



**HAL**  
open science

# Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique des médicaments

Florian Simon

► **To cite this version:**

Florian Simon. Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique des médicaments. Sciences pharmaceutiques. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1246 . tel-03612390

**HAL Id: tel-03612390**

**<https://theses.hal.science/tel-03612390>**

Submitted on 17 Mar 2022

**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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1246

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**I'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 205**

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Soutenue publiquement le 27/11/2020, par :

**Florian SIMON**

---

# **Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique des médicaments**

---

Devant le jury composé de :

Pr Olivier FARDEL, Président  
Pr Fanchon BOURASSET, Rapporteuse  
Pr Xavier DELAVENNE, Rapporteur  
Dr Marylore CHENEL, Examinatrice  
Pr Sylvain Goutelle, Examineur  
Pr Michel TOD, Directeur de thèse  
Pr Léa GAY-PAYEN, Co-directrice de thèse



## Remerciements

Je remercie grandement les Professeurs Fanchon Bourasset et Xavier Delavenne pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse, ainsi que les Professeurs Olivier Fardel d'être président du jury et Sylvain Goutelle d'en être examinateur.

A Michel Tod, mon directeur de thèse. Je lui suis extrêmement reconnaissant pour m'avoir fait bénéficier de son expertise scientifique, ses brillantes idées, son soutien sans failles et ses qualités humaines.

A Léa Payen, ma co-directrice de thèse pour m'avoir accueilli dans son équipe pour ma première année de thèse ainsi que son aide pour la réalisation de mes travaux.

A Marylore Chenel, pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour avoir permis le bon déroulement de cette thèse grâce notamment au financement mais également au suivi scientifique régulier mis en place pendant les 3 ans.

Aux différentes personnes de Servier pour leur accueil lors de chacune de mes visites et notamment Maud Benetton pour son suivi et son encadrement lors de la première moitié de mes travaux.

Un grand merci à Jessica et Laëtitia pour leurs conseils, leur patience et leur soutien.

A l'équipe du CBS, Flo, Julie, Julie, Margaux et Gaëlle pour leur accueil et leur sympathie (on oublie l'escape game svp !). A Marine pour m'avoir laissé croire que j'étais fort au squash. A l'équipe de biomérieux, François pour les sessions running, Marine et Chloé pour les afterworks.

Olivier et Fabienne pour leur gentillesse et leur bienveillance quotidienne. A Raymonde pour sa gestion des problèmes et sa joie de vivre. Alicja et Benjamin pour leur bonne humeur, leurs conseils et sa folie (pour le 2<sup>ème</sup> !).

A mes amis et ma famille pour leur soutien durant ces années de thèse.

## Résumé

L'inflammation est un phénomène présent dans de nombreuses pathologies et connu depuis plusieurs décennies pour affecter certains acteurs de la pharmacocinétique des médicaments. Malgré ce constat, rare sont les travaux permettant d'appréhender de manière quantitative son impact.

Les modèles *in vitro* sont des outils pertinents pour améliorer la compréhension des mécanismes *in vivo*. De nombreux travaux ont été réalisés sur des modèles hépatocytaires afin d'explorer l'effet de leur exposition à différentes cytokines. Les données sur la barrière intestinale ou hémato-encéphalique sont plus éparses, c'est pourquoi la première partie des travaux de cette thèse était consacrée aux modifications transcriptomiques et fonctionnelles induites par l'exposition de ces cellules à l'interleukine-6 (IL-6), cytokine ayant montré une action pro-inflammatoire importante dans la littérature.

Dans un deuxième temps, l'impact de l'inflammation *in vivo* a été caractérisé de manière quantitative sur l'activité des CYP2C19 et -3A4 à partir de données cliniques. Un modèle physiologique de pharmacocinétique a été construit permettant de relier le niveau plasmatique de CRP avec leur activité et la pharmacocinétique de leurs substrats.

En conclusion, ces travaux ont permis d'approfondir les connaissances sur les modifications induites par l'IL-6 au niveau intestinal et de la barrière hémato-encéphalique, mais également de construire des modèles prédictifs de l'impact de l'inflammation sur l'activité des CYP2C19 et -3A4, et sur la cinétique de leurs substrats.

Mots clés : Interleukine-6 – Inflammation – Intestin – Barrière hémato-encéphalique – Cytochrome P450 – Modélisation – PBPK

## Abstract

Inflammation is a phenomenon involved in several pathologies and known for decades to affect actors of drugs pharmacokinetics. Despite this observation, only few works have studied its impact in a quantitative way.

*In vitro* models are useful tools to improve *in vivo* mechanisms comprehension. Many studies have been performed on hepatic models in order to explore the effect of different cytokines exposure. Intestinal and blood-brain barrier (BBB) data are scarcer, therefore the first part of this thesis was focused on the transcriptomic and fonctionnal modifications induced by interleukin-6, an important pro-inflammatory cytokine, in intestinal and BBB *in vitro* models.

In a second part, the impact of inflammation *in vivo* on CYP2C19 and -3A4 activity was characterized with clinical data in a quantitative manner. We built a physiologically-based pharmacokinetic model that links the plasmatic C-reactive protein concentration and the pharmacokinetic of both cytochromes' substrates.

In conclusion, these works allowed to improve the knowledege on IL-6 induced modifications in intestine and BBB as well as to built predictive models to predict the impact of inflammation on CYP2C19 and -3A4 activity and the pharmacokinetics of their substrates.

Key words: Interleukin-6 – Inflammation – Intestine – Blood-brain barrier – Cytochrome P450 – Modeling – PBPK

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé.....	4
Abstract .....	5
Table des matières .....	6
Production scientifique liée à la thèse .....	7
Glossaire .....	8
Index des figures .....	10
Introduction générale.....	12
Chapitre 1 : Contexte de la thèse .....	13
I. Inflammation et pharmacocinétique .....	14
1) Inflammation: généralités .....	14
2) Impact de l'inflammation sur les acteurs de la PK .....	17
II. Modélisation et simulation .....	38
1) Modélisation PK.....	38
2) Modélisation basée sur la physiologie .....	39
III. Modèles d'études <i>in vitro</i> des barrières intestinales et hémato-encéphaliques.....	49
1) Modèles <i>In vitro</i> .....	49
2) Méthodes d'étude .....	51
Objectifs et stratégie de la thèse.....	58
Chapitre 2: Impact de l'interleukine-6 sur l'intestin .....	59
Chapitre 3 : Impact de l'interleukine-6 sur la barrière hémato-encéphalique .....	75
Chapitre 4 : Prédiction de l'impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique de substrats des CYP2C19 et -3A4 par modélisation.....	117
Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives.....	150
Bibliographie.....	157

## Production scientifique liée à la thèse

### Article publié

Simon F, Garcia J, Guyot L, Guitton J, Vilchez G, Bardel C, et al. Impact of Interleukin-6 on Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Intestinal Cells. *AAPS J.* 2019;22(1):16.

### Article accepté

Simon F, Guyot L, Garcia J, Vilchez G, Bardel C, Chenel M, et al. Impact of interleukin-6 on drug transporters and permeability in the hCMEC/D3 blood-brain barrier model. *Fundam Clin Pharmacol.* 2020.

### Communication orale

Simon F, Chenel M, Payen L, Tod M, Octobre 2019. A generic PBPK model for predicting the impact of inflammation on midazolam pharmacokinetics. The GMP (Groupe de Métabolisme et Pharmacocinétique) Open Meeting, Lyon, France.

### Communications affichées

Simon F, Garcia J, Guyot L, Guitton J, Chenel M, Tod M, Payen L, Juin 2019. Impact of interleukin-6 on hepatic and intestinal drug metabolizing-enzymes and transporters. Abstract PM2-029. Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (SFPT), Lyon, France.

Simon F, Garcia J, Guyot L, Guitton J, Chenel M, Tod M, Payen L, Juin 2019. Impact of interleukin-6 on hepatic and blood brain barrier transporters. Abstract PM2-030. Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (SFPT), Lyon, France.

Simon F, Chenel M, Payen L, Tod M, Juin 2019. A generic PBPK model for predicting the impact of inflammation on midazolam pharmacokinetics. Abstract 9175.28<sup>th</sup> Population Group Approach in Europe conference (PAGE), Stockholm, Suède.

## Glossaire

- BHE : barrière hématoencéphalique
- CAM : protéine d'adhésion moléculaire
- CAR : constitutive androstanereceptor
- C/EBP $\beta$  : protéines de liaison activatrice de CCAAT
- CL : clairance
- CLint : clairance intrinsèque
- CRP : protéine C réactive
- CYP : cytochrome
- Da : dalton
- fu : fraction libre
- fu<sub>t</sub> : fraction libre dans les tissus
- gp : glycoprotéine
- IAM : interaction médicamenteuse
- Ig : immunoglobuline
- IL : interleukine
- IL-6R : récepteur à l'interleukine-6
- IL-6Rs : récepteur soluble à l'interleukine-6
- IFN : interféron
- IV : intraveineuse
- Ka : constante d'association
- Jak : janus kinase
- LAP : liver enriched activator protein
- LPS : lipopolysaccharide
- LES : lupus systémique érythémateux
- mAb : anticorps monoclonal
- NF $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B

- PBPK : physiologically based pharmacokinetics
- Pgp : P-glycoprotéine
- PK : pharmacocinétique
- PPAR : peroxisome proliferator-activated receptors
- PT : protéine thérapeutique
- $P_t$  : concentration totale de protéine de liaison
- PXR : pregnane X receptor
- Q : débit sanguin
- RCPG : récepteur couplé aux protéines G
- RNA seq : séquençage d'ARN
- ROS : espèce réactive à l'oxygène
- RXR : retinoid X receptor
- SAA : protéine amyloïde A
- TNF : facteur de nécrose tumoral
- Vd : volume de distribution
- Vp : volume de plasma
- Vt : volume de tissu
- ZO : zonula occludens

## Index des figures

Figure 1 – Représentation schématique du transport et du métabolisme des médicaments. CYP450 : Cytochrome P450 ; GST: Glutathion S-transférase; MRP: multi-drugresistance protéine; P-gp : P-glycoprotéine ; X : médicament ; XOH et XOR : métabolites de X [10].	17
Figure 2 – Différents mécanismes de passage membranaire des médicaments [14].	19
Figure 3 – Impact de l'exposition d'échantillons hepaRG à 10 ng/mL d'IL-6, 5 ng/mL d'IL-1 $\beta$ et 10 ng/mL de TNF $\alpha$ sur le niveau d'expression ARNm, mesurés par RTqPCR, de gènes d'intérêts pour la pharmacocinétique des médicaments. La heat-map présente les log2 des changements relatifs des niveaux d'expression. Des tests de student groupés avec correction de Bonferroni ont été effectués ; *P , 0.05, **P , 0.01, ***P , 0.001, ****P , 0.0001 (Figure adaptée de Klein et al. [19]).	21
Figure 4 – Exemple hypothétique de l'effet d'une hausse de l'inflammation (gauche) ou d'un traitement anti-cytokine (droite) sur les profils pharmacocinétiques d'un médicament substrat de CYP P450 (Figure adaptée de Morgan et al. [36] et de Coutant et al. [37]).	22
Figure 5 – Illustration de différentes voies de régulations des gènes par les médiateurs de l'inflammation [53].	24
Figure 6 – Moyenne ( $\pm$ SD) des profils de concentrations de simvastatine en fonction du temps suite à une administration de 40 mg par voie orale 1 jour avant et 7 jours après une injection sous-cutanée de 200 mg de sarilumab (N=19) [72].	26
Figure 7 – Concentrations plasmatiques moyennes ( $\pm$ SD) d'albumine et de d' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide dans différentes pathologies inflammatoires [37].	27
Figure 8 – Composition et organisation spatiale des jonctions cellulaires d'une cellule épithéliale [103].	30
Figure 9 – Représentation schématique du transport et recyclage des IgG et de l'albumine par le FcRn dans un cellule endothéliale (A), épithéliale (B) et dendritique (C) [119].	32
Figure 10 – Relation entre la demi-vie des IgG et leur concentration dans le serum [121].	34
Figure 11 – Transport des IgG et de l'albumine dans les reins. La partie A décrit le glomérule rénal et la partie B la réabsorption tubulaire [119].	35
Figure 12 – Représentation de la clairance du belimumab en fonction de la protéinurie à partir d'une analyse de population sur des sujets de phase III [133].	36
Figure 13 – Modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie [147].	40
Figure 14 – Représentation schématique d'un modèle PBPK [148].	41
Figure 15 – Représentation des modèles limités par la perfusion (a) et par la perméabilité (b) [148].	42
Figure 16 – Représentation des applications les plus communes de la modélisation PBPK [155].	43

Figure 17 – Représentation schématique de la procédure à adopter selon Peters et al. afin d’optimiser un modèle PBPK à partir de données IV [156]. .....	45
Figure 18 – Représentation schématique de la préparation du modèle EpilIntestinal [164]. .....	50
Figure 19 – Coupe histologique de villosités du tissu EpilIntestinal [164]. .....	50
Figure 20 – Relation entre l’expression du niveau d’expression protéique membranaire dans le modèle hCMEC/D3 et dans des micro-vaisseaux cérébraux humains [171]. .....	51
Figure 21 – Principe général d’un cycle de PCR [173]. .....	52
Figure 22 – Différentes étapes de préparation de librairie et de séquençage [172]. A) Fragmentation de l’ADN et ligation des adaptateurs aux extrémités des fragments. B) Fixation des fragments à la flowcell et amplification par PCR. C) Insertion des bases, lecture de la fluorescence et transformation en fichier texte. ....	54
Figure 23 – Représentation d’une étude d’accumulation intracellulaire [162]. .....	55
Figure 24 – Niveaux d’expression relatif moyen d’ARNm du CYP3A4, déterminé par RTqPCR et normalisé par le gène de ménage RPLP0, après exposition d’hepaRG à 5, 10 et 20 ng/mL pendant 24, 48 et 72h par rapport échantillons contrôles (échantillon par condition N=3, expérience indépendante N=1). Les rapports de niveaux d’expression sont calculés par la méthode de $\Delta\Delta Ct$ . .....	60

## Introduction générale

L'inflammation est la réponse physiologique de l'organisme à une agression le menaçant, elle se caractérise par différentes réactions telles que la vasodilatation des vaisseaux, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le recrutement de leucocytes et la libération de médiateurs tels que des cytokines. Lorsque ces cytokines se fixent à leurs récepteurs elles déclenchent des cascades de phosphorylations qui diminuent l'action de facteurs de transcription impliqués dans la synthèse d'enzymes du métabolisme et de transporteurs membranaires de médicaments.

Différents travaux effectués sur lignées cellulaires hépatocytaires et hépatocytes humains ont mis en évidence qu'une exposition à des cytokines (e. g. IL-6, IL-1 $\beta$  ou TNF $\alpha$ ) entraînait une baisse d'expression des transcripts et protéines ainsi qu'une baisse de l'activité des cytochromes P450 et transporteurs de médicaments (tels que Pgp ou MRPs).

Ces observations *in vitro* peuvent avoir un impact sur la pharmacocinétique des médicaments *in vivo*. Lors d'un épisode inflammatoire, l'augmentation du niveau cytokinique entraîne une baisse de la clairance métabolique des cytochromes ce qui diminue l'élimination de leurs substrats. Si elle est trop importante, l'augmentation de l'exposition à ces médicaments peut conduire à des toxicités et un surdosage. A l'inverse lorsque des patients sont atteints de pathologies inflammatoires la prise d'un traitement anti-cytokinique peut, en diminuant le niveau de cytokine, lever la répression des cytochromes et rétablir leur niveau de clairance métabolique. Si ces patients prennent un co-traitement substrat de cytochromes, la clairance de ce médicament risque d'augmenter et ses concentrations plasmatiques diminuer. Ceci peut conduire à une sous-exposition et une perte d'efficacité du traitement.

La première partie de ces travaux consistait à étudier l'impact de l'inflammation au niveau intestinal et de la barrière hémato-encéphalique, les données étant moins exhaustives pour ces organes qui jouent un rôle clef dans l'absorption et les effets centraux des médicaments, qu'au niveau hépatique. La seconde partie avait pour objectif de quantifier l'impact de l'inflammation sur l'activité des cytochromes en développant un modèle prédictif permettant de prédire le profil pharmacocinétique d'un médicament substrat pour un niveau d'inflammation donné.

## Chapitre 1 : Contexte de la thèse

## I. Inflammation et pharmacocinétique

### 1) Inflammation: généralités

L'inflammation est la réponse physiologique de l'organisme à une agression dont les causes peuvent être multiples : agent infectieux (virus, bactérie, parasite, champignon), agent physique (chaleur, froid, radiation), agent chimique (toxine, venin), corps étranger ou encore un dysfonctionnement immunitaire. Elle correspond à la mise en place de l'ensemble des processus de reconnaissance, de destruction et d'élimination des substances qui lui sont étrangères. Cela se traduit par une hausse du débit et de la perméabilité vasculaire, un recrutement et une accumulation de leucocytes, ainsi que la libération de médiateurs de l'inflammation. Ces médiateurs vont entraîner l'activation de cellules résidentes (endothéliales, fibroblastes, macrophages), le recrutement de leucocytes (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles) ou encore l'augmentation de l'expression de protéines d'adhésion cellulaires (CAMs). Parmi ces médiateurs on retrouve les prostaglandines, le monoxyde d'azote, le système du complément ainsi que les cytokines. Ces dernières induisent la synthèse de protéines de la phase aiguë telles que la protéine C-réactive (CRP) et la protéine amyloïde A (SAA). Une inflammation aiguë non contrôlée peut devenir chronique et ainsi contribuer à de nombreuses pathologies [1].

#### Protéine C réactive

La protéine C réactive (CRP) est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation synthétisée principalement par le foie. C'est une protéine pentamérique constituée de 5 sous-unités identiques liées entre elles de façon non-covalentes avec un poids moléculaire d'environ 118 kDa. Sa production hépatique est stimulée principalement par l'interleukine(IL)-6 et possède une demi-vie d'environ 19h [2]. Sa concentration plasmatique chez les individus sains est inférieure à 10 mg/L et peut atteindre plusieurs centaines de milligrammes par litre dans certaines pathologies [3]. Sa mesure est fréquemment effectuée, et bien que non-spécifique, elle peut aider au diagnostic de différentes pathologies. C'est par exemple un très bon indicateur de la majeure partie des infections microbiennes, très utile dans le diagnostic des septicémies néonatales ou de méningites. Elle peut également être un facteur de pronostic de la maladie, par exemple dans la polyarthrite rhumatoïde, ou encore un facteur d'évaluation du risque d'infarctus du myocarde. Elle possède la capacité de lier des pathogènes (via la phosphorylcoline) présents dans le plasma et d'induire l'activation du système du complément [4].

## Cytokines

Les cytokines constituent une superfamille protéique qui participe au réseau de communication entre cellules immunitaires et permet une réponse rapide, spécifique et globale pour protéger l'organisme. Leur masse moléculaire est comprise entre 6 et 60 kDa. On en compte une centaine, groupées en quatre catégories selon leurs propriétés structurales et fonctionnelles : facteurs de nécrose tumorale (TNFs), interférons (IFNs), interleukines (ILs) et chimiokines [5].

Les interleukines forment un grand groupe de protéines qui entraînent de nombreuses réactions dans différents tissus en se liant à leurs récepteurs. Elles jouent un rôle clef dans l'activation et la différenciation des cellules immunitaires, ainsi que dans leur prolifération, maturation, migration et adhésion. Leurs propriétés peuvent être pro- ou anti-inflammatoires. La majeure partie de leur ARNm est instable, les molécules sont rapidement sécrétées une fois synthétisées. Différentes interleukines peuvent avoir des fonctions redondantes (par exemple l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 sont des facteurs de croissance et activent la différenciation des lymphocytes B). Elles peuvent influencer la synthèse et l'action d'autres cytokines (par exemple l'IL-1 promeut l'activation des lymphocytes qui libéreront l'IL-2). Elles possèdent des fonctions paracrines et autocrines et peuvent avoir une action locale ou loin de leur site de sécrétion (par exemple l'IL-1 qui va agir au niveau du système nerveux central en tant que pyrogène) [6].

Les TNF représentent une famille importante de cytokines, ils jouent un rôle à la fois dans l'immunité innée et adaptative. Un des principaux est le TNF $\alpha$ , il est produit principalement par les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T. Son plus puissant inducteur est le lipopolysaccharide (LPS). Il joue un rôle dans l'activation des cellules endothéliales et la motilité lymphocytaire, c'est un pyrogène et c'est également un acteur important de l'inflammation aiguë et chronique [5].

Les IFNs forment un groupe de cytokines divisé en IFN de type I (IFN $\alpha$  et  $\beta$ ) ayant une action dans la réponse immunitaire innée et IFN de type II (IFN $\gamma$ ) jouant un rôle dans l'activation des macrophages [5].

Les chimiokines sont une famille de cytokines à faible poids moléculaires qui régulent la migration des leucocytes *via* sept récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Elles sont divisées en quatre familles différentes en fonction de la position de leur résidus cystéines : C-, CC-, CXC- ou CX<sub>3</sub>C-chimiokine [7]. Leurs structures étant proches elles peuvent avoir des fonctions communes. Elles possèdent souvent plusieurs récepteurs. Leur liaison à ces récepteurs active différentes voies de signalisation intracellulaires augmentant la motilité des leucocytes. Certaines vont également augmenter l'expression

d'intégrines au niveau des cellules endothéliales favorisant l'attachement des leucocytes à ces dernières [8].

### Interleukine-6

L'IL-6 est exprimée par de nombreuses cellules telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les hépatocytes, les cellules de moelle osseuse, les cellules du système phagocytaire mononucléé, les lymphocytes B et T. L'IL-6 est impliquée dans l'hématopoïèse, dans la maturation des lymphocytes-B en cellules productrices d'anticorps, dans l'activation des lymphocytes T, dans la sécrétion de protéines de la phase aiguë de l'inflammation par le foie (en coopération avec l'IL-1). C'est une glycoprotéine(gp) dont la masse varie de 21 à 28 kDa en fonction des modifications post-traductionnelles. Son récepteur est un hétéro-dimère composé d'une chaîne alpha spécifique, IL-6R (gp80), et d'une chaîne  $\beta$ , gp130, qui agit comme transducteur de signal. gp130 est exprimée de façon ubiquitaire tandis qu'IL-6R a une expression cellulaire restreinte (hépatocytes, phagocytes et certains lymphocytes). La transduction du signal s'effectue après dimérisation du complexe IL-6-IL-6R-gp130, qui entraîne la phosphorylation, *via* les protéines janus-kinases (Jak), du facteur de transcription STAT3 impliqué dans l'expression de nombreux gènes de l'inflammation. En plus d'IL-6R qui est membranaire, il existe une forme soluble de ce récepteur (sIL-6R) générée par protéolyse de la forme membranaire. L'IL-6 peut se lier à sIL-6R et induire un signal via gp130 sur toutes les cellules, même celles dépourvues d'IL-6R, on parle alors de trans-signalisation [5, 8]. Il existe également une forme soluble de gp130 qui bloque la trans-signalisation et a donc une activité anti-inflammatoire.

