCC) Hepatopac™ qui permet de stabiliser les hépatocytes humains sur plusieurs semaines a ainsi été identifié comme une alternative judicieuse aux modèles de routine lorsque les molécules ne peuvent pas être étudiées en culture 2D classique. L'étude de la fraction libre plasmatique et l'intégration de nouvelles hypothèses physiologiques telles que la théorie de « l'uptake facilité par l'albumine » ont également participé à améliorer les prédictions. Compte tenu des performances du modèle Hepatopac™, nous avons développé une approche innovante basée sur le spotting de précision afin de produire tous types de co-cultures microorganisées. Les co-cultures fabriquées grâce à cette technique démontrent que la méthode est robuste, accessible et simple à mettre en œuvre. Notre méthode de spotting a ensuite été utilisée pour faire évoluer le modèle MPCC et l'ouvrir à de nouvelles applications.

## English Abstract

The selection of the best drug candidates is based on multiparametric choices combining the potential efficacy, ADME characteristics and the safety profile of the new chemical entities. In this sense, the early prediction of pharmacokinetic is essential to guide decision-making and provide a relevant course for projects. Because of its central role in drug disposition, metabolic clearance mediated primarily by the liver is one of the most important parameters. The objective of this project was to improve clearance prediction by focusing on low clearance compounds that are still difficult to study. This work allowed us to expand our knowledge on *in vitro* liver models and usual extrapolation methods but also to discover and develop new prediction strategies. We focused on metabolic clearance and all parameters that impact the predictions. Micropatterned co-cultures (MPCCs) of primary human hepatocytes (Hepatopac™), which stabilizes hepatocytes over several weeks, has been identified as a judicious alternative to routine models when the molecules cannot be studied in conventional monolayer culture. The study of plasma protein binding and the integration of new physiological hypothesis such as the "Albumin-Facilitated Uptake" also contributed to improve the predictions. Given the performance of the Hepatopac™ model, we have developed an innovative approach using a digital dispensing system to spot collagen and produce all types of micropatterned co-cultures. Co-cultures manufactured by this technique demonstrate that the method is robust, accessible and easy to use. Our spotting method was used to evolve the MPCC model and explore new applications.