## 2) Impact de l'inflammation sur les acteurs de la PK

### a. Impact sur les enzymes et transporteurs de médicaments

#### A. Généralités

- Métabolisme des médicaments

Le métabolisme d'un médicament correspond à sa prise en charge par le système de biotransformation de l'organisme pour former un ou plusieurs métabolites qui peuvent être actifs ou inactifs. Sa structure est modifiée afin de rendre la molécule plus hydrosoluble et faciliter son excrétion. La biotransformation peut avoir lieu dans différents tissus et organes, les principaux sites sont le foie puis l'intestin. Il existe deux types de réactions : les réactions de phase I dites de « fonctionnalisation » et les réactions de phase II dites de « conjugaison » (Figure 1). Les réactions de phase I correspondent à différents types d'oxydations qui rendent les molécules plus polaires ; elles pourront ensuite éventuellement être prises en charge par des enzymes de phase II qui permettent l'ajout d'un groupement hydrophile. Les cytochromes P450 (CYPs) correspondent à une superfamille d'enzymes qui catalyse la majeure partie des réactions de phase I. 75% des médicaments à métabolisme hépatique sont pris en charge par ces CYPs. Le génome humain compte 57 gènes codant pour des CYPs mais seulement une douzaine, appartenant aux familles CYP1, 2 et 3, métabolisent la majeure partie des médicaments [9]. Il n'existe pas de corrélation entre l'abondance de CYPs dans le foie ou l'intestin et la proportion de médicaments métabolisés par les CYPs.

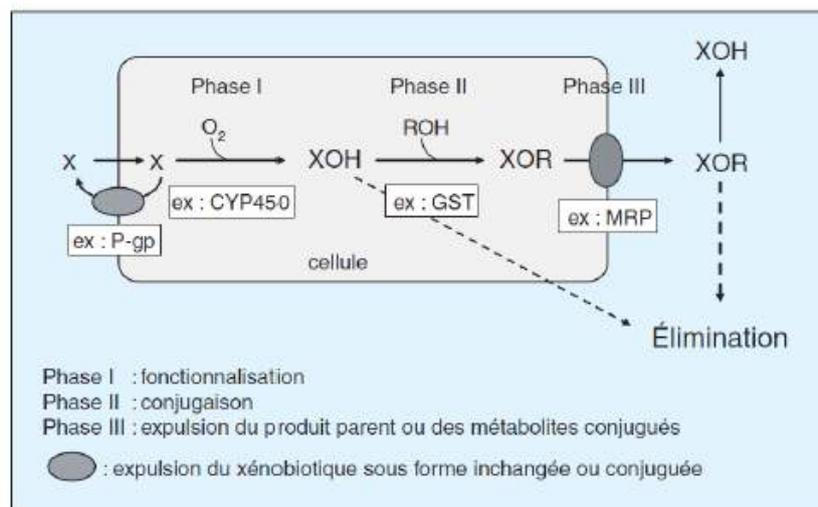


Figure 1 – Représentation schématique du transport et du métabolisme des médicaments. CYP450 : Cytochrome P450 ; GST: Glutathion S-transférase; MRP: multi-drugresistance protéine; P-gp : P-glycoprotéine ; X : médicament ; XOH et XOR : métabolites de X [10].

D'autres enzymes de phase I participent dans une moindre mesure au métabolisme des médicaments : flavine mono-oxygénase, époxydes hydrolases, estérases, alcool-déshydrogénases, aldéhyde-déshydrogénases, NADPH-quinone oxydoréductase et monoamines oxydases.

Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison, il s'agit du transfert d'un groupement (glucuronide, sulfate, acétyl, etc) sur la partie fonctionnelle générée lors de la première phase. Les enzymes de phase II sont des transférases correspondant au type de groupement qui a été conjugué [11].

- Passage membranaire et transporteurs

Le passage des membranes peut s'effectuer *via* différents mécanismes : diffusion passive, diffusion facilitée ou transport actif (Figure 2). La diffusion passive concerne essentiellement les molécules lipophiles à faible poids moléculaire. La vitesse de passage est régie par la loi de Fick. La diffusion facilitée s'effectue grâce à des protéines transmembranaires ; le transport dépend du gradient électrochimique de la molécule, c'est à dire du gradient de concentration et du potentiel électrique à travers la membrane. Le transport actif s'effectue également grâce à des protéines membranaires et est couplé à une source d'énergie (gradient ionique ou hydrolyse d'ATP). La direction du transport est indépendante du gradient de concentration de la molécule transportée. Les transporteurs impliqués sont divisés en 2 superfamilles, les transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette ») et SLC (« Solute carrier »). La superfamille ABC est divisée en plusieurs sous-familles notées de A à F [12]. Ces transporteurs fonctionnent grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP et sont impliqués dans l'efflux de molécules (passage de l'intra- vers l'extracellulaire). La superfamille SLC est également divisée en différentes sous-familles notées de 1 à 51 [12]. Ces transporteurs sont couplés à un gradient ionique et sont généralement impliqués dans l'influx de molécules (passage de l'extra- vers l'intracellulaire). Les transporteurs de ces 2 superfamilles sont présents dans les différents organes et tissus de l'organisme (intestin, foie, reins, barrière hémato-encéphalique (BHE), etc). Ils peuvent donc être impliqués dans les différentes étapes de la PK des médicaments, notamment l'absorption et la distribution [13].

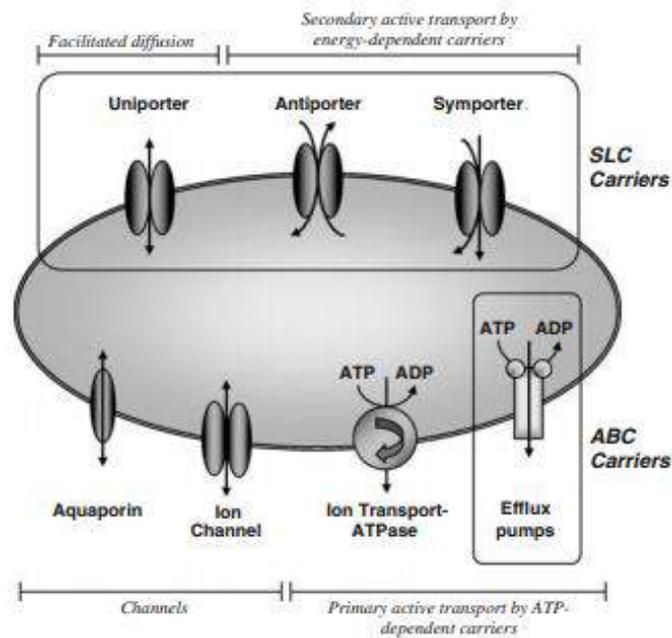


Figure 2 – Différents mécanismes de passage membranaire des médicaments [14].

## B. Effet de l'inflammation

Différents mécanismes peuvent être responsables de la variabilité inter-individuelle des caractéristiques pharmacocinétiques d'un médicament. La morphologie du patient (importance de la masse grasseuse), son âge (enfant ou personne âgée), son éthnie, la pharmacogénétique, les interactions avec la nourriture ou avec d'autres médicaments ainsi que les modifications physiologiques (grossesse) ou pathologiques (insuffisance rénale, hépatique ou inflammation), sont autant de facteurs susceptibles d'entraîner des variations [15].

Depuis de nombreuses années l'inflammation est connue pour affecter la pharmacocinétique des médicaments et ce par différents biais, notamment en impactant leur métabolisme [16-18]. Le mécanisme moléculaire exact mal connu, mais l'hypothèse faisant actuellement le plus consensus implique une baisse transcriptionnelle des enzymes du métabolisme *via* la fixation des cytokines à leur récepteur.

### i. Cytokines et études *in vitro*

L'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-22, l'IL-6, l'IFN $\gamma$  et le TNF $\alpha$  ont été étudiés sur de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* et une baisse d'expression et/ou d'activité des CYPs majeurs (1A2, 2B6, 2C19, 2C9, 2D6 et 3A4) a été observée [19-23]. Toutes ces cytokines n'impactent pas exactement les mêmes gènes et n'exercent pas leur effet avec la même magnitude [24, 25], des voies de régulations différentes sont donc certainement utilisées. Certaines cytokines, comme l'IL-18, n'ont pas montré d'effet [26]. Un pré-

traitement d'une lignée hépatocytaire par l'IL-6 augmente significativement la cytotoxicité du géfitinib et du paclitaxel tous deux métabolisés par le CYP3A4 [27], ces baisses de clairances sont donc susceptibles d'induire des toxicités.

Une répression de certaines enzymes de phase II a également pu être observée en cas d'inflammation, sur lignée cellulaire hépatocytaires (hepaRG) et hépatocytes humains exposées à l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 ou au TNF $\alpha$ , avec un effet plus marqué de cette dernière (Figure 3) [19]. Des modifications de certaines UGT ont également été rapportées chez des patients atteints de diverses pathologies hépatiques ayant un score d'inflammation élevé ou après administration de LPS chez la souris [28, 29].

Différents travaux ont également mis en évidence l'impact de l'inflammation sur l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments. Après exposition d'hépatocytes humains et hepaRG à différentes cytokines, les principaux transporteurs ABC et SLC sont dérégulés [22, 30-32]. Comme pour les CYPs, chaque cytokine a un effet différent.

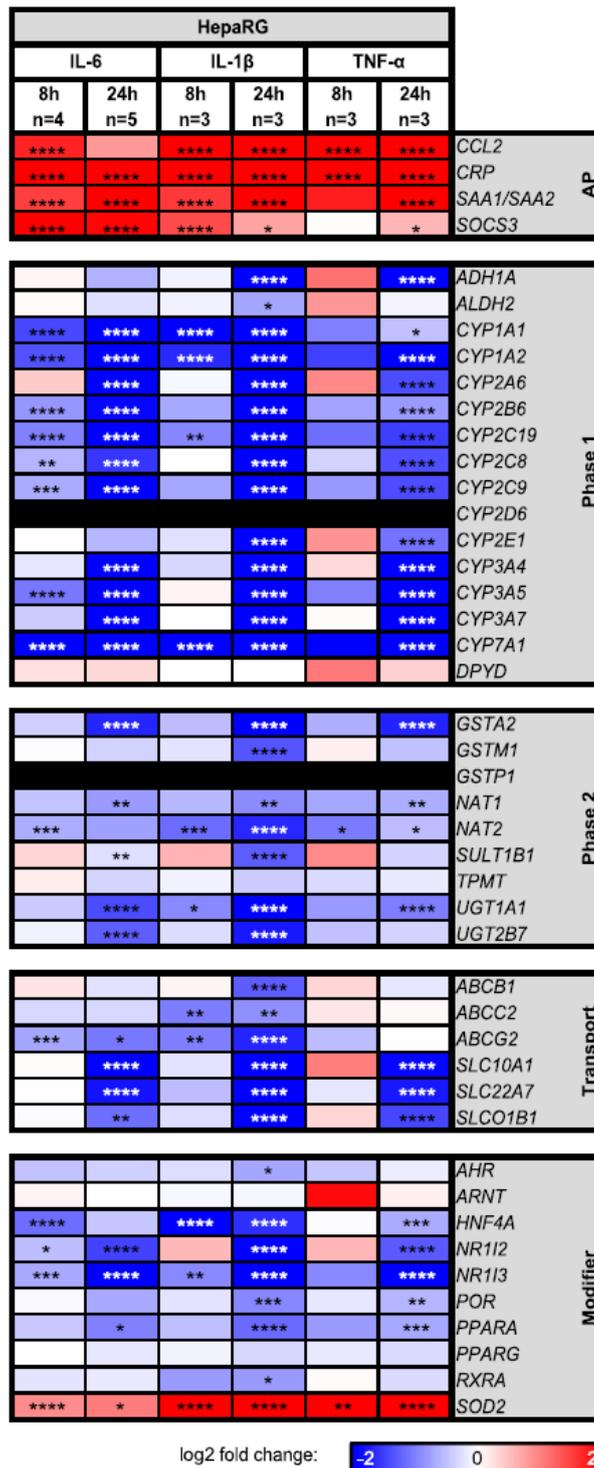


Figure 3 – Impact de l'exposition d'échantillons hepaRG à 10 ng/mL d'IL-6, 5 ng/mL d'IL-1 $\beta$  et 10 ng/mL de TNF $\alpha$  sur le niveau d'expression ARNm, mesurés par RTqPCR, de gènes d'intérêts pour la pharmacocinétique des médicaments. La heatmap présente les log2 des changements relatifs des niveaux d'expression. Des tests de student groupés avec correction de Bonferroni ont été effectués ; \*P, 0.05, \*\*P, 0.01, \*\*\*P, 0.001, \*\*\*\*P, 0.0001 (Figure adaptée de Klein et al. [19]).

L'utilisation d'anticorps ciblant ces cytokines ou leurs récepteurs permet de diminuer les dérégulations induites. L'ajout d'un anticorps anti-IL6 et de tocilizumab (anti-IL6R) rétablit l'expression et l'activité du CYP1A2 et -3A4 [27, 33]. De la même manière, l'administration d'un antagoniste du récepteur à IL-

1 $\beta$  ou d'un modulateur de liaison diminue l'effet sur l'expression et l'activité du CYP3A4 et OATP [27, 34].

L'exposition au ruxolitinib ou au tofacitinib qui sont des inhibiteurs de Jak1/2 et Jak1/3 (activées dans la voie de signalisation de l'IL-6) permet d'inhiber la baisse d'expression des CYPs et transporteurs induite par l'IL-6. L'effet observé est plus puissant que celui avec les anticorps monoclonaux [35]. Cette levée de répression est retrouvée lorsque les cellules sont exposées à l'IL-22 [22] mais pas à l'IL-1 $\beta$ , la voie de régulation est donc différente [35].

L'augmentation de l'utilisation de protéines thérapeutiques (PT) a attiré l'attention des agences réglementaires sur les potentielles interactions médicamenteuses (IAM) avec les petites molécules. Les PTs ayant une action anti-cytokines sont donc susceptible de rétablir un niveau de CYPs ou de transporteurs et donc d'augmenter la clairance de leur substrat (Figure 4).

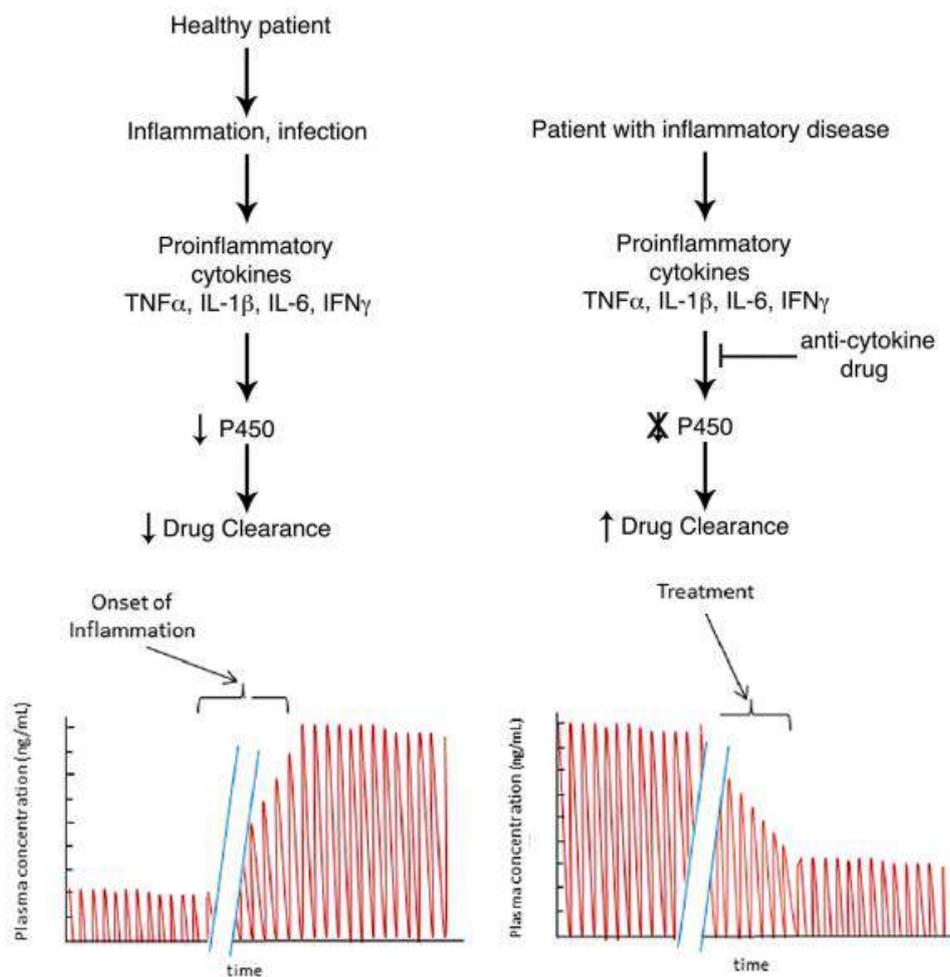


Figure 4 – Exemple hypothétique de l'effet d'une hausse de l'inflammation (gauche) ou d'un traitement anti-cytokine (droite) sur les profils pharmacocinétiques d'un médicament substrat de CYP P450 (Figure adaptée de Morgan et al. [36] et de Coutant et al. [37]).

## ii. Facteurs de transcription et récepteurs nucléaires

Le mécanisme de la baisse transcriptionnelle des enzymes et transporteurs des médicaments est très complexe et implique de nombreux facteurs de transcription (Figure 5) comme par exemple les protéines C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer binding protein). L'expression de la forme tronquée de C/EBP $\beta$ -LIP est augmentée lors de la stimulation d'hépatocytes par du LPS [38] ou des cytokines pro-inflammatoires [39]. LAP (Liver enriched activator protein) se lie à un site amplificateur du CYP3A4 et active sa transcription tandis que LIP antagonise son action [40]. Le ratio LAP/LIP influence donc la régulation du CYP3A4. Jover et al. ont montré que l'IL-6 augmentait la traduction de C/EBP $\beta$ -LIP [41].

L'activation de NF- $\kappa$ B par des cytokines pro-inflammatoires ou un stress oxydant est observée dans différentes pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, le cancer, le diabète [42]. NF- $\kappa$ B peut aussi réguler l'expression des CYPs indirectement par répression mutuelle avec d'autres récepteurs nucléaires ou directement en se liant aux régions promotrices des gènes des CYPs. NF- $\kappa$ B se lie *via* sa sous-unité p65 à RXR et antagonise l'action de PXR [43]. D'autres facteurs de transcription RXR-dépendants tels que CAR et PPAR peuvent être antagonisés de la même manière [42]. La répression mutuelle entre NF- $\kappa$ B et les récepteurs aux glucocorticoïdes inhibe l'expression de CAR [44]. La sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B se lie et forme un complexe inactif avec AhR qui devient incapable de migrer dans le noyau [45].

Une baisse des niveaux d'expression d'ARNm des récepteurs nucléaires tels que RXR, PXR et CAR hépatiques et intestinaux a été observé chez des rongeurs traités avec du LPS [46-48].

Différents travaux ont également montré l'implication des voies de signalisation MAPKs dans l'expression de CYPs en modulant l'expression de AhR, PXR et CAR. Ceci implique JNK et p38 MAPK ainsi que des voies non-MAPK comme PKC et PI3K [49]. IL-1 $\beta$  active JNK qui phosphoryle RXR supprimant l'activation du promoteur de Ntcp [50]. Il a également été montré que JNK était impliqué dans l'export de RXR $\alpha$  vers le cytoplasme [47]. La voie de signalisation MAPK/ERK altère la translocation de CAR dans le noyau [51]. De plus, la diminution d'expression des enzymes et transporteurs observée sur des hépatocytes murins exposés au LPS est atténuée avec un traitement par un inhibiteur de JNK [52].

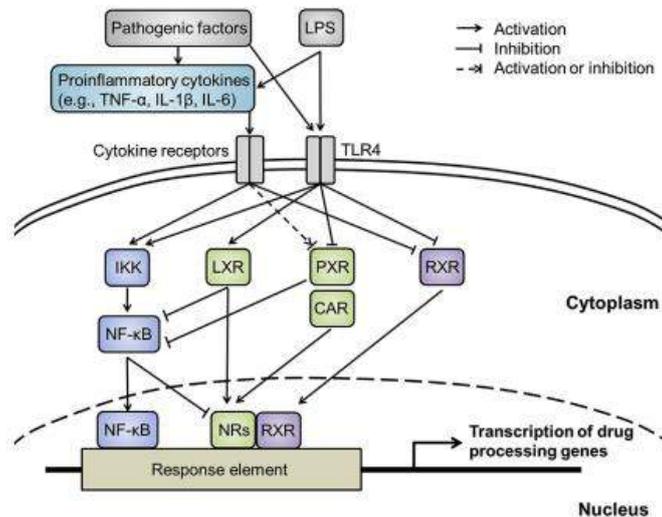


Figure 5 – Illustration de différentes voies de régulations des gènes par les médiateurs de l'inflammation [53].

### iii. mi-ARN

Les mi-ARN affectent la stabilité post-transcriptionnelle des ARNm soit en diminuant leur traduction soit par dégradation. miR-130b est surexprimé en cas d'inflammation [54]. Son impact sur des gènes liés à l'ADME des médicaments a été étudié sur lignée hepaRG et a montré une baisse de l'expression de CAR, FXR $\alpha$ , CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 et GSTA2. Il affecte également l'activité de ces CYPs d'au moins 30% [55]. Des foies de donneurs avec CRP élevées ont montré une induction d'autres mi-ARN tels que miR-155, miR-224, miR-543, miR-6807 et miR-452. L'exposition de ces différents mi-ARN à des hepaRG entraîne une baisse d'expression d'ARNm de transporteurs, d'enzymes de phase I et II, ainsi que des facteurs de transcription. Celui montrant le plus d'effet est le miR-155, une baisse d'expression protéique et d'activité des principaux CYPs a également été constatée suite à son exposition aux hepaRG [56].

### iv. Etudes cliniques

De nombreuses études cliniques ont été conduites mettant en évidence l'influence des pathologies infectieuses ou inflammatoires sur le métabolisme des médicaments.

En 1980, 11 enfants asthmatiques traités avec une dose stable de théophylline ont développé des toxicités suite à un épisode de grippe (influenza B). La toxicité a été imputée à l'influenza B causant une baisse de la concentration de CYP1A2 et donc une baisse de clairance de la théophylline. Une hausse des concentrations à l'équilibre de 1.5 à 4 fois a été observée [57]. Dans d'autres études chez des patients vaccinés au BCG, la demi-vie de la théophylline augmentait significativement [58], ou encore, chez des patients septicémiques avec des défaillances multi-organes la clairance baissait de 10

à 66% par rapport à des volontaires sains [59]. Enfin, lors d'atteintes par hépatites B [60] et C [61], des baisses de clairance de théophylline de 33-81% et 26% étaient également observées suite à des injections d'IFN $\alpha$  et IFN $\beta$ . D'autres CYPs comme le 3A4 ont également montré une altération de leur activité en clinique. En effet, le test respiratoire à l'érythromycine, qui permet d'évaluer l'activité du CYP3A4 *in vivo* [62], décrit une baisse de 30% chez les patients cancéreux avec une inflammation en phase aiguë (CRP>10mg/L) par rapport au groupe non inflammé [63]. De plus, une étude chez des individus sains révèle que le niveau de production d'IFN $\gamma$  induit par la vaccination contre la grippe (influenza B) est inversement corrélé au résultat du test à l'érythromycine [64]. De la même manière, le métabolisme de l'alprazolam est inversement corrélé au niveau de CRP chez les patients hémodialysés avec une inflammation persistante, suggérant une baisse d'activité du CYP3A4 [65]. L'IL-6 et la CRP ont été mesurées chez des patients subissant une greffe de moelle osseuse. Les valeurs étaient normales au moment de la greffe puis un pic était observé après 10 jours (CRP moyenne atteignant 179 mg/L), suite à ce pic les concentrations de cyclosporine augmentaient en moyenne de plus de 3 fois [66]. Cette hausse peut s'expliquer par une baisse du métabolisme mais également par une baisse d'activité de la Pgp au niveau intestinal qui augmenterait l'absorption. Chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive, la baisse du métabolisme de la méphénytoïne (substrat du CYP2C19) et de la caféine (CYP1A2) est corrélée avec le niveau d'IL-6 et de TNF $\alpha$  [67]. L'administration de peginterferon- $\alpha$ -2b augmente également l'exposition à la caféine de 39% chez des patients atteints d'hépatites C et au dextrometorphan (substrat du CYP2D6) de 103% chez des individus sains [68].

De nombreux médicaments biologiques agissent sur les voies de l'inflammation, ils peuvent donc altérer l'expression ou l'activité des enzymes du métabolisme et ainsi entraîner des IAM avec des petites molécules substrats des enzymes impactées. Un certain nombre d'IAMs a déjà été mis en évidence. Le muromonab (anticorps anti-récepteur-CD3 des lymphocytes T) et le basiliximab (anticorps anti-récepteur à l'IL-2) augmentent la concentration de cyclosporine lorsqu'elle est co-administrée [69, 70]. L'administration de tocilizumab, un anti-IL-6, ou de sarilumab, un anti-IL-6R $\alpha$ , à des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde diminue significativement l'exposition à la simvastatine en rétablissant le niveau de CYP3A4 grâce à la baisse d'inflammation provoquée (Figure 6) [71, 72]. Dans un rapport de cas la prise d'adalimumab, un anti-TNF $\alpha$ , chez une patiente ayant un psoriasis diminuait les concentrations de duloxétine qui est métabolisée par le CYP2D6 [73]. Enfin, la concentration maximale et l'AUC du métabolite actif de l'irinotecan (SN-38) ont diminué après la prise de dalotuzumab (anticorps anti-récepteur IGF-1) lors d'une étude de phase I chez patients atteints de cancer colorectaux [74].

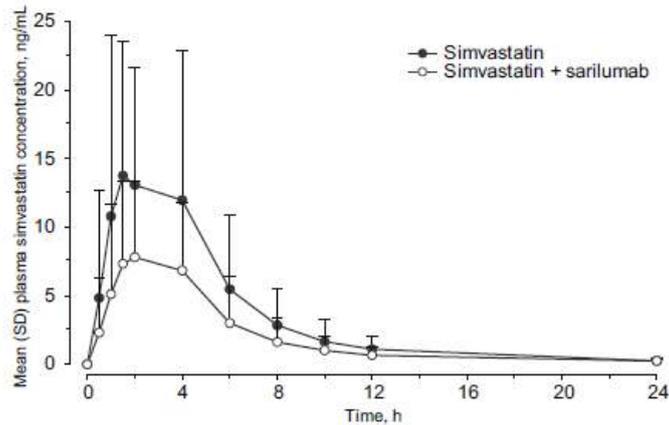


Figure 6 – Moyenne ( $\pm$ SD) des profils de concentrations de simvastatine en fonction du temps suite à une administration de 40 mg par voie orale 1 jour avant et 7 jours après une injection sous-cutanée de 200 mg de sarilumab (N=19) [72].

Cependant, de nombreuses études n'ont pas montré d'effet clinique sur des substrats de CYPs lors de l'administration de protéines thérapeutiques ciblant des cytokines ou leurs récepteurs [75-77], ceci dépend essentiellement de la sévérité de la maladie et du niveau d'inflammation avant la prise.

Les études mettant en évidence un impact clinique de l'inflammation sur des transporteurs sont beaucoup plus rares. D'une part, à cause du manque de spécificité des médicaments substrats pour un seul transporteur [78]. D'autre part, il peut être assez difficile de distinguer l'impact sur le transport de celui sur le métabolisme, par exemple dans l'étude précédemment présentée chez des patients subissant une greffe de moelle osseuse et dont la concentration en cyclosporine, substrat de P-gp et du CYP3A4, voyait sa concentration augmenter de plus de 3 fois en moyenne[66]. Dans cet optique différents travaux ont permis de mettre au point des approches par cocktails de substrats en essayant d'être le plus spécifique possible. Par exemple un cocktail comprenant la digoxine (Pgp), le furosémide (OAT1 et 3), la metformine (OCT2, MATE1 et MATE2-K) et la rosuvastatine (OATP1B1, OATP1B3 et BCRP) a été développé et les posologies optimisées afin d'éviter les IAMs entre les différentes molécules [79]. L'ajout d'inhibiteurs de transporteurs tels que la rifampicine, le probénécide, le vérapamil ou la cimétidine modifie la PK des substrats en accord avec les données cliniques ou *in vitro* existantes [80] et pourrait faire de ce cocktail un outil intéressant pour étudier l'impact de l'inflammation ou les IAMs avec des modulateurs de cytokines.

### b. Protéines plasmatiques

Depuis des années, l'inflammation présente dans des pathologies telles que la maladie de Crohn [81], la polyarthrite rhumatoïde [82], le lupus érythémateux [83] ou le cancer [84, 85] est connue pour entraîner une diminution de la concentration plasmatique de l'albumine et une augmentation de celle de l' $\alpha$ 1-glycoprotéine acide (AAG) par rapport aux individus sains (Figure 7). La synthèse hépatique de l'AAG, qui est également un marqueur de l'inflammation, est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ ) [86, 87]. La baisse de concentration en albumine en cas d'inflammation est quant à elle liée à une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une hausse du volume interstitiel [88]. L'albumine se lie au récepteur FcRn en la recyclant par endocytose à l'extérieur de la cellule ce qui lui évite d'être dégradé par les lysosomes et prolonge ainsi sa demi-vie [89]. L'expression de FcRn baisse en cas d'inflammation [90], ce qui diminue la demi-vie de l'albumine en augmentant sa dégradation intra-cellulaire.

Les petites molécules ont des affinités différentes pour les protéines plasmatiques : les molécules acides ont plus d'affinité pour l'albumine tandis que les molécules basiques lipophiles se lient préférentiellement à l'AAG. La liaison à l'albumine est en général difficilement saturable en raison de ses concentrations plasmatiques élevées (35-50 mg/mL chez l'Homme sain [91]) et de ses différents sites de liaison [92]. En revanche les concentrations plasmatiques d'AAG sont plus faibles (0.4-1.0 mg/mL chez l'Homme sain [91]) et elle ne possède qu'un seul site de liaison [93], la liaison à l'AAG est donc saturable.

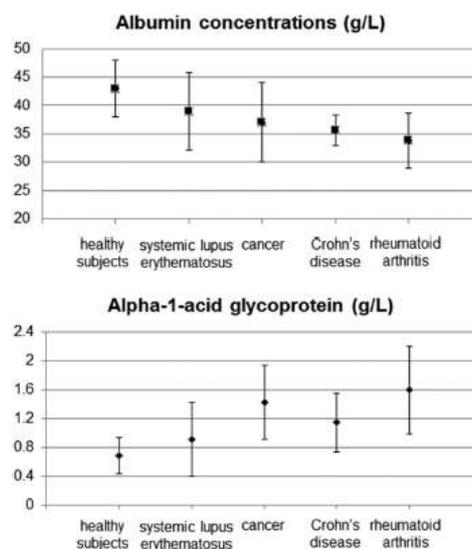


Figure 7 – Concentrations plasmatiques moyennes ( $\pm$ SD) d'albumine et de d' $\alpha$ -1-glycoprotéine acide dans différentes pathologies inflammatoires [37].

Théoriquement la fraction libre du médicament est dérivée de la constante d'association du médicament avec les protéines plasmatiques ( $K_a$ ), de la concentration totale de protéine de liaison ( $P_t$ ) et de la fraction du nombre total de sites inoccupés ( $f_{u_p}$ ), comme le montre l'équation 1 [94]:

$$f_u = \frac{1}{1 + K_a * f_{u_p} * P_t} \quad (1)$$

La modification de la quantité de protéines plasmatiques entraine donc un changement de fraction libre ( $f_u$ ) et peut conduire, selon les équations (2) et (3), à une modification du volume de distribution ( $V_d$ ) et de la clairance (CL).

$$V_d = \left( \frac{f_u}{f_{uT}} \right) * V_T + V_p \quad (2)$$

Avec  $f_{uT}$  qui est la fraction libre dans les tissus,  $V_T$  le volume de tissu et  $V_p$  le volume de plasma. Une augmentation de la  $f_u$  entrainera donc une hausse du  $V_d$ . Dans l'étude de Nix et al. portant sur des antibiotiques  $\beta$ -lactames cette corrélation est particulièrement marquée [95].

Concernant la clairance, elle peut être définie au niveau d'un organe par l'équation suivante :

$$CL_{org} = E_{org} * Q_{org} \quad (3)$$

Avec  $Q_{org}$  qui est le débit de perfusion de l'organe et  $E_{org}$  le coefficient d'extraction. Dans le cas du foie le coefficient d'extraction hépatique ( $E_H$ ) peut être défini selon l'équation suivante :

$$E_H = \frac{f_u * CL_{int}}{(Q_H + f_u * CL_{int})} \quad (4)$$

Avec  $CL_{int}$  la clairance intrinsèque et  $Q_H$  le débit de perfusion hépatique. On distingue alors les molécules à fort coefficient d'extraction hépatique ( $E_H > 0.7$ ), pour lesquelles  $f_u * CL_{int} \gg Q_H$ , leur clairance métabolique hépatique est alors proche du débit sanguin, des molécules à faible coefficient d'extraction hépatique ( $E_H < 0.3$ )  $f_u * CL_{int} \ll Q_H$ . La clairance métabolique hépatique dépend alors quasiment exclusivement de  $f_u$  et  $CL_{int}$ . Une modification de la quantité de protéines plasmatiques en cas d'inflammation peut alors impacter la  $CL_{int}$ .

Par exemple, la clairance de l'ertapénem donné à des patients en état critique avec une hypoalbuminémie est augmentée de plus de 100% par rapport aux individus sains [96].

Différentes études chez l'animal ont montré que dans le cancer [97], la dépression [98], ou après une chirurgie [99], une augmentation d'AAG coïncidait avec une diminution de l'effet de la molécule. Il est

cependant difficile d'imputer uniquement cet effet à un changement de  $f_u$ , car en général l'AUC de la forme libre du médicament est inchangée.

Le transport d'influx de certains médicaments pourrait être facilité par l'interaction entre le complexe médicament-albumine et la surface cellulaire, ce qui augmenterait la quantité de médicament dans la cellule [100, 101]. Une baisse du niveau d'albumine pourrait donc avoir, en plus d'une modification de la fraction libre plasmatique, un effet sur la fraction libre intra-cellulaire.

### c. Perméabilité des barrières

L'altération des barrières par l'inflammation peut également être un facteur affectant la PK des médicaments en augmentant par exemple le volume de distribution ou la clairance. La barrière intestinale et la BHE peuvent être impactées.

#### - Intestin

La barrière intestinale est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales liées par 3 types de complexes jonctionnels qui permettent le transport paracellulaire de différentes substances, les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées (Figure 8). Les desmosomes et les jonctions adhérentes servent principalement à l'attachement physique entre les cellules, tandis que les jonctions serrées, situées au niveau apical, agissent plutôt comme une membrane semi-perméable dans l'espace inter-cellulaire [102]. Les jonctions serrées sont composées de 4 protéines transmembranaires : les molécules d'adhésion jonctionnelles, les claudines, l'occludine et la tricelluline. Les niveaux d'expression des claudines sont variables en fonction des tissus et elles peuvent exercer des effets différents sur la perméabilité paracellulaire en fonction de leur type. Les zonula-occludens (ZO) intracellulaires connectent les jonctions serrées transmembranaires avec le cytosquelette (actine/myosine), et facilitent l'ouverture des jonctions serrées sous conditions spécifiques.

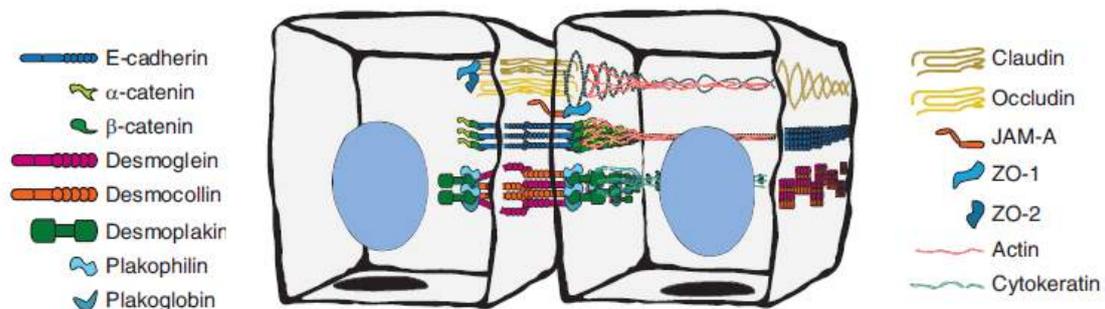


Figure 8 – Composition et organisation spatiale des jonctions cellulaires d'une cellule épithéliale [103].

Les cytokines et les chemokines peuvent avoir une action positive comme négative sur la perméabilité de la barrière intestinale et sur la régulation des jonctions cellulaires, en modifiant la localisation et l'expression de leurs composants protéiques. Le sens et la magnitude des changements observés dans la littérature varient en fonction de la concentration de cytokine, du moment d'action de la cytokine, du modèle utilisé et de la méthode d'administration de la cytokine.

Des travaux sur lignées cellulaires épithéliales ont montré que l'IFN $\gamma$  entraînait l'internalisation des jonctions serrées par macropinocytose [104]. Le TNF $\alpha$  joue un rôle clef dans les maladies inflammatoires de l'intestin, ses concentrations plasmatiques y sont plus élevées que chez les individus sains. L'exposition de cellules Caco-2 à du plasma de patients atteints de la maladie de Crohn conduit à une hausse de la perméabilité membranaire en entraînant notamment une baisse d'expression de ZO-1 et d'occludine, et ce, *via* l'activation de la voie des MAPK [105]. Ce même modèle Caco-2 exposé à l'IL-6 modifie la perméabilité des jonctions serrées en stimulant l'expression de claudine-2 [106]. L'exposition de cellules Caco-2 à l'IL-1 $\beta$  augmente également la perméabilité cellulaire, notamment par une baisse d'expression d'occludine, en activant la voie NF $\kappa$ B mais pas celle de l'apoptose [107]. L'IL-10 et le TGF $\beta$  ont quant à elles montré des propriétés protectrices de la barrière intestinale [108, 109].

Les maladies inflammatoires intestinales telles que la maladie de Crohn, les colites ulcéreuses ou le syndrome du côlon irritable, sont caractérisées notamment par l'inflammation de l'épithélium intestinal ainsi que de nombreuses perturbations de l'organisation et de l'expression des jonctions serrées [110]. Cependant, il est difficile de savoir si c'est la perturbation des jonctions qui cause l'inflammation chronique ou l'inverse.

- BHE

La dégradation de la BHE est impliquée dans différentes pathologies du système nerveux central, particulièrement celles caractérisées par un état inflammatoire [111]. En effet, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* montrent le lien entre les cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6, le TNF $\alpha$  ou l'IL-17, seules ou en combinaison, et une dégradation de la BHE avec une baisse de l'expression de  $\beta$ -caténine et de jonctions serrées comme claudine-5, occludine et ZO-1 [112-114]. La prise de glucocorticoïde chez des souris après hémorragie cérébrale permet de protéger partiellement la baisse d'expression de ces jonctions [115]. L'intégrité de la BHE est également impactée par les espèces réactives à l'oxygène (ROS), elles conduisent à un réarrangement du cytosquelette ainsi qu'à une redistribution et disparition des jonctions serrées (claudine-5 et occludine) [116]. Des travaux sur des rats recevant une administration d'acide trinitrobenzène sulfonique intra-colonique afin de provoquer une inflammation du tube digestif ont mis en évidence qu'une inflammation périphérique et notamment intestinale pouvait entraîner une réponse inflammatoire au niveau central et endommager la BHE [117, 118].

d. *Protéines thérapeutiques*

A. Généralités

Ces deux dernières décennies ont connu un essor considérable dans la recherche, le développement et les applications thérapeutiques des anticorps monoclonaux (mAbs). La majeure partie d'entre eux sont des immunoglobulines(Ig)G indiquées dans des aires thérapeutiques variées. Ce sont des molécules hydrophiles de haut poids moléculaire (>150 kDa en moyenne). Leur profil PK est donc différent des molécules de plus faible poids moléculaire, ils ne sont par exemple pas métabolisés par les enzymes de phase I et II. Ils sont administrés par voie parentérale, essentiellement IV mais également sous-cutané et intramusculaire. Ils ont un faible volume de distribution lié à leur taille et leur charge [15].

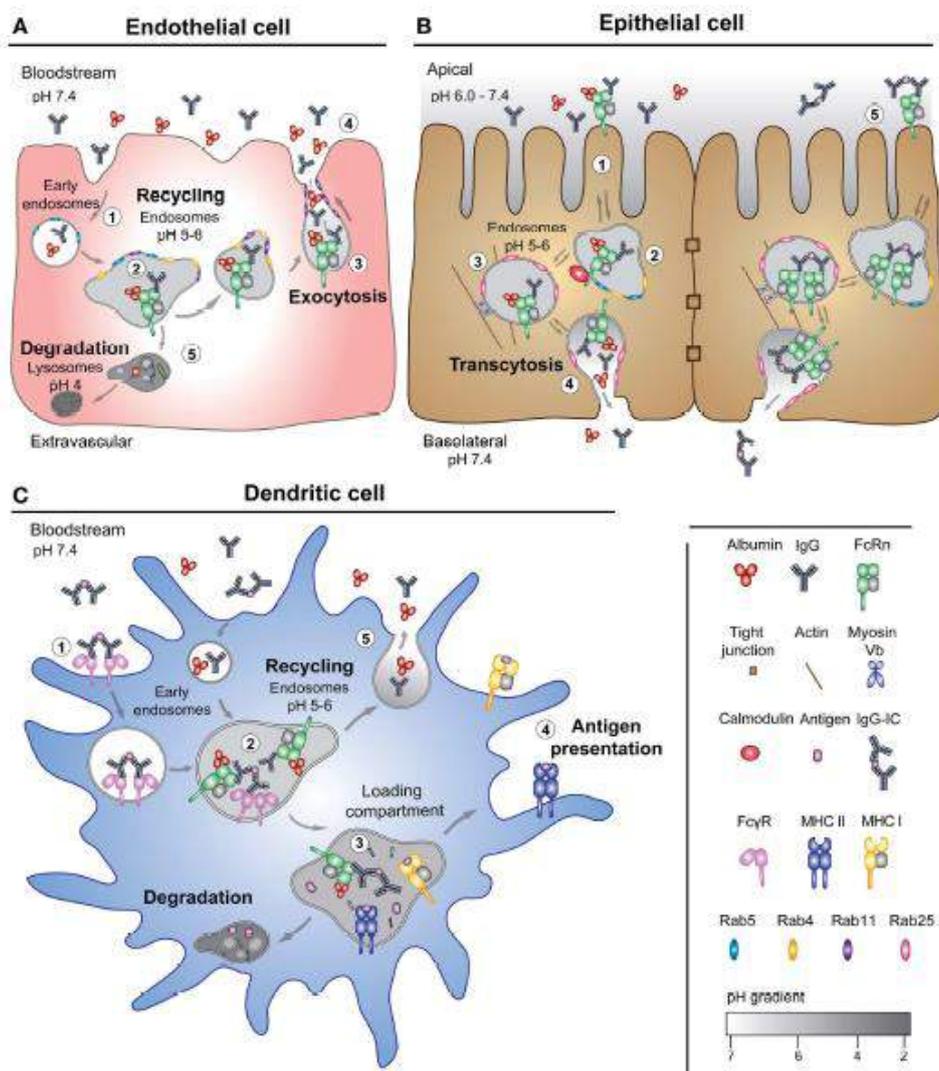


Figure 9 – Représentation schématique du transport et recyclage des IgG et de l'albumine par le FcRn dans une cellule endothéliale (A), épithéliale (B) et dendritique (C) [119].

L'extension de la distribution d'un mAb dépend du débit d'extravasation dans les tissus, de la distribution dans l'espace interstitiel, de la liaison du mAb aux composants tissulaires à la surface des cellules et de l'élimination par les tissus (incluant l'entrée dans la cellule et la dégradation intracellulaire). L'extravasation des mAbs se fait par différents phénomènes. La diffusion passive joue un rôle mineur à cause de leur taille et de leur charge. La voie majeure est la convection, déterminée par le flux de fluide du compartiment vasculaire vers les tissus, qui fonctionne grâce à la différence de pression hydrostatique, oncotique et grâce à un effet de « tamis » (taille des pores, nombre de pores, taille et forme du mAb). Enfin, le troisième processus permettant l'extravasation est la transcytose, *via* le FcRn, jouant un rôle d'autant plus important que la convection est limitée. Différentes études ont mis en évidence le passage bidirectionnel d'IgG du compartiment apical vers le basolatéral. La transcytose et le FcRn peuvent donc jouer un rôle important dans le passage de mAb du compartiment vasculaire vers les tissus. Après l'extravasation, le mAb se distribue dans l'espace interstitiel par diffusion, convection et grâce à la liaison à son antigène. Enfin l'élimination se fait par convection vers les tissus lymphatiques [120].

Les mAbs sont trop larges pour être éliminés par filtration glomérulaire, leur élimination peut se faire par plusieurs processus (Figure 9). La première voie d'élimination, dite non-spécifique, est la pinocytose qui a lieu dans les vésicules lysosomiales des cellules endothéliales. Le récepteur néonatal Fc (FcRn) est un récepteur cellulaire qui permet, selon deux voies pH dépendantes, la transcytose ou le recyclage de ses ligands. Ces derniers évitent alors le catabolisme lysosomal cellulaire et voient leur durée de vie augmenter. Le FcRn est un acteur clef dans la régulation des niveaux d'albumine et d'IgG qui se lie à lui (Figure 9) [119]. La deuxième voie d'élimination des mAbs est la voie spécifique dépendante de l'antigène cible. La liaison à leur cible entraîne une internalisation et une destruction du complexe formé par le système immunitaire. Plus la cible est présente en quantité importante, plus la clairance augmente. Enfin une élimination due à la production par l'organisme hôte d'anticorps anti-anticorps peut venir s'ajouter aux deux précédemment décrites [15].

#### B. Impact de l'inflammation

Il est établi depuis de nombreuses années qu'un niveau élevé d'IgG endogènes raccourcit leur demi-vie (Figure 10) [121], et ce par saturation du recyclage endosomal du FcRn [122]. Mould et al. ont également observé une diminution de la demi-vie d'IgG passant d'environ 21 jours à 15, entre les sujets ayant un niveau d'IgG clinique normal compris entre 7 et 14 g/L par rapport à ceux avec 30 g/L ou plus [123]. Un modèle de population après administration IV de belimumab chez des patients atteints de lupus systémique érythémateux (LSE), caractérisé par la production d'auto-anticorps,

montre que le niveau d'IgG est une covariable corrélée à la clairance du belimumab [124]. Le niveau et l'impact des IgG sur la clairance des mAbs devrait donc être considéré dans des pathologies où leur niveau est élevé (par exemple le LES, pathologies hépatiques chroniques, l'hypertension ou myélome multiple).

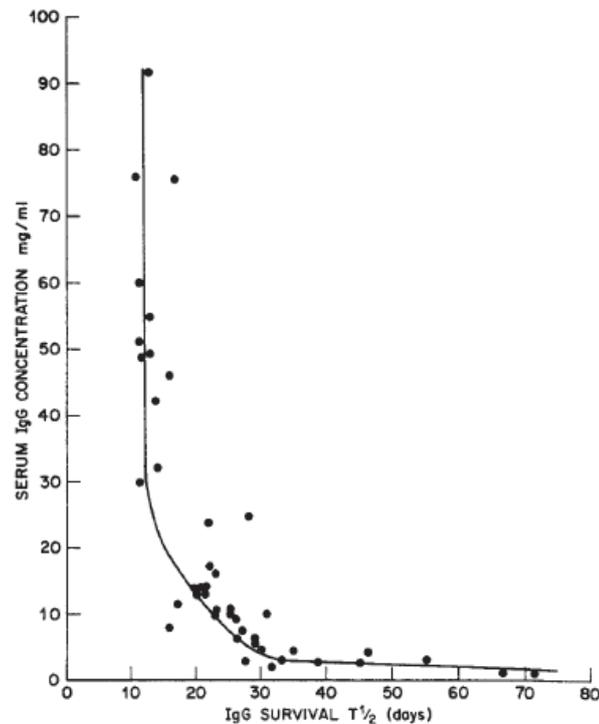


Figure 10 – Relation entre la demi-vie des IgG et leur concentration dans le serum [121].

La dégradation protéolytique est une des voies principales de dégradation des mAbs, elle peut être affectée dans divers états pathologiques incluant le cancer, les blessures ou l'inflammation chronique. Une inflammation élevée peut conduire à une hausse de 50 à 70% du taux de turn-over de protéines dans l'organisme chez les patients cancéreux par rapport aux individus sains [125]. Ceci n'affecte pas seulement le catabolisme des protéines endogènes comme les IgG mais également les protéines exogènes comme les mAbs thérapeutiques. La clairance protéolytique des mAbs n'est donc pas constante en fonction de la pathologie et du niveau de sévérité de la maladie, basée sur la différence de turnover protéique liée à la différence de niveau d'inflammation. Cela a, par exemple, été décrit pour le trastuzumab ayant une exposition de 30 à 40% inférieure chez les patients HER-2 positifs avec cancer gastrique ou de la jonction œsogastrique par rapport aux patients HER-2 positifs avec cancer du sein métastatique [126].

Le niveau d'albumine dans le sérum a d'ailleurs été fréquemment rapporté comme inversement corrélé à la clairance des mAbs [127, 128], un niveau élevé d'albumine indique une baisse de clairance

des IgG. Une des explications est que le catabolisme endogène de l'albumine est corrélé avec celui des IgG [129]. Une hausse du turnover protéique, indiquée par une hypo-albuminémie, entrainera une augmentation de la dégradation catabolique des IgG, avec pour conséquence une baisse de l'exposition aux mAbs via une baisse de leur clairance.

Un autre mécanisme pouvant relier la perte relative du niveau d'albumine avec une augmentation de la clairance des mAbs est une fuite au niveau rénal lors de hauts niveaux de protéinurie. L'albumine et les IgG franchissent la barrière de filtration glomérulaire via le FcRn [130, 131]. Une étude sur modèle murin montre en effet qu'une baisse de la fraction de l'excrétion urinaire d'IgG est constatée sur les FcRn<sup>-/-</sup> [132]. Le modèle de population du belimumab évoqué précédemment a également mis en évidence un effet significatif de la covariable débit de filtration glomérulaire (eGFR) sur la clairance [124]. Ces résultats supportent l'hypothèse que les mAbs ont une petite part de leur clairance médiée par le rein. Cependant chez les individus avec une fonction rénale normale, une réabsorption tubulaire a lieu qui rend ce phénomène non significatif (Figure 11).

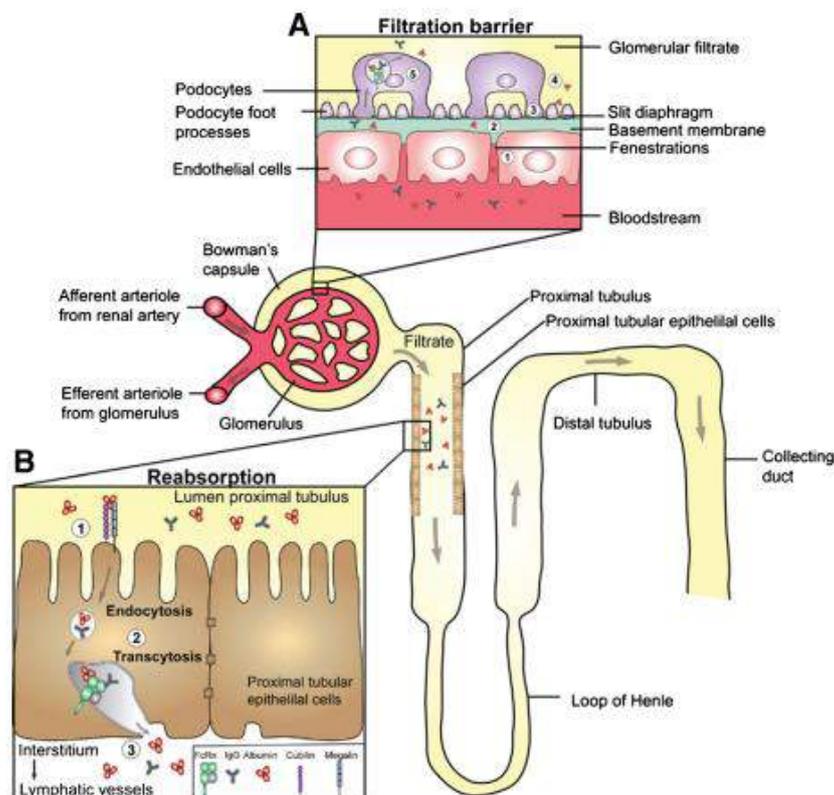


Figure 11 – Transport des IgG et de l'albumine dans les reins. La partie A décrit le glomérule rénal et la partie B la réabsorption tubulaire [119].

Certaines pathologies inflammatoires peuvent entraîner des lésions rénales, par exemple le SLE via la production d'auto-anticorps et le dépôt de complexes immuns au niveau glomérulaire, conduisant entre autre à une protéinurie. Des analyses de population ont montré que le niveau de protéinurie était une covariable significative de la clairance du belimumab (Figure 12) [124], indiquant une part d'excrétion rénale dans l'élimination du belimumab.

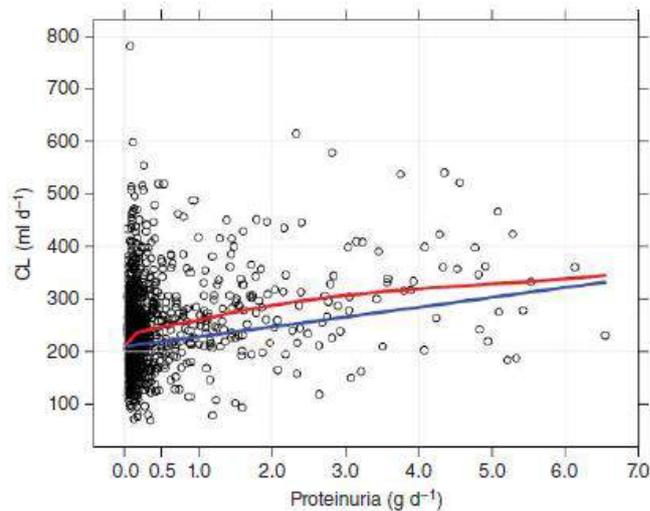


Figure 12 – Représentation de la clairance du belimumab en fonction de la protéinurie à partir d'une analyse de population sur des sujets de phase III [133].

Dans le cas de pathologies intestinales inflammatoires, une partie de la clairance des mAbs peut être expliquée par une voie non-spécifique qui est la perte massive de protéines au niveau intestinal. En effet, la clairance de l'infliximab, un anticorps anti-TNF $\alpha$ , dans la maladie de Crohn ou les colites ulcéraives est de 0.38-0.41 L/jour, alors qu'elle est de 0.26-0.27 L/jour dans la polyarthrite rhumatoïde ou la spondylarthrite ankylosante [134]. Cela a également été confirmé par la corrélation entre la clairance de protéines (incluant les IgG) et la longueur ainsi que la sévérité de la lésion chez des patients atteints de maladies inflammatoires intestinales [135, 136].

La relation entre l'inflammation et le niveau d'expression de FcRn est complexe, des études pré-cliniques ont montré une induction après exposition de cellules au TNF $\alpha$  et à l'IL-1 $\beta$  *via* NF $\kappa$ B [90], tandis qu'on observe une baisse d'expression après exposition à IFN $\gamma$  *via* JAK-STAT [137], ce qui suggère que l'effet dépendra de la voie de l'inflammation qui est activée.

Un modèle de population après administration IV de belimumab chez des patients atteints de lupus érythémateux montre une légère augmentation de clairance en cas de prise de glucocorticoïde [124]. Ceci est en accord avec des données cliniques montrant la hausse du catabolisme après prise de

glucocorticoïdes chez des individus sains [138] et des données pré-cliniques montrant une baisse d'expression d'ARNm par la dexaméthasone sur modèle murin [139].

Ce résultat n'est pas en désaccord avec mécanisme lié au FcRn, car ce dernier lie de façon non-compétitive l'albumine et les IgG [140], l'hypo-albuminémie induite par l'inflammation ne doit donc pas avoir de conséquences sur la liaison et le recyclage des mAbs [141].

Bien que variable et non spécifique, la CRP pourrait également être un marqueur du changement de clairance, une étude sur des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde montre que le niveau de concentration résiduelle d'infliximab est inversement corrélé avec le niveau de CRP [142].

## II. Modélisation et simulation

Nous passons ensuite des résultats *in vitro* ou *in vivo* permettant de comprendre les modifications des processus PK induites par l'inflammation, à la combinaison de ces données afin d'obtenir des prédictions quantitatives.

### 1) Modélisation PK

La modélisation vise à décrire un phénomène observé le plus précisément possible *via* un système mathématique. Le système d'équations doit être le plus simple possible, c'est-à-dire avec un minimum de paramètres (principe de parcimonie) (10). Appliqué à la PK, le but est de trouver le système décrivant le mieux les concentrations plasmatiques en fonction du temps. L'analyse compartimentale décrit l'organisme comme un ensemble de compartiments (en général un à trois) reliés entre eux par des constantes de vitesses régissant les entrées et sorties de la molécule (10).

#### a. PK classique

Avec l'approche compartimentale classique, chaque compartiment est un espace virtuel sans réalité physiologique/anatomique, contrairement à l'approche physiologique. La distribution de la molécule est considérée comme homogène dans chaque compartiment. Plusieurs modèles sont testés dans le but de trouver celui qui permettra de décrire la PK du médicament, le meilleur modèle sera sélectionné grâce à différents critères :

- La représentation graphique des résidus doit être conforme à leur distribution théorique.
- L'incertitude sur les paramètres estimés, décrite par les coefficients de variations (CV ou Relative Standard Error) des paramètres du modèle doit être la plus faible possible (CV inférieurs à 30%).
- Les critères d'Akaike (AIC) et de Schwartz (BIC). Leur valeur dépend du nombre d'observations, du nombre de paramètres du modèle et de la somme des carrés des écarts (SCE) entre les valeurs observées et les valeurs prédites par le modèle. Plus leur valeur est faible, meilleur est le modèle.

#### b. Approche de population

L'analyse s'effectue en une seule étape («single stage approach») en combinant les données obtenues chez tous les patients, les protocoles de recueil et les doses administrées pouvant varier d'un patient à l'autre [143].

On parle de modèle à effets mixtes car cette technique permet d'obtenir le profil cinétique moyen d'un médicament dans une population (effets fixes) tout en identifiant et quantifiant les différentes sources de variabilité associées (effets aléatoires).

L'un des avantages de cette approche est qu'elle nécessite peu de prélèvements par sujet, le nombre de sujets devant cependant être suffisamment important. Il est également possible de mélanger les données riches issues d'études provenant de phases plus précoces avec des données éparses issues de phases tardives.

Cette approche permet d'évaluer l'impact de covariables sur la variabilité inter-individuelle (IIV). Il est alors possible de vérifier si des facteurs démographiques, physiologiques, génétiques ou encore thérapeutiques peuvent impacter de façon significative la valeur de paramètres PK. Si ces variations sont associées à des changements cliniques, la dose ou le schéma thérapeutique devront être adaptées pour les sous-populations concernées [144].

## 2) Modélisation basée sur la physiologie

### a. Histoire

La modélisation physiologique vise à intégrer la connaissance des processus physiologiques d'un organisme avec les propriétés physico-chimiques d'un composé dans le but de simuler et prédire ses concentrations dans différentes situations biologiques plus ou moins complexes. Le niveau de détail d'un modèle physiologique peut varier en fonction du processus à simuler, des connaissances disponibles et du niveau de complexité requis pour obtenir un niveau de précision acceptable des prédictions. Le concept de modélisation basée sur la physiologie (PBPK) n'est pas nouveau, en effet l'utilisation de modèle à plusieurs compartiments incorporant des composantes biologiques et physiologiques pour simuler des données PK a été introduite par Teorell en 1937 [145]. Un autre exemple précoce de ce type de modèle a été décrit par Bischoff en 1971 et concerne le méthotrexate [146]. Cependant, pendant de nombreuses années l'application de ces modèles dans l'industrie pharmaceutique fut limitée à cause de leur complexité mathématique et du grand nombre d'équations et de paramètres d'entrée requis. La croissance conséquente d'information sur les voies de régulations biologiques, les données génétiques, les mécanismes moléculaires, ainsi que les avancées technologiques sur les techniques de mesures de données biologiques, ont rendu possible l'obtention de données nécessaires au paramétrage des modèles, diminuant ainsi le nombre de paramètres à estimer en fixant ces valeurs. Des modèles physiologiques cellulaires, de tissus, d'organes et de corps entier, aident à améliorer la compréhension mécanistique des systèmes biologiques. Ces prédictions présentent ainsi un fort intérêt pharmacologique puisqu'elles permettent d'établir une estimation de

l'exposition à la fois dans le plasma et sur le site d'action, ce qui peut être difficile voire impossible à obtenir expérimentalement. La prédiction de la cinétique chez l'Homme peut être réalisée à un stade très précoce du développement des médicaments, à partir de données *in vitro* ou animales. Cette approche peut également être utilisée afin d'extrapoler une dose utilisée chez des volontaires sains à celle à utiliser dans une population de malades, présentant par exemple une baisse d'expression de CYPs, et nécessitant potentiellement un ajustement de dose.

#### b. Composition d'un modèle PBPK

Comme mentionné précédemment, les modèles PBPK sont composés d'une combinaison d'informations utilisées pour générer des simulations de différents scénarios de traitements. Ces blocs d'informations peuvent être divisés en groupes concernant les propriétés de l'organisme, du médicament, du protocole d'administration et de la formulation (Figure 13).

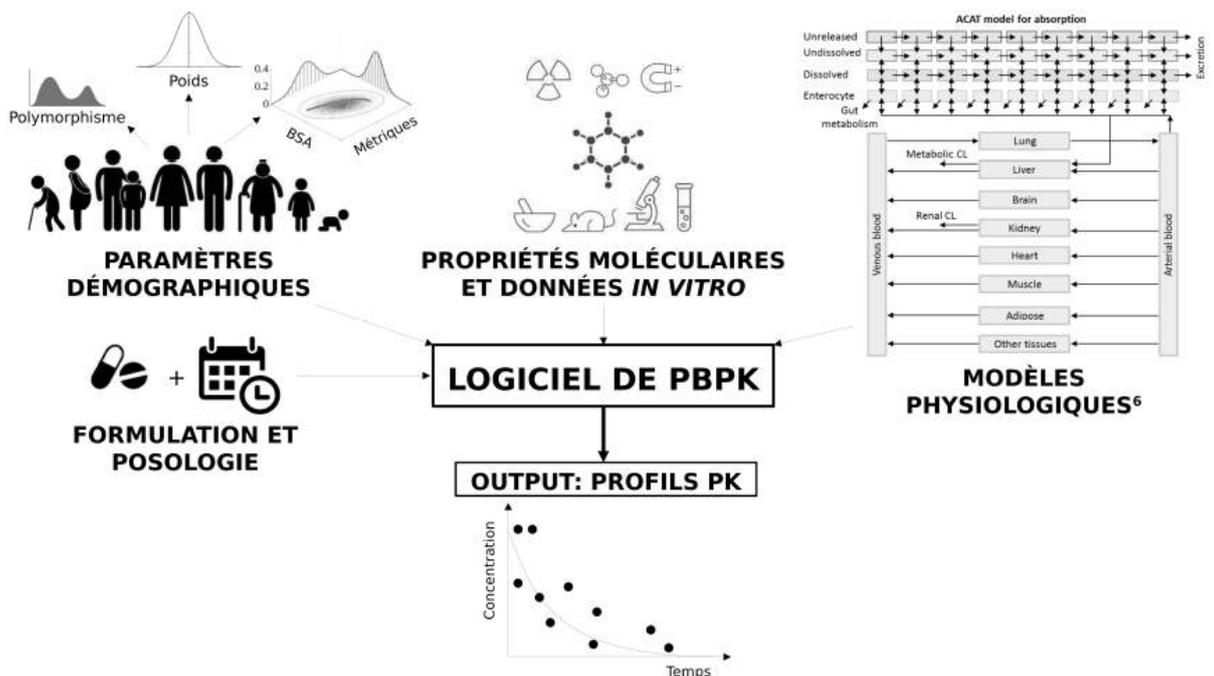


Figure 13 – Modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie [147].

#### i. Anatomie et physiologie

La physiologie de l'organisme d'étude est une connaissance préalable essentielle en modélisation PBPK puisque les organes d'intérêts sont explicitement inclus dans le modèle. Ces organes correspondent à des compartiments, reliés entre eux par la circulation systémique, et caractérisés par leurs propriétés anatomiques et physiologiques (volume, coefficient de partage, perméabilité, débit sanguin) (Figure 14).

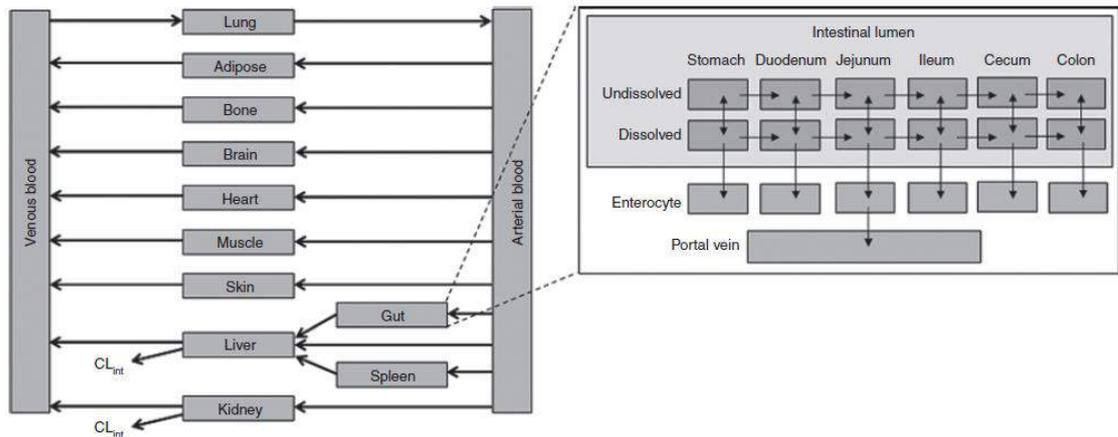


Figure 14 – Représentation schématique d'un modèle PBPK [148].

Ces paramètres sont dépendants de l'espèce et de la population considérée. Ils peuvent être obtenus à partir de mesures expérimentales, de données de la littérature, ou calculés à partir de formules spécifiques validées. Dans certains cas chaque compartiment peut être divisé en sous-compartiments (e.g. plasmatique, interstitiel et intracellulaire). Ceci permet par exemple de modéliser le passage du médicament dans la cellule (par diffusion passive ou transport actif par exemple) puis son métabolisme enzymatique dans le compartiment intracellulaire.

Différents mécanismes d'entrée du médicament dans les tissus peuvent être modélisés en fonction de si la vitesse de transfert est limitée par la perfusion du tissu ou par la perméabilité de la membrane (Figure 15). Le premier modèle dit « limité par la perfusion » est adapté aux petites molécules lipophiles pour lesquelles le débit sanguin est le facteur limitant du passage. Le second modèle dit « limité par la perméabilité » concerne des molécules polaires, plus grosses, pour lesquelles le processus limitant est perméabilité cellulaire, par exemple lors de l'implication de transporteurs cellulaires [148].

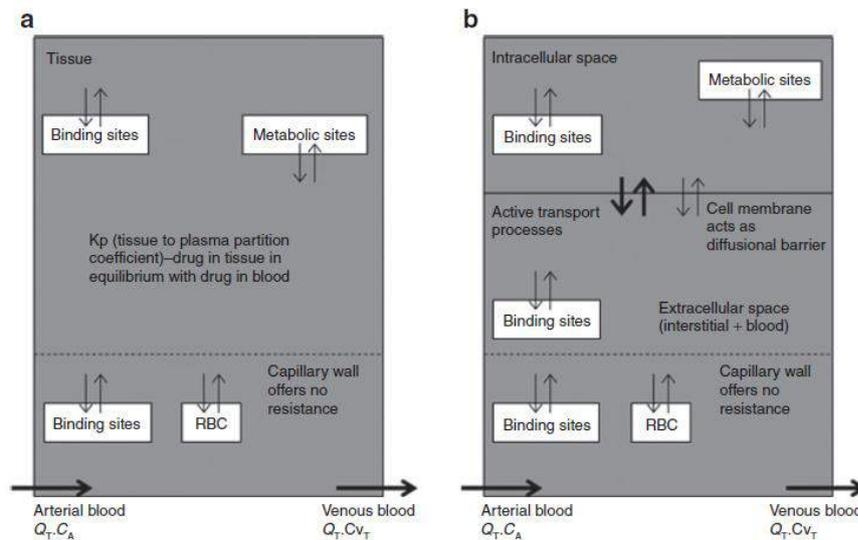


Figure 15 – Représentation des modèles limités par la perfusion (a) et par la perméabilité (b) [148].

## ii. Propriétés du médicament

Les propriétés du médicament incluent tous les paramètres du composé, notamment les propriétés physico-chimiques telles que la lipophilie, la solubilité, le poids moléculaire ou le pKa qui peuvent être déterminées *in vitro*. D'autres propriétés sont définies par l'interaction entre le médicament et le système biologique (comme la fraction libre et les coefficients de partage).

## iii. Formulation et protocole d'administration

Le protocole d'administration inclut la voie d'administration, la quantité de composé (dose) et le schéma de prise pour les administrations répétées. Des voies d'administrations variées peuvent être considérées dans le modèle, et ainsi définir comment le médicament est absorbé. Les voies les plus communes sont la voie orale et intraveineuse, mais il est aussi possible de modéliser une administration par voie inhalée, sous-cutanée, intramusculaire, topique ou encore oculaire. Des événements comme la prise de nourriture peuvent également être inclus dans le modèle.

### c. *Plateformes*

Ces quinze dernières années, le nombre de publications impliquant la modélisation PBPK a beaucoup augmenté, démontrant la généralisation de cette approche parmi la communauté scientifique. Des collaborations entre industriels et universitaires ont permis le développement de plateformes et d'outils tels que Simcyp (<https://www.certara.com/software/simcyp-pbpbk/>), GastroPlus (<https://www.simulations-plus.com/software/gastroplus/>) ou PK-Sim et MoBi (<http://www.systems-biology.com/products/pk-sim.html>). Ces plateformes commerciales fournissent des modèles de structure génériques pour des populations et espèces prédéfinies. Elles comportent des bases de

données physiologiques, de molécules exogènes et endogènes. Les bases physiologiques contiennent des données démographiques (âge, taille, poids, sexe), des métriques d'organes et des informations hémodynamiques (débits, volumes). Ces bases peuvent exister pour différents états physiologiques et pathologiques chez l'Homme et l'animal. Il existe également des bases contenant les niveaux d'expression de molécules endogènes, c'est-à-dire d'enzymes impliquées dans le métabolisme de médicaments, des transporteurs ou des protéines plasmatiques. Enfin, des molécules exogènes peuvent aussi faire l'objet d'une librairie, elles sont principalement substrats, inducteurs ou inhibiteurs des principales enzymes du métabolisme et peuvent ainsi servir aux études d'IAM.

#### d. Applications

Depuis 2008 le nombre de dossiers soumis aux agences du médicament comportant des analyses PBPK augmente de manière continue [149]. Les visées premières lors de la soumission de dossiers sont l'étude d'IAM (enzymes du métabolisme et transporteurs) [150], puis l'application en pédiatrie [151], enfin l'extrapolation à des populations pathologiques (insuffisance rénale et hépatiques) [152]. D'autres applications sont également possible par exemple évaluer l'impact d'un changement de formulation [153] ou de schéma posologique, ou encore l'extrapolation inter-espèce [154] (Figure 16).

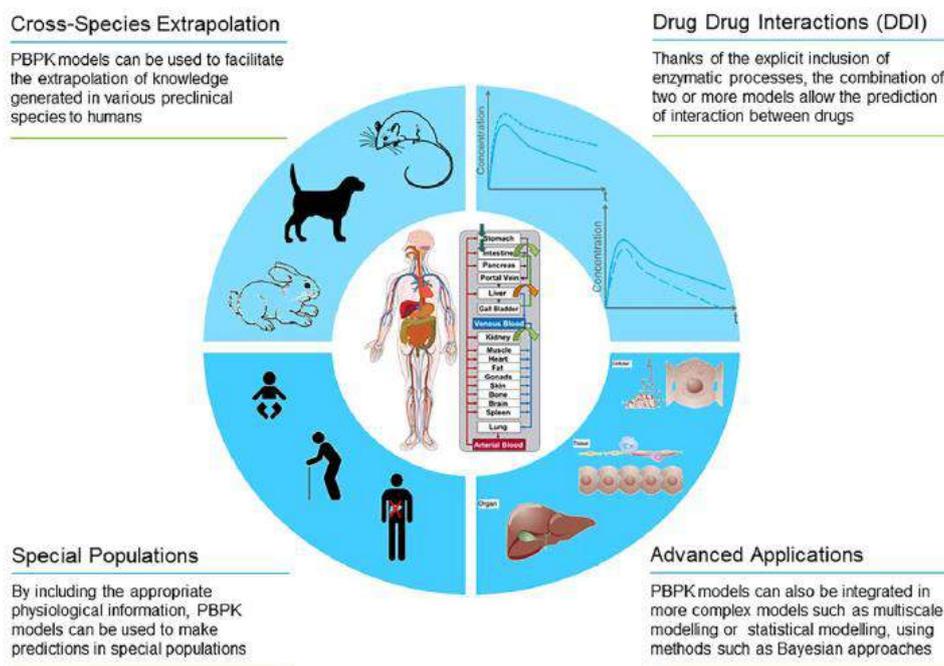


Figure 16 – Représentation des applications les plus communes de la modélisation PBPK [155].

e. *Bonnes pratiques de développement*

i. Compilation des données et informations disponibles

Dans un premier temps, toutes les informations disponibles sur les propriétés ADME du médicament sont rassemblées ainsi que celles caractérisant l'organisme et la population d'étude. Les paramètres physiologiques sont modifiés uniquement s'il existe un rationnel mécanistique, par exemple pour certaines populations pathologiques. Concernant le médicament toutes les informations concernant les processus de clairance, de transport et de liaison spécifique peuvent être intéressantes pour le modèle. Le niveau de détail du modèle ainsi que les critères d'évaluation dépendent de l'objectif et de l'application visés, ainsi que de la disponibilité des données. Les données PK expérimentales disponibles peuvent servir à identifier un paramètre inconnu ou à la validation d'un modèle.

ii. Etablir un modèle après une administration IV

Une procédure à suivre a été proposée par Peters et al. (Figure 17) [156]. Le profil intraveineux est déterminé uniquement par la distribution, le métabolisme et l'excrétion du composé. Si l'AUC du profil simulé diffère de l'AUC observée, cela indique que la clairance modélisée n'est pas égale à la clairance observée. Les paramètres relatifs à la clairance sont alors optimisés pour que les AUC concordent. Les paramètres de distribution et de clairance affectent des aspects différents de la courbe de concentration en fonction du temps, ces paramètres peuvent être modulés de manière indépendante. Si les formes des courbes observées et simulées ne concordent pas malgré des AUC égales, cela indique que les coefficients de partage tissulaires utilisés ne permettent pas de décrire correctement la distribution observée. Ceci peut être dû à la méthode de calcul des coefficients de partage ou à un processus important non pris en compte par exemple un transport actif ou la liaison à un composé. Le modèle PBPK doit être modifié jusqu'à ce que la concordance soit satisfaisante.

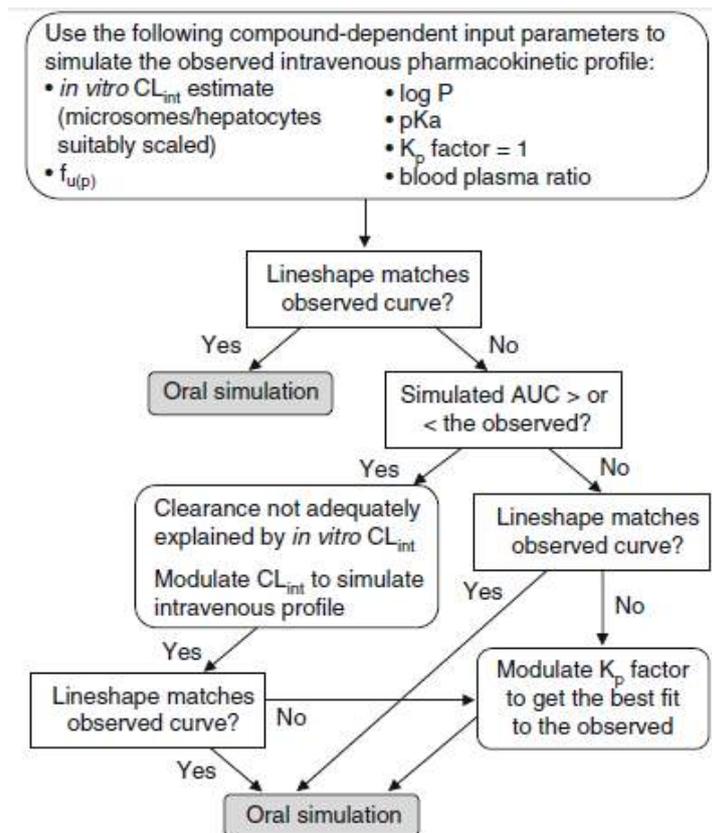


Figure 17 – Représentation schématique de la procédure à adopter selon Peters et al. afin d’optimiser un modèle PBPK à partir de données IV [156].

### iii. Établir un modèle après une administration PO

Une fois que le profil IV est en place, le profil PO est simulé en utilisant les paramètres de clairance et de distribution du meilleur modèle IV, en faisant donc l’hypothèse que ces processus ne varieront pas d’une voie d’administration à l’autre. Seuls les paramètres relatifs à l’absorption sont optimisés, cela correspond à la perméabilité intestinale, les paramètres liés à la prise alimentaire mais également ceux relatifs à la formulation du médicament décrivant sa libération (surtout si la solubilité a été estimée dans l’eau et pas dans des milieux FaSSIF ou FeSSIF). L’ajout d’un cycle entéro-hépatique peut également avoir lieu.

### iv. Évaluation du modèle

Une fois le modèle développé sa qualité doit être évaluée. Les directives des agences réglementaires, EMA et FDA, ne recommandent pas de méthode d’évaluation particulière [157, 158]. Cependant, lors d’un groupe de travail hébergé par l’EMA et la fédération européenne des industries et associations pharmaceutiques (EFPIA), des représentants industriels, académiques et des agences réglementaires ont proposé que le niveau de qualification des modèles soit proportionnel au niveau d’impact. Ce

dernier peut être classifié en haut, modéré ou faible. Plus le niveau d'impact est élevé plus importantes seront les qualifications demandées. Le niveau d'impact est relié au niveau de risque pour le patient en cas de mauvaise prise de décision liée à une erreur de prédiction. L'utilisation d'un modèle PBPK à la place d'une étude clinique pour étudier des IAM est considérée comme ayant un haut niveau d'impact. Un impact modéré peut être le choix d'une dose pour une population pédiatrique. Les critères d'évaluations sont donc à adapter en fonction du contexte d'utilisation du modèle.

Les critères et tests suivants peuvent être utilisés pour l'évaluation :

- Comparaison des prédictions avec les données expérimentales :

On compare alors les prédictions d'une étude dont on connaît le design (population et schéma d'administration) avec les observations. En général, un modèle peut être évalué par inspection visuelle en comparant le profil concentration temps simulé dans un compartiment avec les données expérimentales. Les prédictions sont considérées comme correctes quand l'intervalle de prédiction, compris entre le 5<sup>ème</sup> et 95<sup>ème</sup> percentile, comprend 90% des observations. De plus les paramètres PK, tels que l'AUC, la Cmax, le Tmax et la demi-vie, simulés et observés peuvent être comparés. Les prédictions sont considérées comme correctes si le rapport prédit/observé est compris entre 0.5 et 2.

- Cohérence du modèle pour différentes doses, espèces, populations ou médicaments

Un recouplement important pour valider un modèle est de considérer différentes doses. Si les estimations dévient pour différents niveaux de doses cela révèle des lacunes du modèle, comme par exemple une non-linéarité de la PK, liée à une saturation d'un processus. Les coefficients de partage et de perméabilité sont supposés être les mêmes d'une espèce à l'autre, si ce n'est pas le cas, une modification du modèle liée à la physiologie spécifique de l'espèce en question doit être discutée. Si des données PK dans des populations spécifiques comme les insuffisants hépatiques ou rénaux sont disponibles, le modèle peut aussi être évalué en utilisant ces données et en changeant les paramètres physiologiques de manière adéquate. Enfin le modèle peut également être évalué en utilisant un autre médicament partageant des processus ADME communs, par exemple pour notre sujet, regarder si l'impact de l'inflammation sur une enzyme du métabolisme est le même pour deux substrats différents [155].

- Analyse de sensibilité

Dans le but d'évaluer l'incertitude des prédictions d'un modèle il est recommandé d'effectuer une analyse de sensibilité pour les paramètres d'intérêt. Cela correspond à étudier l'impact des variations des paramètres d'entrée (LogP, pKa, etc) sur ceux de sortie (AUC, Tmax, Cmax, etc). Une forte

sensibilité signifie qu'une faible variation du paramètre d'entrée induit une forte variation de ceux de sortie. Les résultats de l'analyse de sensibilité et des différents scénarii peuvent permettre de vérifier si le modèle est robuste [155].

#### f. Exemples de modèles dans l'inflammation

Quelques modèles PBPK ont déjà été développés dans le but d'étudier l'impact de l'inflammation sur les CYPs et leurs substrats.

Machavaram et al. 2013 ont modélisé l'impact de l'IL-6 sur la synthèse de CYP3A4 (Eq. 4) et les conséquences sur la PK de la simvastatine dans une population de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde traitée ou non par tocilizumab (anticorps anti-IL-6R). Le modèle a également été évalué par la prédiction de l'impact sur la PK de la cyclosporine chez patients recevant une transplantation de moelle osseuse. L'impact de l'IL-6 était considéré comme étant le même dans l'intestin et le foie. Son influence sur d'autres enzymes/transporteurs n'était pas pris en compte. Enfin le modèle considérait que l'IL-6 plasmatique agissait directement sur le niveau de CYP [159].

$$\frac{dEnz_t}{dt} = k_{deg} * Enz_0 * \left(1 + \frac{(E_{min}-1)*[I]_t}{EC_{50}+[I]_t}\right) - k_{deg} * Enz_t \quad (4)$$

Enz<sub>t</sub> est la quantité de CYP actif au temps t; Enz<sub>0</sub> est la quantité basale de CYP dans le foie, (Enz<sub>t</sub>=E<sub>0</sub> à t=0). E<sub>min</sub> est l'activité enzymatique minimum du CYP (i.e. la suppression maximale) exprimée comme une fraction du contrôle. EC<sub>50</sub> est la concentration qui permet d'obtenir la demi-E<sub>min</sub> (i.e. la moitié de la suppression maximale); [I]<sub>t</sub> est la concentration de l'inhibiteur (IL-6) au temps 't'. La valeur moyenne de k<sub>deg</sub> dans le foie utilisée pour les simulations était 0.0193 h<sup>-1</sup>.

Les valeurs d'E<sub>min</sub> et d'EC<sub>50</sub> sont issues d'une étude *in vitro* sur hépatocytes de Dickmann et al. [33]. Jiang et al ont également étudié l'impact du niveau d'IL-6 sur la PK de substrats des CYP3A4, -2C19, -2C9 et -1A2 (midazolam, oméprazole, warfarine et caféine) dans une population de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, avant et après la prise de sirukumab [160]. L'effet de l'IL-6 était décrit par une action sur la synthèse des CYPs comme présenté précédemment dans l'équation 4. Les valeurs d'E<sub>min</sub> et d'EC<sub>50</sub> sont issues de la même étude [33].

Xu et al. ont étudié l'impact potentiel d'une hausse du niveau de cytokines, et plus particulièrement de l'IL-6, induite par la prise de blinatumomab [161]. L'effet de l'IL-6, implémenté dans le modèle comme dans les deux études décrites précédemment, était une nouvelle fois issues de données *in vitro* à partir de travaux internes sur hépatocytes humains.

Ces travaux présentent cependant certaines limites. L'effet est mesuré *in vitro* sur hépatocytes humain, il existe donc une variabilité « inter-donneur » ainsi qu'une variabilité inter-laboratoire avec cette approche. D'autre part, seul l'effet de l'IL-6 est pris en compte dans la réponse inflammatoire, même s'il a été montré qu'elle jouait un rôle majeur, d'autres cytokines peuvent avoir un effet synergique ou au contraire de rétrocontrôle négatif. De plus, les niveaux d'IL-6 utilisés dans ces modèles sont les niveaux moyens dans les pathologies respectives, basés sur des analyses de la littérature, et pas sur le niveau des patients de l'étude puisque celui-ci n'était pas mesuré. Enfin la concentration d'IL-6 plasmatique est considérée comme la concentration active sur la synthèse de CYP au niveau cellulaire. Une éventuelle différence entre la concentration d'IL-6 plasmatique et la concentration active est "absorbée" par la valeur d' $EC_{50}$ , qui permet de "calibrer" le modèle.

### III. Modèles d'études *in vitro* des barrières intestinales et hémato-encéphaliques

Ce chapitre présente les modèles cellulaires et tissulaires *in vitro* ainsi que les méthodes permettant d'étudier ces barrières.

#### 1) Modèles *In vitro*

De nombreux modèles cellulaires ont été développés afin de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces propriétés de barrières physiologiques. Différents systèmes sont actuellement utilisés pour étudier le métabolisme et le transport des médicaments : les cellules primaires, les lignées cellulaires, les vésicules membranaires, les microsomes ou encore des systèmes avec enzymes recombinants. Les cellules peuvent être cultivées en deux dimensions ou sur des inserts avec une membrane semi-perméable en suspension dans un puits permettant ainsi d'établir un modèle de barrière en créant un compartiment apical et un compartiment basal [162].

##### a) Culture primaire

Les modèles cellulaires primaires sont basés sur des cellules isolées à partir de tissus vivants puis mises en culture *in vitro*. Ils peuvent être d'origine animale ou humaine. Des modèles ont été développés pour les différents organes. L'avantage de ces modèles est la conservation de l'histologie des tissus d'origine avec une répartition des différents types cellulaires proche de celle observée *in vitro*. Leur limite sont leur disponibilité, leur coût élevé et leur durée de vie limitée. La variabilité entre les différents lots de donneurs est également un obstacle à leur utilisation.

Les cellules endothéliales micro-vasculaires cérébrales humaines sont considérées comme le gold-standard pour mesurer la perméabilité de la BHE. Les interactions entre les différents types cellulaires jouent un rôle important, la co-culture des cellules endothéliales avec des astrocytes et des péricytes améliore l'expression des jonctions cellulaires et augmente la résistance trans-épithéliale (TEER) [163]. Le modèle EpiIntestinal est un modèle visant à reproduire la physiologie, l'architecture 3D et les différentes fonctions du petit intestin. Des cellules épithéliales, des fibroblastes et des cellules endothéliales sont prélevées de tissus humains puis cultivées sur des inserts avec une membrane à micropores permettant de reconstruire la structure en 3D du petit intestin (Figure 18).

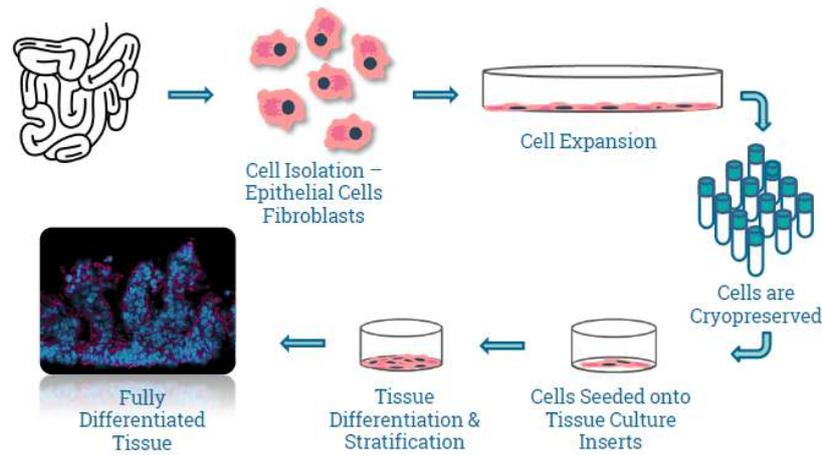


Figure 18 – Représentation schématique de la préparation du modèle EpilIntestinal [164].

Ce modèle exprime les principaux transporteurs, enzymes du métabolisme et jonctions cellulaires présents dans le petit intestin. Les cellules présentes dans ce modèle sont capables de produire des cytokines en réponse à un stimulus inflammatoire. Des tests de perméabilité avec différents substrats ont mis en évidence une corrélation plus importante entre l'absorption observée chez l'Homme et les résultats obtenus avec ce modèle qu'avec la lignée de référence Caco-2 [165]. Les coupes histologiques de ce modèle ont confirmé que la morphologie des cellules était similaire à celle observée *in vivo* et qu'elles se développaient bien en villosités (Figure 19).

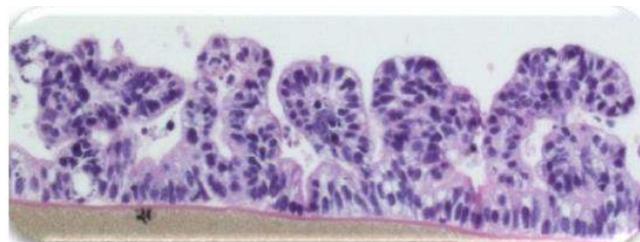


Figure 19 – Coupe histologique de villosités du tissu EpilIntestinal [164].

#### b) Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont dites immortalisées car ce sont soit des cellules cancéreuses ayant un potentiel de prolifération illimité, soit des cellules modifiées génétiquement afin de prolonger leur temps de culture. Un bon modèle de lignée cellulaire *in vitro* doit posséder les propriétés essentielles à la nature de l'épithélium *in vivo* considéré. On doit pouvoir retrouver certaines caractéristiques histologiques et fonctionnelles (mucus, polarisation des cellules, microvillosités, ...). L'étanchéité de la barrière peut être mesurée, par exemple, via la résistance électrique transépithéliale (TEER). Enfin, les jonctions cellulaires et les différents transporteurs membranaires doivent être exprimés.

Il existe différentes lignées cellulaires intestinales telles que les Caco-2 [166], HT29 ou encore les T84 [167]. La plus utilisée est la lignée Caco-2 qui a été isolée à partir d'un adénocarcinome. Ses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles sont atteintes après une période de différenciation. Une fois différenciées, ces cellules forment une monocouche polarisée qui expriment un complexe de jonctions intercellulaires et une bordure en brosse avec des microvillosités du côté apical. Ces cellules, lorsqu'elles sont stimulées par des cytokines sont également capables d'en produire.

Différents modèles de lignées cellulaires de BHE ont également été développés tels que les hCMEC/D3 [168], hBMEC [169], and BB19 [170]. La lignée hCMEC/D3 a été isolée à partir de cellules endothéliales de micro-vaisseaux de lobes temporaux, les marqueurs endothéliaux (VE-cadhérine, facteur de Von Willebrand, ...) sont bien exprimés. Cette lignée est très bien caractérisée et est un candidat prometteur pour l'évaluation de la perméabilité des médicaments. En effet, bien que possédant certaines limites notamment concernant l'expression des jonctions cellulaires, de nombreux transporteurs membranaires sont retrouvés à un niveau comparable à celui observé *in vivo* chez l'Homme (Figure 20).

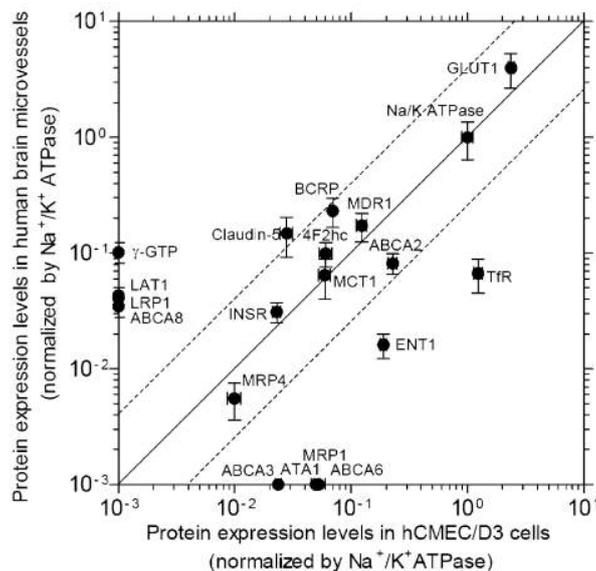


Figure 20 – Relation entre l'expression du niveau d'expression protéique membranaire dans le modèle hCMEC/D3 et dans des micro-vaisseaux cérébraux humains [171].

## 2) Méthodes d'étude

Différentes méthodes permettent d'évaluer l'expression ou l'activité des acteurs du métabolisme et du transport des médicaments. Les études transcriptomiques permettent d'étudier le niveau d'ARNm et de rendre compte de régulations potentielles au niveau des transcrits. Les approches protéomiques, qui ne seront pas développées dans ce chapitre, mesurent le niveau d'expression protéique. Enfin il est également possible d'évaluer les variations d'activité de ces acteurs par des tests fonctionnels.

a) Etudes transcriptomiques

- **Les puces à ADN**

Les puces à ADN ont été développées dans les années 90 et sont principalement utilisées dans le but de quantifier l'expression des gènes (ou transcrits). Elles sont constituées d'une petite zone sur laquelle sont fixées plusieurs milliers de molécules d'ADN (appelées sondes) et dont la séquence et la position sur la puce sont connues. Comme pour la grande majorité des technologies permettant l'étude du transcriptome, elle nécessite au préalable une rétro-transcription des molécules d'ARN en ADN dit complémentaire (ADNc).

Cette approche permet de mesurer la concentration d'une séquence nucléotidique dans un échantillon grâce à l'hybridation des sondes fixées sur la puce avec les brins d'ADNc présents dans l'échantillon étudié. La mesure se fait grâce à la fluorescence émise par les brins d'ADNc marqués avant hybridation. Les intensités de fluorescence mesurées permettent ensuite d'identifier et de quantifier les transcrits présents dans l'échantillon. La principale limite de cette approche pour l'étude des transcriptomes est liée au fait que cette technologie ne donne pas accès à la séquence des gènes ou des transcrits et nécessite des connaissances a priori sur les gènes (ou transcrits) à étudier [172].

- **La RT-qPCR**

La RT-qPCR (Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction) est une méthode de quantification sensible qui peut être utilisée pour comparer les niveaux d'expression d'ARNm dans différentes populations d'échantillons. Elle est fréquemment utilisée pour évaluer l'expression des transporteurs et CYP dans diverses populations cellulaires [19, 31].

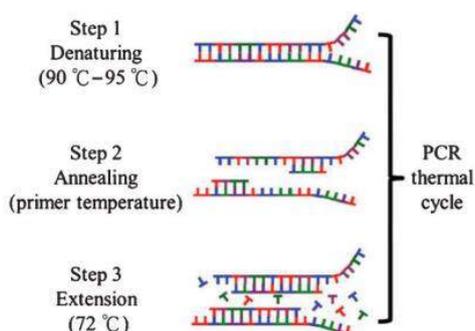


Figure 21 – Principe général d'un cycle de PCR [173].

La première étape est une transcription inverse qui permet de synthétiser le brin d'ADNc grâce à une ADN polymérase ARN dépendante. Ce brin d'ADNc est ensuite amplifié par PCR selon différentes étapes (Figure 21). Dans un premier temps l'ADN est dénaturé à haute température pour convertir l'ADN bicatenaire en monocatenaire. Deux amorces sont ensuite hybridées à l'ADN cible puis la chaîne d'ADN est étendue à partir de ces amorces en ajoutant des nucléotides et une ADN polymérase. La quantité initiale d'ADN est déterminée grâce à la détection de la fluorescence des produits de PCR néoformés [174].

Le Ct (cycle threshold = cycle seuil) correspond à la valeur à laquelle la courbe PCR croise le seuil de détection. Plus le Ct est élevé (30-35), moins l'ARNm détecté est présent, car il faut plus de cycles PCR pour pouvoir détecter l'amplification fluorescente. Si le Ct a une petite valeur (10-15), le gène est fortement exprimé. Les contrôles endogènes ont souvent un Ct plus petit que les autres gènes [174].

La méthode du  $\Delta\Delta Ct$  permet de calculer le ratio d'expression d'un gène cible entre 2 échantillons, en normalisant avec un gène de référence. Les différences  $\Delta Ct$  entre les valeurs de Ct du gène cible et du gène de référence sont déterminées pour l'échantillon à analyser et le contrôle :

$$\Delta Ct_{(\text{éch})} = Ct(\text{cible}_{\text{éch}}) - Ct(\text{référence}_{\text{éch}})$$

$$\Delta Ct_{(\text{cont})} = Ct(\text{cible}_{\text{cont}}) - Ct(\text{référence}_{\text{cont}})$$

Ensuite, le  $\Delta\Delta Ct$  entre le contrôle et l'échantillon est calculé :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{cont})} - \Delta Ct_{(\text{éch})}$$

Enfin, le ratio d'expression normalisé d'un gène cible est déterminé par la formule :  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Cette approche dite « gène à gène » permet d'étudier et d'analyser les transcrits au cas par cas. Elle peut être utilisée pour valider spécifiquement certains résultats obtenus après analyse des données de RNAseq [175].

#### - Séquençage d'ARNm (RNAseq)

Le RNA-seq est une approche récente qui utilise la seconde génération de séquenceur, appelés NGS (Next Generation Sequencing). Comme pour les méthodes décrites précédemment, c'est de l'ADN qui est lu par les machines, la première étape est donc également une rétro-transcription. L'étape de préparation des bibliothèques d'ADN à séquencer est commune à la majeure partie des NGS. L'ADN à séquencer est ensuite fragmenté et les fragments sont sélectionnés selon leur taille. Des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités de chaque fragment permettant la fixation et l'amplification de ces

derniers. Les adaptateurs servent également à l'identification des échantillons dans le cas où plusieurs sont séquencés. Les fragments sont ensuite fixés sur une flowcell et amplifiés par PCR. Des clusters correspondants chacun à un fragment initial sont alors obtenus contenant environ 1000 copies de celui-ci. Dans chacun des clusters, une base est incorporée dans chaque fragment, celle-ci émet un signal fluorescent qui est enregistré [172].

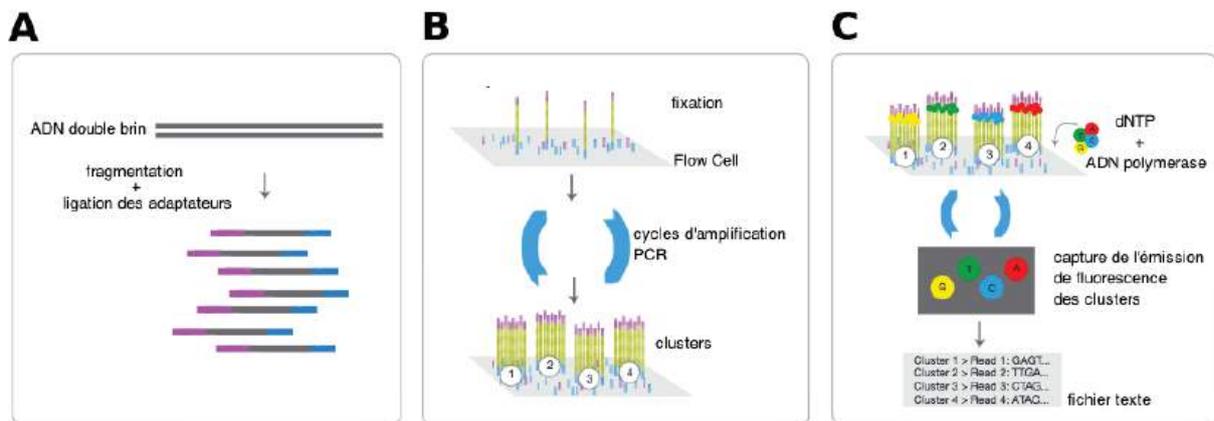


Figure 22 – Différentes étapes de préparation de librairie et de séquençage [172]. A) Fragmentation de l'ADN et ligation des adaptateurs aux extrémités des fragments. B) Fixation des fragments à la flowcell et amplification par PCR. C) Insertion des bases, lecture de la fluorescence et transformation en fichier texte.

Le RNA-seq permet, contrairement à la puce à ADN, d'avoir accès à la séquence, au nucléotide près, des transcrits de l'échantillon, et ne nécessite pas de connaissance a priori de ces séquences. La quantification relative des transcrits obtenue à partir de données RNA-seq est également plus précise qu'avec la puce à ADN.

On part du principe que plus un gène est exprimé plus il y aura de lectures du fragment correspondant. Pour un même niveau d'expression, un long transcrit aura plus de chances d'être séquencé et donc plus de lecture qu'un transcrit plus court, une normalisation par la taille du gène peut donc être effectuée afin de pouvoir comparer deux gènes d'un même échantillon entre eux. Le nombre de lectures dans un échantillon peut être plus élevé que dans un autre à cause de différents biais (par exemple un artefact PCR). La normalisation par le nombre total de lectures de tous les fragments de l'échantillon permet de comparer l'expression de gènes pour deux échantillons différents. Une des méthodes de représentation les plus utilisées exprime les résultats sous forme de « nombre de lectures d'un fragment par kilobase et par million de lectures » (Reads Per Kilobase and per Million (of reads) (RPKM)) :

$$RPKM = \frac{\text{nb de lectures du gène}}{\text{taille du gène} * \text{nb de lectures totales}} * 10^3 * 10^6$$

## b) Méthode d'évaluation du transport

Différentes méthodes d'évaluation de la prise en charge des médicaments par les transporteurs ABC peuvent être utilisées sur les différents modèles in vitro. Deux techniques principales permettent d'évaluer la fonctionnalité des transporteurs : l'accumulation intracellulaire et la perméabilité.

### - **Accumulation intracellulaire**

Les études d'accumulation permettent d'évaluer la fonctionnalité des transporteurs ABC (Figure 23). Les cellules sont exposées à un substrat spécifique pendant une durée variable. La même expérience est réalisée en présence d'un inhibiteur du transporteur étudié. La quantité de substrat à l'intérieur et à l'extérieur des cellules est mesurée à la fin de l'incubation.

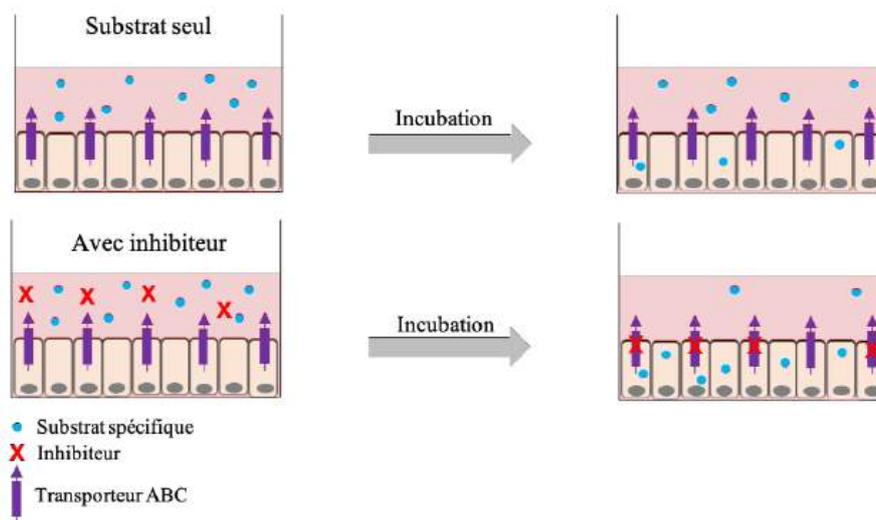


Figure 23 – Représentation d'une étude d'accumulation intracellulaire [162].

Cette méthode ne prend pas en compte l'aspect de barrière cellulaire et ne reflète pas le transport d'un médicament à l'échelle de la barrière in vivo, elle se focalise sur l'activité du transporteur.

### - **Perméabilité**

Dans le cas d'un système en 3D possédant un compartiment apical et un compartiment basal, l'étude du transport peut également être basée sur l'évaluation des perméabilités du composé dans un sens et dans l'autre. La perméabilité est calculée selon l'équation suivante :

$$P_{app} = \frac{Cf * V}{Dt * S * C0}$$

où  $C_f$  est la concentration finale du composé dans le compartiment basal,  $V$  est le volume du compartiment basal,  $Dt$  est le temps d'incubation,  $S$  est la surface de la couche cellulaire et  $C_0$  est la concentration initiale du composé dans le compartiment apical.

L'expérience peut être réalisée en absence ou en présence d'inhibiteur avec la même durée d'exposition au composé.

L'expérience peut être réalisée en absence ou en présence d'inhibiteur avec la même durée d'exposition au composé.

$$RE = \frac{P_{app\ B \rightarrow A}}{P_{app\ A \rightarrow B}}$$

### c) Méthode d'évaluation de l'activité des CYPs

Les différents modèles utilisés *in vitro* lors d'étude du métabolisme des médicaments sont généralement des modèles d'enzymes recombinantes humaines (rhCYP450), des microsomes (fractions S9), des coupes de tissu et de cultures cellulaires.

Pour déterminer l'activité d'un CYP, le substrat utilisé lors de l'expérience doit être majoritairement ou exclusivement métabolisé par le CYP. Le substrat ne doit pas présenter d'autre source majeure de variabilité. Les substrats peuvent être administrés seuls ou en cocktail pour étudier plusieurs CYPs à la fois. La quantité des métabolites spécifiques formée est ensuite mesurée [176].

Dans un système *in vitro* la quantité de métabolite mesurée peut être normalisée par la quantité de protéines. Les résultats exprimés peuvent être exprimés sous forme de ratio-métabolique en divisant la quantité de métabolite formée par la quantité de molécule parent présent à la fin de la réaction.

La FDA a publié des lignes directrices concernant les substrats à utiliser par l'industrie pharmaceutique. Le tableau 1 montre les réactions de substrats privilégiés par la FDA pour les études de métabolisme des principaux CYPs *in vitro* :

Tableau 1 – Réactions métaboliques spécifiques des différents CYPs [177]

Enzyme	Marker reaction
CYP1A2	Phenacetin O-deethylation, 7-Ethoxyresorufin-O-deethylation

CYP2B6	Efavirenz hydroxylation, Bupropion hydroxylation
CYP2C8	Paclitaxel 6 $\alpha$ -hydroxylation, Amodiaquine N-deethylation
CYP2C9	S-Warfarin 7-hydroxylation, Diclofenac 4'-hydroxylation
CYP2C19	S-Mephenytoin 4'-hydroxylation
CYP2D6	Bufuralol 1'-hydroxylation, Dextromethorphan O-demethylation
CYP3A4/5	Midazolam 1'-hydroxylation, Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation

## Objectifs et stratégie de la thèse

Les données concernant l'effet de l'IL-6 sur l'activité des CYPs et des transporteurs sont assez exhaustives sur les hépatocytes, mais fragmentaires sur les entérocytes et sur la BHE. Or, il est important d'inclure ces organes dans la réflexion sur l'impact de l'inflammation sur la cinétique des médicaments, en raison de leur rôle respectif dans l'absorption des médicaments, et dans leurs effets centraux.

L'objectif de cette thèse était dans un premier temps d'étudier les modifications induites par l'IL-6 sur des modèles *in vitro* d'intestin et de BHE. Ces changements étaient à interpréter de manière qualitative afin de trouver les potentiels acteurs impactés *in vivo*.

Dans un deuxième temps, l'objectif était de quantifier l'impact de l'inflammation en développant un modèle prédictif (un modèle PBPK générique) capable de relier un niveau d'inflammation (apprécié par la concentration plasmatique de CRP) avec l'activité des cytochromes et donc d'être capable de prédire le profil pharmacocinétique d'un médicament substrat, pour un niveau d'inflammation donné.

In fine, ce modèle PBPK doit également servir à prévoir l'effet des anti-inflammatoires (protéines thérapeutiques ou petites molécules) sur la cinétique des médicaments métabolisés par les cytochromes.

## Chapitre 2: Impact de l'interleukine-6 sur l'intestin

## Résumé :

Dans la présentation du contexte de la thèse nous avons vu que différentes cytokines entraînaient une baisse d'expression et d'activité des enzymes du métabolisme et des transporteurs de médicaments. L'essentiel de ces résultats proviennent de travaux sur hépatocytes et modèles hépatocytaires. Dans un premier temps, nous avons validé que nous retrouvions bien les résultats observés dans la littérature en exposant une lignée cellulaire hépatocyttaire, hepaRG [178], à l'IL-6. Les changements du niveau d'expression d'ARNm observés (Figure 24) par RTqPCR ciblant le CYP3A4 étaient cohérents avec les données de la littérature [19].

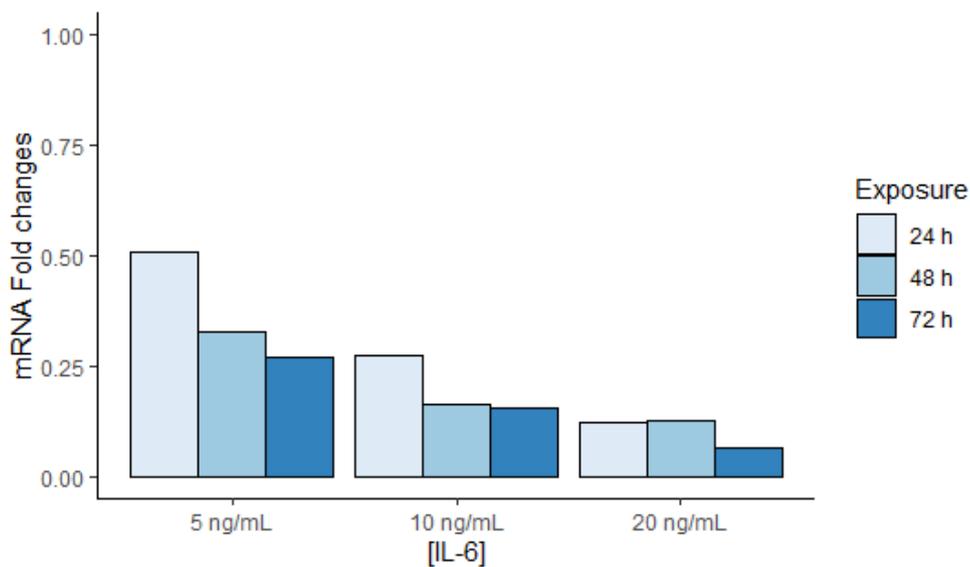


Figure 24 – Niveaux d'expression relatif moyen d'ARNm du CYP3A4, déterminé par RTqPCR et normalisé par le gène de ménage RPLP0, après exposition d'hepaRG à 5, 10 et 20 ng/mL pendant 24, 48 et 72h par rapport échantillons contrôles (échantillon par condition N=3, expérience indépendante N=1). Les rapports de niveaux d'expression sont calculés par la méthode de  $\Delta\Delta Ct$ .

L'intestin est un organe clef de l'absorption et de la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale. Un modèle de micro-tissus intestinaux humains cultivés en 3D sur insert a été développé par Mattek [165]. Il présente des caractéristiques physiologiques proches de celles observées *in vivo*. Nous proposons dans ce travail une exploration par séquençage d'ARNm des différents gènes dérégulés suite à une exposition de différentes durées et à différentes concentrations d'IL-6. Nous nous sommes ensuite particulièrement intéressés aux CYPs et aux transporteurs ABC en regardant l'effet sur leur activité.

L'analyse transcriptomique a essentiellement permis de mettre en évidence une baisse d'expression des enzymes de phase I, les modifications observées augmentaient avec la durée d'exposition. Les autres familles de gènes étudiées présentaient des dérégulations relativement faibles. L'activité des

différents CYPs diminuait significativement après l'exposition à l'IL-6. En revanche, celle des transporteurs ABC était beaucoup moins impactée.

Ces résultats associés à ceux de la littérature sur hépatocytes, montrent que le métabolisme intestinal des médicaments et donc l'effet de premier passage peuvent être diminués, augmentant ainsi la biodisponibilité.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *The AAPS Journal*.



## Research Article

# Impact of Interleukin-6 on Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Intestinal Cells

Florian Simon,<sup>1,2,4,5</sup> Jessica Garcia,<sup>2</sup> Laetitia Guyot,<sup>2</sup> Jérôme Guitton,<sup>2</sup> Gaëlle Vilchez,<sup>3</sup> Claire Bardel,<sup>3</sup> Marylore Chenel,<sup>4</sup> Michel Tod,<sup>1</sup> and Léa Payen<sup>2</sup>

Received 19 June 2019; accepted 10 October 2019

**Abstract.** Inflammatory response is characterized by an increase of several cytokines. Some are known to modify drugs pharmacokinetic by reducing the expression levels of drug-metabolizing enzymes (DMEs) and transporters. This impact of inflammatory signaling is well established in hepatic cells, but not in intestinal cells. EpiIntestinal is a 3D human small intestinal tissue model with epithelial polarity, allowing good evaluation of metabolism and drug transport. This study aimed to analyze the effect of IL-6 on this tissue model. RNA sequencing was performed in cells incubated with 5, 10, or 20 ng/mL IL-6 for 8 h to 72 h to study the impact of IL-6 on drug metabolism and pharmacokinetics gene expression. The influence of IL-6 on the activity of cytochromes P450 (CYPs) was studied by measuring metabolite formation of specific substrates with LC-HRMS. Its impact on ATP-binding cassette (ABC) transport was evaluated by measuring intra- and extracellular substrates using spectrofluorometry. Exposure of EpiIntestinal cells to IL-6 resulted in reduction of some CYP mRNAs, such as CYP2C19, CYP2C9, and CYP3A4, by 40% to 50%. Activities of these CYPs were also decreased in EpiIntestinal cells by 20% to > 75%. IL-6 exposure did not modify ABCB1 and ABCCs transporter activities in this model. This study shows that gene expression levels and activities of drug-metabolizing enzymes and ABC transporters may be altered by the pro-inflammatory cytokine IL-6 in intestinal cells. If these results are confirmed in vivo, it may result in pharmacokinetic modifications, such as pre-systemic metabolism, with clinical effects, and require dosage adaptation.

**KEYWORDS:** inflammation; intestine; metabolism; RNA sequencing.

## INTRODUCTION

Inflammatory response involves the coordinated communication of immune cells and blood vessels through an intricate cascade of molecular signals. Inflammation can cause conditions including fever, cardiovascular pathology, allergy anaphylaxis, fibrosis, and autoimmunity, and leads to increased systemic cytokines. Some, such as interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ , are known to modify the expression of drug-metabolizing enzymes (DMEs) and

drug transporters (1). In vitro studies on hepatic cell lines have quantified cytokine production and effects on regulatory signaling pathways of phase I DMEs, such as cytochromes P450 (CYPs). Expression of all major CYPs, including the most expressed CYP3A4, is downregulated, and their activities are decreased after cytokine stimulation (1–3). Exposure of the hepaRG hepatic cell line to IL-6 (10 ng/mL) for 72 h decreased CYP3A4 mRNA expression and activity by > 80%, CYP1A2 activity by 60%, and CYP2B6 and 2C19 activity by 80%. Drug transporters' expression levels and transport activities have also been investigated in rat and in freshly isolated and cryopreserved human hepatocytes. Some ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) transporters are also repressed (4,5). In freshly isolated human hepatocytes exposed to 10 ng/mL IL-6 for 48 h, ABCB1, ABCG2, and ABCC2, mRNA expression is decreased by 40% to 50% (6).

Several clinical studies demonstrate the inflammatory response's direct impact on drug pharmacokinetics. Interferon (IFN)- $\alpha$  administration in chronic hepatitis B disease reportedly decreases theophylline clearance and increases its half-life (7). Two studies on rheumatoid arthritis patients

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1208/s12248-019-0395-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

<sup>1</sup> EA3738, Faculté de médecine de Lyon-Sud, Université de Lyon 1, Oullins, France.

<sup>2</sup> Laboratoire de biochimie-toxicologie, Centre hospitalier Lyon-Sud, Hospices civils de Lyon, Pierre Bénite, Lyon, France.

<sup>3</sup> Department of biostatistics, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

<sup>4</sup> Institut de recherches internationales Servier, Suresnes, France.

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed. (e-mail: [florian.simon@univ-lyon1.fr](mailto:florian.simon@univ-lyon1.fr))

revealed that the administration of monoclonal antibodies (mAbs) blocking IL-6 receptor (sarilumab or tocilizumab) increased the metabolism of co-administered simvastatin and reduced its area under the time-concentration curve (AUC). Indeed, AUC is decreased by 57% after sarilumab and by 43% after tocilizumab administration. The decline of simvastatin's maximal concentration in plasma ( $C_{max}$ ) is about 52% after sarilumab and 39% after tocilizumab administration (8,9), suggesting anti-IL-6 mAbs can reverse CYP3A4 repression and restore simvastatin metabolism.

IL-6 is a main cytokine involved in acute phase response (10), which leads to impaired DME and drug transporters. Although the molecular mechanism is not fully determined, binding of IL-6 to its receptor activates several signaling pathways mediated by protein kinases, such as the PI3K/AKT, MAP/ERK, and JAK/STAT pathways. Primary human hepatocytes have been exposed to IL-6 in the presence or absence of specific inhibitors of PI3K, MEK1/2, and STAT3 alone or in combination. These inhibitors attenuated or abolished the IL-6 downregulation induced in DME and transporter genes, and the potency of recovery differed with respect to the pathway blocked. Gene recovery was greatest in the MAPK/ERK pathway, when inhibited. Different transcription factors are involved. For example, the kinase AKT may activate NF $\kappa$ B, which binds to RXR and antagonizes its ability to heterodimerize with other nuclear receptors involved in DME and drug transporter synthesis, such as CAR, PPAR, and PXR. The truncated enhancer-binding protein C/EBP $\beta$ -LIP (liver inhibitory protein) is induced by IL-6 and antagonizes activation of CYP3A4 by C/EBP $\beta$ -LAP (liver activating protein) (11).

Most topical studies have been conducted on liver cells; however, the gut is another key organ for drug pharmacokinetics. Enzymes and transporters in the gut influence the absorption and pre-systemic metabolism of many drugs. The intestine may also be affected by the inflammatory response, although its impact is not well established. There have been few studies in mouse or human colon carcinoma cell lines to study the impact of TNF $\alpha$  and IL-2 on ABCB1; these studies have had varying results regarding mRNA expression and decreased protein function (12). Our experiments utilized the EpiIntestinal tissue model, a human 3D small intestinal cell model that expresses functional tight junctions, prominent transporters, and DME (13). Cells are cultured on a porous membrane with apical and basolateral compartments, allowing transport tests.

We conducted this study to provide exhaustive data on intestinal tissue and discuss the potential consequences on drug bioavailability and drug-drug interactions. First, we screened genes involved in drug pharmacokinetic deregulated after IL-6 stimulation by RNA sequencing. Next, we focused on functional experiments on main CYPs and drug transporters. Results confirm decreased CYP gene expression and function in the liver, but not on drug transporters.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Reagents

Recombinant human IL-6 was provided by PreproTech (Neuilly-sur-Seine, France). Mephenytoin was from Santa

Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Dextromethorphan hydrochloride monohydrate and tolbutamide were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Midazolam (Mylan) was a kind gift of Croix Rousse hospital pharmacy. Nifedipine from Sigma-Aldrich was a kind gift from Professor J. Guillon. The 5-carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and rhodamine 123 (Rho123) were from Sigma-Aldrich.  $\alpha$ -Hydroxymidazolam-D4 was from Eurisotop (Saint-Aubin, France), and [2H6]-dehydronifedipine, [13C,2H3]-dextrorphan, [13C,2H3]-4-hydroxymephenytoin, and [2H9]-4-hydroxytolbutamide were from Alsachim (Illkirch, France). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was provided by Sigma-Aldrich.

### Standard Solutions

Substrates for the cocktail assay were dissolved in water (dextromethorphan and midazolam), in pure DMSO (nifedipine and tolbutamide), and in ACN (mephenytoin) at concentrations of 2.5 mM (dextromethorphan), 3 mM (midazolam), 10 mM (nifedipine), and 100 mM (mephenytoin and tolbutamide). Substrates for the transport assay were dissolved at a concentration of 3 mM solution in DMSO for CFDA and 5.25 in ethanol for Rho123. IL-6 was reconstituted in PBS 1X + BSA 0.1% and diluted to obtain and stock standard solutions of 1  $\mu$ g/mL.

### Microtissues Preparation and Cells Culture

EpiIntestinal tissues were obtained from MatTek (Bratislava, Slovak Republic). The human cell-based 3D model incorporates enterocytes, paneth cell, M cells, tuft cells, and intestinal stem cells into a highly differentiated, polarized epithelium. Important features of EpiIntestinal include the presence of functional tight junctions and brush borders at the apical tissue surface. Cells harvested from post-mortem donors following IRB approval and were seeded onto cell culture inserts. Cells were cultured with 100  $\mu$ L of SMI-100-MM medium in the apical compartment and 5 mL in the basolateral compartment. Medium containing or lacking IL-6 was renewed every 24 h. TEER measurements were performed by the vendor before shipment on 3 tissues. For the CYPs P450 functional assay the mean TEER value was  $126.6 \pm 5.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  and for the ABC transporter functional assay it was  $181.35 \pm 10.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (with acceptance criteria: 90–300  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ).

### Library Construction and RNA Sequencing

EpiIntestinal cells were exposed to 5, 10, or 20 ng/mL IL-6 for 8, 24, 48, or 72 h. Total RNA was isolated from EpiIntestinal using Maxwell 16 LEV simply RNA cells kit (#AS1270) from Promega (Charbonnières les bains, France). The RNA concentrations of extracted samples were measured using the Qubit<sup>®</sup> HS RNA Assay kit. The integrity of RNA samples was evaluated using the RNA 6000 Pico Kit running on the 2100 BioAnalyzer from Agilent Technologies (Santa-Clara, California, US) according to the manufacturer's instructions. For mRNA sequencing, total RNA samples with an RIN score > 9 were diluted to 20 ng/ $\mu$ L in a final volume of 50  $\mu$ L, for a total input of 1  $\mu$ g. First, mRNAs were isolated from total RNA using the "NEBNext Poly(A) mRNA

Magnetic Isolation Module" (NEB#E7490) from New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, US), thanks to oligo-dT beads complementary to the polyA tails of mRNA. Next, libraries were created from mRNA isolated using the "NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina" (NEB#E7760S). The sequencing reads were obtained after demultiplexing the raw sequencing data using bcl2fastq v2.19.1.403 (Version v2.15.0 for NextSeq™ 500, Illumina company). After validating the quality controls of each sample using FastQC v0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), the alignment files were generated with STAR v2.5.2b in the "2-pass" mode, on the hg19 human genome. Once the final sorted alignment file was obtained, the count of reads was completed using the GFOLD V1.1.4 (option – count; <https://bitbucket.org/feeldead/gfold/>) and the GENCODE annotation file of the human genome (gencode.v19.annotation.gtf). Then, the differential expression of genes was determined using the GFOLD-diff bioinformatics pipeline based on the mean values of three independent samples.

#### Measurement of Cytochrome P450 Enzyme Activity

Cytochrome P450 enzyme activities were determined in EpiIntestinal cell culture in apical, basolateral, and intracellular compartments using a substrate cocktail assay based on liquid chromatography with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Cells were treated with or without 20 ng/mL IL-6 for 72 h before incubation with the substrate cocktail. Metabolic activity was measured by adding substrate cocktail to the apical compartment and incubating for 3 h at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>). Substrate concentrations used in the cocktail are shown in Table I. The final concentration of organic solvent during incubation was < 1% (v/v). Optimal substrate concentrations and incubation time were determined by Feidt et al. (14).

Apical and basolateral supernatants were stored at –20 °C until analysis by LC-HRMS. Tissues on inserts were washed three times with cold PBS before adding cold methanol. After 5 min of incubation, supernatants were collected and stored at –20 °C until analysis. Proteins in all intracellular samples were measured using the GE NanoVue spectrophotometer from Biochrom US (Holliston, MA, US) at 280 nm. Formation of 4-hydroxytolbutamide was below the limit of quantification, and CYP2C9 activity was excluded from further analysis. Six samples were used for each experimental condition (control and medium with IL-6). For each metabolite, we randomly sampled one formation rate under IL-6 condition and one control among the six replicates; we computed the ratio and repeated the operation 1000 times. Then, the mean and standard deviation (SD) of these ratios were calculated.

#### Transport Assays

Transport assays were performed to assess functional activity of ABCB1 and ABCCs. Rho123 (5.25 μM) was used as ABCB1 substrate, CFDA (3 μM) is used as its metabolite carboxyfluorescein (CF) is an ABCCs substrate (15).

EpiIntestinal samples were treated with or without 20 ng/mL IL-6 for 72 h. Rho123 or CFDA were added to the apical compartment to mimic a physiological process and cells were

incubated for 1 h. Medium from the apical and basolateral compartments was reserved, and the amounts of substrate were measured by spectrofluorimetry. Cells still on inserts were washed twice with PBS and incubated with PBS-Triton 1% for 15 min at 37 °C. Intracellular accumulation was also measured by spectrofluorimetry. Proteins in all intracellular samples were measured using the colorimetric BCA protein assay.

#### Statistical Analysis

Quantitative data were usually expressed as mean ± S.E.M. They were statistically analyzed using the multiple comparison Dunn's test for RNAseq results, tests of Student for CYPs P450 activity tests and Mann-Whitney tests for ABC-transporter activity tests. The criterion of significance was  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

#### Effect of IL-6 on Gene Expression in EpiIntestinal Cells

After treatment of 3 independent EpiIntestinal tissues with different IL-6 concentrations for 24 h (Supplemental Fig. 1) or 72 h (Supplemental Fig. 2), nearly the same genes were deregulated. CRP and SOCS3 were upregulated and reached eightfold and fivefold increases, respectively, at IL-6 highest concentrations (20 ng/mL) (Table III). After exposure to IL-6 (20 ng/mL), the expression of several phase I enzymes was reduced as follows: MAO A, 35%; MAO B, 42%; CYP2C19, 45%; CYP2C9, 42%; and CYP3A4, 55% (Table II and III). Only weak impact < 20% on CYP2D6 mRNA was observed. Among phase II enzymes, SULT1B1 expression increased by about 80% and UGT2B7 expression decreased by 30%, on average; NAT expression decreased by 37% after 24 h of exposure, but the effect was reduced after 72 h of exposure (Table II and III). ABCC2 was also downregulated for all the conditions tested; the average decrease was about 25% (Table II and III). Nuclear receptors were impacted slightly; only the FXR gene (NR1H4) was upregulated, by 30% on average (Table II and III). Gene expression of the lysosomal enzyme cathepsin-S was increased by > 50% after 72 h of exposure to 10 ng/mL or 20 ng/mL IL-6 (Table III).

#### Influence of Exposure Time

The relative expression of several genes in response to different IL-6 exposure time is summarized in Supplementary Fig. 3. Three independent EpiIntestinal tissues were exposed to IL-6 (10 ng/mL) for 8, 24, 48, and 72 h. IL-6 stimulation led to an inflammatory response resulting in a significantly increase in CRP gene expression after 24 h and 72 h exposure and a fourfold increase in expression of the regulator SOCS3 after 72 h (Table IV). After 72 h of exposure to IL-6, the expression of phase I enzymes was downregulated as follows: CYP2C19, 47%; CYP2C9, 35%; and CYP3A4, 51% (Table IV). Regarding phase II enzymes, SULT1B1 expression was increased by 71% after 48 h, and TPMT expression was decreased by 32% after 72 h of exposure to IL-6 (Table IV). Drug transporters were impacted slightly;

**Table I.** Cytochromes P450 substrates for activity cocktail assay

Cytochrome P450	Substrate	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Metabolite measured
CYP2C19	Mefenitoin	100	4-hydroxymefenitoin
CYP2C9	Tolbutamide	100	4-hydroxytolbutamide
CYP2D6	Dextrometorphan	5	Dextrorphan
CYP3A4	Nifedipine	10	Oxidized nifedipine
CYP3A4	Midazolam	3	1-hydroxymidazolam

ABCC2 expression was downregulated by 36%, and ABCG2 expression was downregulated by 24% after 24 h of IL-6 exposure, and ABCC5 expression was decreased by 31% after 8 h of IL-6 exposure (Table IV). Expression of the nuclear receptor FXR was increased by 45%, on average (Table IV). Cathepsin-S was upregulated by  $\geq 65\%$  (Table IV). Although Fc gamma receptors (known to interact with Immunoglobulin (Ig) G) have also been studied, they were not expressed at high enough concentrations in this intestinal model for their susceptibility to IL-6 to be measured. Several genes, such as ABCC5, CTSD, UGT1A1, or UGT1A10, were deregulated for short exposure durations (8 h and 24 h) and restored after long exposure durations (48 h and 72 h), likely due to cellular adaptation mechanisms.

#### Effect of IL-6 on the Activity of Cytochromes P450

Formation of OH-mefenitoin, dextrorphan, OH-nifedipine, and OH-midazolam in intracellular compartment was measured in control and 20 ng/mL IL-6 exposed cells; the results are summarized in Fig. 1. Intracellular metabolite formation was normalized to protein concentration. Respective activities of CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 were downregulated after 6 EpiIntestinal tissues were exposed to IL-6. HO-mefenitoin formation was decreased by 74%, dextrorphan by 87%, OH-nifedipine by 48%, and OH-midazolam by 64%.

#### Effect of IL-6 on the Activity of ABC Transporters

EpiIntestinal cells were exposed to 20 ng/mL IL-6 for 72 h. After 1 h of substrate incubation, Rho123 and CF were measured in apical and intracellular compartments (Fig. 2). Exposure to IL-6 decreased the apical-intracellular ratio of Rho123 accumulation by 20% and the ratio of CF by 16.5%.

## DISCUSSION

Inflammatory signaling affects the expression and activity of hepatic DME and transporters, with potential impacts on drug pharmacokinetics. The impact of inflammatory signaling on the gut is not well known, despite its major role in drug bioavailability. The aim of this study was to quantify the effect of inflammation on enterocytes. IL-6 was chosen as a major acute phase response marker to stimulate the 3D EpiIntestinal cell model, and its impact on gene expression and on the activity of CYPs P450 and transporters was evaluated. First, three different IL-6 concentrations (5, 10, and 20 ng/mL) were tested on the EpiIntestinal model, based on previous studies on hepaRG cells showing that 10 ng/mL is enough to induce a maximal effect on gene expression. The

plasma level of IL-6 in healthy people is only a few pg/mL and can reach tens or hundreds of pg/mL in some diseases, such as cancer or rheumatoid arthritis (16). Higher concentrations of IL-6 may be found in some tissues because of the local aspect of the inflammatory response. Chronic inflammation can result in the modification of drug pharmacokinetics, with potential clinical consequences. IL-6 stimulation of EpiIntestinal cells increases the expression of systemic inflammatory markers such as CRP (Table II). A more potent effect was observed in hepatic cell lines, probably because of the location where these proteins are synthesized (1). The suppressor of cytokine signaling, SOCS3, is also induced in both cell lines (Table II).

Among the major phase I DME genes, expression of CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, MAO-A, and MAO-B were the most affected by IL-6 stimulation in the EpiIntestinal model (Table IV). By comparing our RNAseq results with data of small human intestinal tissues from GTEx databank and Caco-2 model (17), we observed that CYP3A4 is well expressed in EpiIntestinal model indeed 109.5 RPKM in small human intestine versus 25.2 RPKM in EpiIntestinal and under limit of quantification for Caco-2 model. Same trend was observed for the different CYPs. Further investigations on the respective activities of CYPs were conducted, and the rates of metabolite formation were reduced after IL-6 stimulation. Previously, more potent effects of IL-6 on CYP activity have been demonstrated on hepatic cell lines than on EpiIntestinal tissues, indeed activity decreases reached 80% for CYP1A2, more than 95% for CYP2B6, 90% for CYP 2C19, more than 20% for CYP2C9, and more than 80% for CYP3A4 (1–3). These modifications may impair the pre-systemic metabolism of a large panel of drugs, including tacrolimus, atorvastatin, simvastatin, ibuprofen, midazolam, and verapamil substrates of CYP3A4. Phase II enzymes were affected less than phase I enzymes. SULT1B1 was upregulated, and the same trend has been observed in a previous study on human hepatocytes (1). UGT2B7, one of the main UGTs recommended by the European Medicines Agency to be investigated during drug-drug interaction studies (18), is downregulated after the longest durations of IL-6 exposure (Table III and IV). All of the genetic downregulations highlighted were increased with the duration of IL-6 exposure, which is important in the context of chronic inflammatory diseases.

Only minor effects on drug transporters were observed. Only ABCC2 mRNA was downregulated by  $> 30\%$ , with a weak impact in terms of activity. In hepatic cell lines, a much greater impact was observed previously on the expression of ABCB1, ABCG2, and ABCC2 mRNAs, and on the mRNAs of some SLC transporters, such as SLC01B1 (OATP1B1), SLC22A1 (OCT1), and SLC10A1 (NTCP) (4–6,19). These variations, more important in the liver than in the intestine, may modify drug first pass effect.

**Table II.** The effect of exposure duration on mRNA expression of inflammatory response proteins, phase I enzymes, phase II enzymes, drug transporters, nuclear receptors and biologics elimination mediators in EpiIntestinal cells exposed to IL-6. Cells were treated with 5, 10 or 20 ng/mL IL-6 for 24 h.

	Tneg		5 ng/mL			10 ng/mL			20 ng/mL		
	Mean	SD	Mean	SD	FC	Mean	SD	FC	Mean	SD	FC
<b>Acute phase response</b>											
CRP	0.0058	0.0082	0.0156	0.0221	2.69	0.0399	0.0184	6.86	0.0275	0.0304	4.73
SAA1	0.40	0.14	1.25	0.26	3.17	2.49**	0.46	6.30	3.12**	1.30	7.88
SAA2	0.05	0.04	0.26	0.06	5.40	0.63**	0.13	12.9	0.58**	0.22	11.92
SOCS3	3.04	0.17	10.1	1.54	3.31	14.1*	2.2	4.62	17.3**	3.2	5.69
<b>Phase I enzymes</b>											
ALDH1A1	41.9	2.55	37.5	1.36	0.90	34.2	7.20	0.82	39.8	13.2	0.95
ALDH2	37.4	1.24	34.4	2.66	0.92	36.5	1.74	0.98	35.4	1.37	0.95
CBS2	23.3	3.40	23.0	1.68	0.99	22.3	2.81	0.95	20.4	1.26	0.87
CYP2C19	12.1	0.78	8.52	2.32	0.70	8.22	2.56	0.68	7.19*	2.11	0.59
CYP2C9	8.95	0.13	6.33	2.39	0.71	8.06	1.78	0.90	5.40	1.04	0.60
CYP2D6	1.88	0.21	2.13	0.03	1.13	2.48	0.38	1.32	1.88	0.46	1.00
CYP3A4	24.7	5.06	21.0	5.81	0.85	14.8	2.33	0.60	13.1	7.17	0.53
CYP3A5	12.2	0.23	11.1	1.26	0.91	12.4	0.78	1.01	10.9	1.25	0.89
FMO4	4.17	0.10	4.00	0.95	0.96	3.95	0.22	0.95	3.70	0.41	0.89
FMO5	3.61	0.46	3.63	0.39	1.00	3.29	0.60	0.91	3.38	0.45	0.93
MAOA	7.53	0.96	5.74	1.02	0.76	5.12	0.84	0.68	5.94	1.87	0.79
MAOB	12.2	1.35	9.60	2.52	0.79	8.59	1.48	0.70	7.62*	1.46	0.62
<b>Phase II enzymes</b>											
GSTP1	282	27.0	239	11.60	0.85	268	45.9	0.95	246	24.6	0.87
NAT1	1.87	0.33	1.45	0.17	0.77	1.83	0.10	0.98	1.72	0.27	0.92
NAT2	3.44	0.14	3.61	1.16	1.05	3.13	0.75	0.91	2.19	0.51	0.64
SULT1A1	3.92	0.07	3.71	0.45	0.95	4.60	0.65	1.18	3.32	0.31	0.85
SULT1A3	47.9	2.46	46.9	4.75	0.98	53.5	12.0	1.12	42.7	4.52	0.89
SULT1B1	2.50	0.20	3.79	1.71	1.52	3.11	0.95	1.25	3.21	1.38	1.28
TPMT	9.68	0.18	10.8	1.40	1.11	11.8	1.51	1.22	10.4	1.02	1.07
UGT1A1	7.72	1.48	7.25	0.16	0.94	6.35	1.17	0.82	6.17	1.38	0.80
UGT1A10	12.8	1.92	12.2	0.43	0.96	11.6	2.62	0.91	10.2	2.03	0.79
UGT2B7	1.76	0.27	1.33	0.13	0.76	1.76	0.30	1.00	1.54	0.53	0.87
<b>Transporters</b>											
ABCB1	1.97	0.27	2.25	0.28	1.14	1.53	0.31	0.78	1.36	0.50	0.69
ABCC1	4.30	0.25	4.54	0.47	1.06	4.11	1.11	0.95	4.97	0.82	1.16
ABCC2	54.0	3.12	45.9	7.07	0.85	35.5**	7.55	0.66	39.4	7.75	0.73
ABCC3	18.0	0.86	18.3	0.40	1.02	19.1	2.37	1.06	18.2	4.21	1.01
ABCC4	3.65	0.38	3.73	0.39	1.02	3.63	0.74	1.00	5.01	0.66	1.37
ABCC5	1.95	0.30	2.13	0.08	1.09	2.19	0.50	1.12	2.42	0.53	1.24
ABCG2	3.26	0.29	2.90	0.39	0.89	2.42	0.41	0.74	2.67	0.49	0.82
SLCO1A2	4.22	0.28	3.93	0.65	0.93	3.92	0.61	0.93	3.77	0.60	0.89
SLCO2B1	85.4	0.86	86.4	2.27	1.01	78.1	11.3	0.91	75.1	13.87	0.88
<b>Nuclear factors</b>											
AHR	8.17	0.79	8.41	0.53	1.03	8.32	1.94	1.02	9.73	0.83	1.19
CEBPB	27.1	3.97	30.7	6.19	1.13	31.9	2.44	1.18	28.0	3.94	1.03
HNF4A	123	0.66	120	6.21	0.97	108*	7.59	0.87	113	7.48	0.92
NR1H3	11.2	0.33	10.3	0.64	0.92	12.5	1.79	1.11	11.0	1.57	0.98
NR1H4	4.71	0.33	6.17	1.62	1.31	6.80	1.38	1.44	4.50	0.57	0.96
NR1E2	2.35	0.17	2.52	0.23	1.07	2.39	0.27	1.02	1.79	0.18	0.76
NR1B3	5.75	0.58	4.96	0.88	0.86	5.34	0.96	0.93	4.06*	0.65	0.71
RXRA	11.2	0.60	11.1	0.42	1.00	9.42*	0.75	0.84	10.3	0.85	0.92
VDR	4.26	0.11	3.75	0.46	0.88	3.32*	0.32	0.78	3.32	0.14	0.78
<b>Proteins</b>											
CTSB	174	35	165	11	0.95	154	18.1	0.88	139	28	0.80
CTSD	163	11	148	18	0.91	150	15.9	0.92	138	5.0	0.85
CTSL	12.2	0.59	13.7	2	1.12	13.7	1.8	1.12	13.6	0.98	1.12
CTSS	1.87	0.06	3.09	0.89	1.66	2.65	0.62	1.42	2.31	0.24	1.24
FCGRT	59.2	2.0	52.6**	10.7	0.89	60.1	9.7	1.02	52.4	3.0	0.89

The mRNA expression of the indicated genes was determined using RNA sequencing. Data are expressed as the mean RPKM  $\pm$  SEM of 3 independent intestinal tissues. Dunn's test was performed; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. FC = Fold change

**Table III.** The effect of exposure duration on mRNA expression of inflammatory response proteins, phase I enzymes, phase II enzymes, drug transporters, nuclear receptors and biologics elimination mediators in EpiIntestinal cells exposed to IL-6. Cells were treated with 5, 10 or 20 ng/mL IL-6 for 72 h. The mRNA expression of the indicated genes was determined using RNA sequencing.

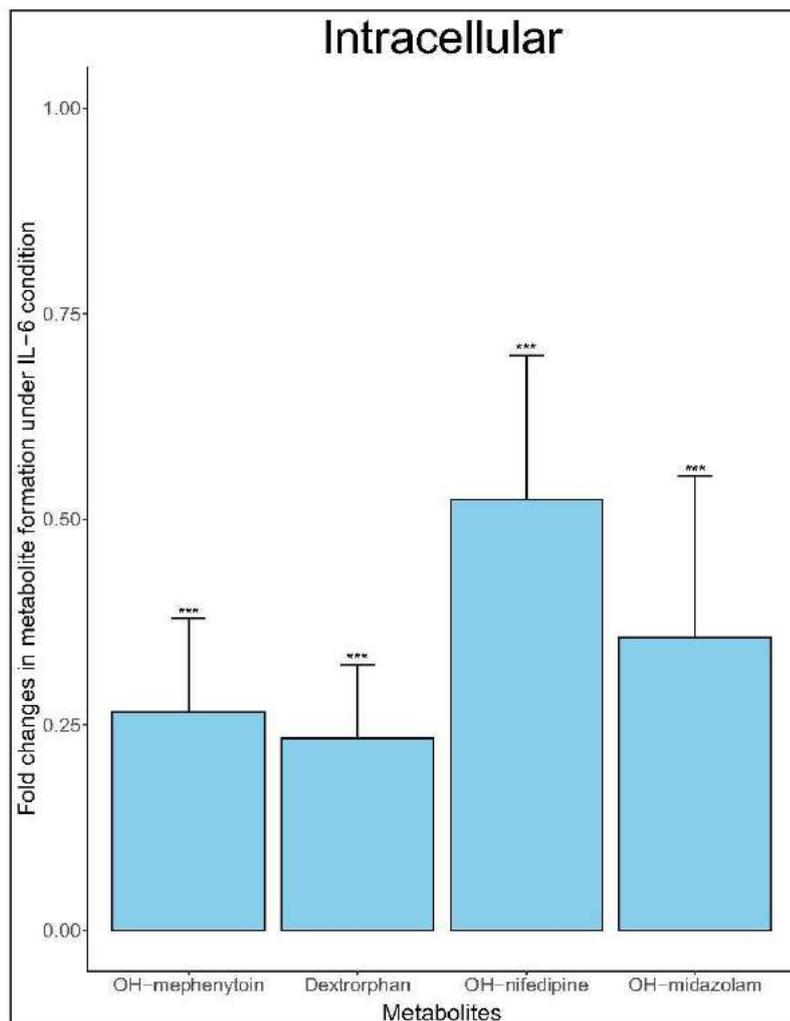
	Tneg		5 ng/mL			10 ng/mL			20 ng/mL		
	Mean	SD	Mean	SD	FC	Mean	SD	FC	Mean	SD	FC
<b>Acute phase response</b>											
CRP	0.0058	0.0082	0.041	0.025	6.97	0.043	0.022	7.42	0.048	0.047	8.2
SAA1	0.40	0.14	1.34	0.12	3.40	2.76**	0.33	6.98	2.79**	0.09	7.04
SAA2	0.05	0.039	0.31	0.006	6.38	0.61**	0.12	12.5	0.54**	0.02	11.1
SOCS3	3.04	0.17	8.77	0.67	2.88	12.1*	0.82	3.98	16.4**	1.09	5.37
<b>Phase I enzymes</b>											
ALDH1A1	41.9	2.55	35.6	1.84	0.85	36.1	2.94	0.86	38.4	2.40	0.92
ALDH2	37.4	1.24	34.9*	0.83	0.93	35.5	1.09	0.95	35.5	1.37	0.95
CES2	23.3	3.40	19.7	0.81	0.85	17.8**	1.11	0.76	18.5	1.55	0.79
CYP2C19	12.1	0.78	8.41	1.32	0.69	6.96**	0.56	0.57	6.63**	0.71	0.55
CYP2C9	8.95	0.13	6.17	0.55	0.69	5.67**	0.13	0.63	5.21	0.35	0.58
CYP2D6	1.88	0.21	2.22	0.20	1.19	2.38	0.12	1.27	1.91	0.43	1.02
CYP3A4	24.7	5.06	16.7	2.68	0.68	11.5**	0.37	0.47	11.1**	1.21	0.45
CYP3A5	12.2	0.23	10.9	1.13	0.89	10.0	0.19	0.82	9.84	0.52	0.81
FMO4	4.17	0.10	4.18	0.31	1.00	4.01	0.33	0.96	4.41	0.07	1.06
FMO5	3.61	0.46	3.73	0.17	1.03	3.75	0.02	1.04	3.67	0.16	1.02
MAOA	7.53	0.96	5.35	0.48	0.71	4.86**	0.12	0.65	4.87*	0.21	0.65
MAOB	12.2	1.35	8.59	0.63	0.70	6.85**	0.44	0.56	7.12**	0.26	0.58
<b>Phase II enzymes</b>											
GSTP1	282	27.0	238	11.7	0.84	223*	11.6	0.79	211**	13.9	0.75
NAT1	1.87	0.33	1.71	0.21	0.91	1.69	0.18	0.90	1.62	0.05	0.87
NAT2	3.44	0.14	3.09	0.12	0.90	2.91**	0.09	0.85	2.79*	0.27	0.81
SULT1A1	3.92	0.07	3.99	0.21	1.02	3.94	0.25	1.01	3.57	0.40	0.91
SULT1A3	47.9	2.46	43.4	1.72	0.91	42.4*	2.21	0.88	43.0	4.59	0.90
SULT1B1	2.50	0.20	3.46	0.16	1.38	3.72	0.19	1.49	4.52**	0.42	1.81
TPMT	9.68	0.18	10.1	0.18	1.05	10.7	0.68	1.10	11.8**	1.60	1.21
UGT1A1	7.72	1.48	6.49	0.40	0.84	5.41**	0.47	0.70	6.22	0.66	0.81
UGT1A10	12.8	1.92	10.8	0.70	0.85	9.27*	0.79	0.72	10.9	1.26	0.85
UGT2B7	1.76	0.27	1.04**	0.13	0.59	1.12	0.13	0.64	1.34	0.19	0.76
<b>Transporters</b>											
ABCB1	1.97	0.27	1.79	0.08	0.91	1.67	0.06	0.85	1.85	0.10	0.94
ABCC1	4.30	0.25	5.05*	0.08	1.17	5.05**	0.15	1.18	4.98	0.17	1.16
ABCC2	54.0	3.12	44.7	3.69	0.83	39.1**	0.83	0.72	37.7**	1.43	0.70
ABCC3	18.0	0.86	17.5	1.44	0.97	17.2	0.69	0.96	16.8	2.11	0.93
ABCC4	3.65	0.38	4.12	0.23	1.13	4.54*	0.12	1.24	4.49*	0.25	1.23
ABCC5	1.95	0.30	2.26	0.03	1.16	2.46**	0.07	1.26	2.33	0.07	1.20
ABCG2	3.26	0.29	2.92	0.03	0.90	2.71*	0.04	0.83	2.50*	0.30	0.77
SLCO1A2	4.22	0.28	4.17	0.09	0.99	4.11	0.07	0.97	3.98	0.27	0.94
SLCO2B1	85.4	0.86	84.3	4.67	0.99	82.6	0.63	0.97	80.8	5.17	0.95
<b>Nuclear factors</b>											
AHR	8.17	0.79	8.62	0.11	1.06	9.64	0.69	1.18	10.1*	1.07	1.23
CEBPB	27.1	3.97	27.0	1.54	1.00	31.6	1.88	1.16	28.9	1.31	1.07
HNF4A	123	0.66	114*	2.46	0.93	112*	5.93	0.90	111	9.61	0.90
NR1H3	11.2	0.33	10.2*	0.36	0.91	10.4	0.57	0.93	10.1	0.97	0.90
NR1H4	4.71	0.33	5.79	0.08	1.23	5.82	0.60	1.24	6.11**	0.08	1.30
NR1I2	2.35	0.17	2.48	0.13	1.06	2.40	0.25	1.02	2.22	0.20	0.95
NR1I3	5.75	0.58	5.09	0.14	0.88	4.63**	0.26	0.81	4.74*	0.23	0.82
RXRA	11.2	0.60	11.0	0.23	0.99	10.3	0.31	0.93	10.5	0.56	0.94
VDR	4.26	0.11	3.68	0.18	0.86	3.16*	0.41	0.74	3.03**	0.44	0.71
<b>Proteins</b>											
CTSB	174	35	156	22	0.90	127*	2.8	0.73	131	2.6	0.76
CTSD	163	11	147	2.7	0.91	132**	2.2	0.81	134*	12	0.83
CTSL	12	0.59	13.0	1.1	1.06	13.1	0.85	1.07	13.1	0.49	1.07
CTSS	1.87	0.06	2.54	0.26	1.36	2.73**	0.15	1.46	2.88*	0.50	1.54
FCGRT	59.2	2.0	50.8	1.2	0.86	48.3**	0.49	0.82	46.7**	3.6	0.79

Data are expressed as the mean RPKM  $\pm$  SEM of 3 independent intestinal tissues and the associated Fold Change (FC) for treated conditions. Dunn's test was performed; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. FC = Fold change

**Table IV.** The effect of exposure duration on mRNA expression of inflammatory response proteins, phase I enzymes, phase II enzymes, drug transporters, nuclear receptors and biologics elimination mediators in EpiIntestinal cells exposed to IL-6. Cells were treated with 10 ng/mL IL-6 for 8, 24, 48 or 72 h. The mRNA expression of the indicated genes was determined using RNA sequencing.

	Tneg		8h			24h			48h			72h		
	Mean	SD	Mean	SD	FC	Mean	SD	FC	Mean	SD	FC	Mean	SD	FC
<b>Acute phase response</b>														
CRP	0.000	0.00	0.015	0.00	-	0.040**	0.02	-	0.028	0.01	-	0.043**	0.02	-
SAA1	0.12	0.08	1.02	0.30	8.70	2.49**	0.46	21.3	2.45*	0.36	20.9	2.76**	0.33	23.6
SAA2	0.02	0.01	0.24	0.04	11.9	0.63**	0.13	31.8	0.49*	0.12	24.9	0.61**	0.12	30.7
SOCS3	3.03	0.27	13.8	1.2	4.54	14.1	2.2	4.63	12.6	0.43	4.15	12.1	0.82	3.99
<b>Phase I enzymes</b>														
ALDH1A1	33.2	2.2	38.8	1.3	1.17	34.2	7.2	1.03	35.6	2.5	1.07	36.1	2.9	1.09
ALDH2	32.1	0.4	37.8**	1.4	1.18	36.5**	1.7	1.14	34.3	1.1	1.07	35.5	1.1	1.11
CES2	17.7	0.7	22.0**	0.58	1.25	22.3*	2.8	1.26	19.5	0.93	1.11	17.8	1.1	1.01
CYP2C19	13.1	0.3	12.1	1.6	0.92	8.22*	2.6	0.63	8.81	1.1	0.67	6.96**	0.56	0.53
CYP2C9	8.84	0.4	10.54	0.31	1.19	8.06	1.78	0.91	6.70	0.62	0.76	5.67	0.13	0.64
CYP2D6	2.87	0.2	2.27	0.34	0.79	2.48	0.38	0.86	2.67	0.25	0.93	2.38	0.12	0.83
CYP3A4	23.5	2.3	27.1	3.3	1.15	14.8	2.3	0.63	15.0	1.2	0.64	11.5**	0.37	0.49
CYP3A5	12.4	0.1	14.9	0.43	1.20	12.4	0.78	1.00	11.2	0.49	0.91	10.0*	0.19	0.81
FMO4	4.56	0.2	4.52	0.26	0.99	3.95*	0.22	0.87	4.35	0.45	0.95	4.01	0.33	0.88
FMO5	3.73	0.1	3.51	0.13	0.94	3.29	0.60	0.88	4.07	0.14	1.09	3.75	0.02	1.01
MAOA	5.99	0.3	6.69	0.49	1.12	5.12	0.84	0.85	4.89	0.68	0.82	4.86	0.12	0.81
MAOB	8.83	0.4	11.7	0.29	1.33	8.59	1.5	0.97	7.61	1.1	0.86	6.85	0.44	0.78
<b>Phase II enzymes</b>														
GSTP1	225	6.34	258	20	1.14	268	46	1.19	218	17	0.97	223	12	0.99
NAT1	1.63	0.24	1.74	0.13	1.07	1.83	0.10	1.12	1.60	0.16	0.98	1.69	0.18	1.03
NAT2	2.62	0.23	3.49*	0.15	1.33	3.13	0.75	1.19	3.13	0.36	1.19	2.91	0.09	1.11
SULT1A1	4.62	0.18	4.29	0.09	0.93	4.60	0.65	1.00	4.40	0.49	0.95	3.94*	0.25	0.85
SULT1A3	40.2	0.97	51.0*	2.6	1.27	53.5	12	1.33	46.5	3.0	1.16	42.4	2.2	1.05
SULT1B1	2.50	0.15	3.51	0.26	1.41	3.11	0.95	1.25	4.25***	0.53	1.70	3.72	0.19	1.49
TPMT	9.0	0.47	12.6**	0.73	1.40	11.8*	1.5	1.32	11.4	0.38	1.26	10.7	0.68	1.19
UGT1A1	5.60	0.13	8.60**	0.49	1.54	6.35	1.2	1.13	6.36	0.32	1.14	5.41	0.47	0.97
UGT1A10	9.43	0.48	15.1**	1.2	1.60	11.6	2.6	1.23	10.8	0.51	1.15	9.27	0.79	0.98
UGT2B7	1.64	0.12	2.01	0.06	1.22	1.76	0.30	1.07	1.21	0.16	0.74	1.12	0.13	0.68
<b>Transporters</b>														
ABCB1	1.78	0.14	2.08	0.15	1.17	1.53	0.31	0.86	1.83	0.10	1.03	1.67	0.06	0.94
ABCC1	4.52	0.09	4.10	0.03	0.91	4.11	1.1	0.91	4.49	0.11	0.99	5.05	0.15	1.12
ABCC2	55.7	1.56	49.1**	5.16	0.88	35.5	7.6	0.64	42.0**	0.71	0.75	39.1	0.83	0.70
ABCC3	19.3	0.45	19.1	0.39	0.99	19.1	2.4	0.99	19.1	1.24	0.99	17.2	0.69	0.89
ABCC4	3.71	0.15	3.94	0.14	1.06	3.63	0.74	0.98	4.15	0.14	1.12	4.54**	0.12	1.22
ABCC5	2.89	0.19	1.99**	0.10	0.69	2.19*	0.50	0.76	2.65	0.11	0.92	2.46	0.07	0.85
ABCG2	3.14	0.16	2.95	0.00	0.94	2.42*	0.41	0.77	2.88	0.23	0.92	2.71*	0.04	0.86
SLCO1A2	4.81	0.04	5.28	0.38	1.10	3.92*	0.61	0.81	4.28	0.38	0.89	4.11	0.07	0.85
SLCO2B1	82.9	1.6	85.0	3.5	1.03	78.1	11	0.94	87.1	1.4	1.05	82.6	0.63	1.00
<b>Nuclear factor</b>														
AHR	8.37	0.47	9.12	0.69	1.09	8.32	1.94	0.99	8.67	0.11	1.04	9.64	0.69	1.15
CEBPB	27.4	2.0	29.1	1.5	1.06	31.9	2.4	1.16	31.7	3.2	1.16	31.6	1.9	1.15
HNF4A	105	5.0	118*	3.3	1.12	108	7.6	1.02	110	3.6	1.04	112	5.9	1.06
NR1H3	10.8	0.54	11.5	0.37	1.07	12.5	1.8	1.16	10.8	0.84	1.01	10.4	0.57	0.97
NR1H4	4.39	0.43	6.83**	0.09	1.56	6.80*	1.4	1.55	6.38	0.26	1.45	5.82	0.60	1.33
NR1I2	2.78	0.03	2.66	0.13	0.96	2.39	0.27	0.86	2.73	0.20	0.98	2.40	0.25	0.86
NR1I3	5.45	0.29	5.47	0.14	1.00	5.34	0.96	0.98	5.05	0.30	0.93	4.63	0.26	0.85
RXRA	10.4	0.16	9.66	0.31	0.93	9.42	0.75	0.91	10.6	0.48	1.02	10.3	0.31	1.00
VDR	3.42	0.21	3.99	0.17	1.17	3.32	0.32	0.97	3.13	0.29	0.92	3.16	0.41	0.92
<b>Proteins</b>														
CTSB	134	0.48	176	14	1.32	154	18	1.15	140	7	1.05	127	3	0.95
CTSD	124	1.5	148**	3.3	1.19	150**	15.9	1.21	135	4.0	1.08	132	2.2	1.06
CTSL	12.3	0.55	13.0	0.94	1.05	13.7	1.8	1.11	12.8	0.73	1.04	13.1	0.85	1.07
CTSS	1.78	0.09	2.24	0.13	1.26	2.65	0.62	1.49	2.90**	0.13	1.63	2.73**	0.15	1.54
FCGRT	53.2	1.6	60.8	3.2	1.14	60.1	9.7	1.13	50.8	4.7	0.95	48.3	0.49	0.91

Data are expressed as the mean RPKM  $\pm$  SEM of 3 independent intestinal tissues and the associated Fold Change (FC) for treated conditions. Dunn's test was performed; \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. FC = Fold change.



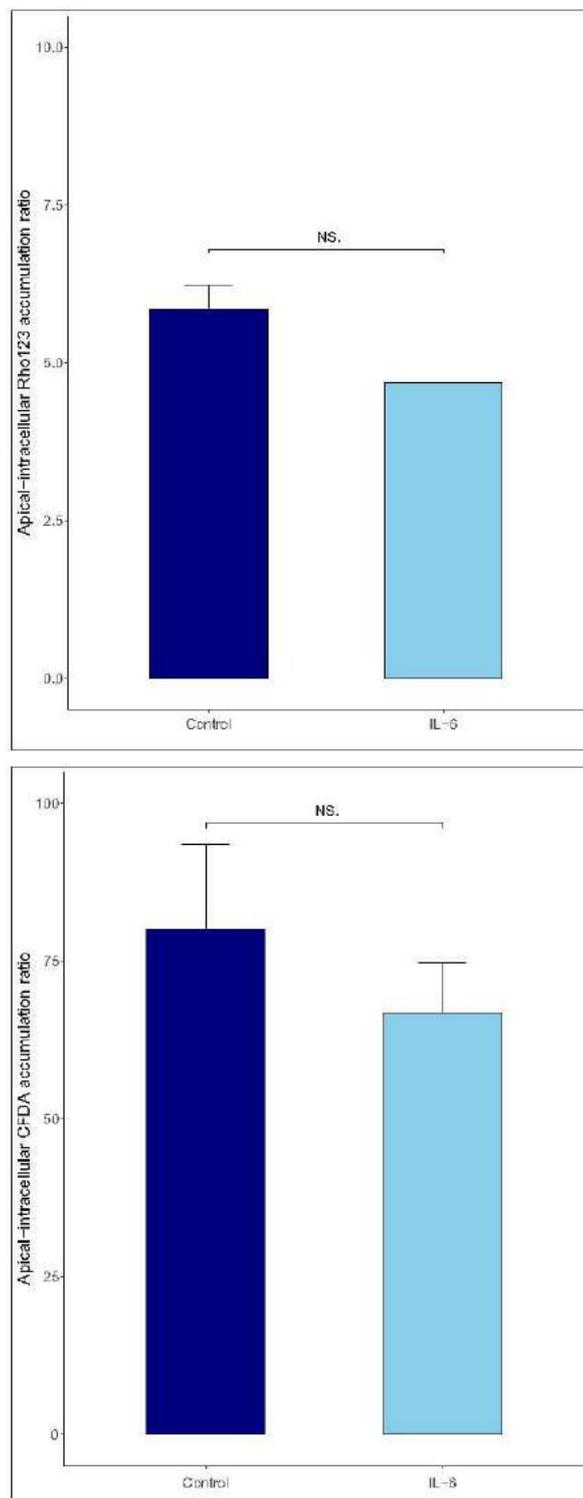
**Fig. 1.** Relative activity of three CYPs P450 in EpiIntestinal cells in the presence of 20 ng/mL IL-6 for 72 h. Formation of OH-mephenytoin (CYP2C19), dextrorphan (CYP2D6), OH-nifedipine (CYP3A4) and OH-midazolam (CYP3A4) in intracellular compartment were determined by LC-HRMS and normalized to 100  $\mu$ g of protein. Metabolites formation was measured in six controls and six IL-6 exposed independent intestinal tissues. Results are expressed as the mean of 1000 simulated ratios  $\pm$  SD. Student-test was performed; \*\*\*P < 0.001

There were no changes in the expression of nuclear receptors, except for FXR, which is involved in the metabolism and transport of biliary acids, as well as enzymes and transporters for drugs (e. g., SLCO1B3 and SLC10A1) (20). These experimental results show a decrease of intestinal metabolism but no differences in efflux transport into the lumen. Combined with the effect on hepatic metabolism and transport shown previously, this could decrease the first pass effect and increase the bioavailability of drugs taken orally. Hence, higher drug concentrations may reach the systemic circulation and lead to overdose and potential toxicities.

Inflammation increases the plasma concentration of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AAG) (21). Hepatic AAG mRNAs are twofold higher in patients with CRP > 10 mg/L than in patients with CRP < 1 mg/L (11). This can result in an

increase of protein binding and reduce the drug-unbound fraction, thereby modifying drug clearance (21).

A study showed the rate of whole-body protein turnover is greater in a population with cancer than in a control population, and this turnover is 20% higher for patients with acute phase response than for those without (22). Moreover, cathepsin-D, the main protease involved in IgG degradation (23,24), is upregulated by > 70% in a population with acute phase response (CRP > 10 mg/L) (11). In EpiIntestinal cells, cathepsin-S mRNA was increased by about 50% after stimulation with 10 ng/mL IL-6, but expression of this protease is low in intestinal tissue. Nevertheless, the gut is one of the major organs for elimination of mAbs, due to its mass (25). By increasing expression of these proteases, inflammation may increase mAb clearance and result in pharmacokinetic modifications.



**Fig. 2.** Apical-intracellular accumulation ratios of Rho 123 and CFDA in EpiIntestinal cells treated with or without IL-6 (20 ng/mL) for 72 h. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of the ratio in 2 independent intestinal tissues. Data from each intracellular compartment are normalized to 100  $\mu$ g of protein

However, another factor must be considered. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds IgG at mildly acidic pH in the endosome, and then transcytoses this IgG and releases it at a slightly basic extracellular pH. This recycling process avoids IgG degradation in lysosomes and contributes to its long half-life (26). It is a key factor of mAb pharmacokinetics, notably affecting clearance. Several studies have already shown the correlation between FcRn affinity and the half-life of mAbs (27). FcRn was not de-regulated in EpiIntestinal cells; however, it has been induced in Caco2 and macrophage-like cell lines stimulated by TNF $\alpha$  (28). TNF $\alpha$  also enhances IgG transport across a Caco2 cell monolayer (28). Therefore, an inflammation-induced increase of FcRn may decrease mAb clearance. The global impact of inflammation on mAb clearance may vary, depending on the contribution of other clearance pathways such as target-mediated clearance.

All of the protein and enzyme modifications discussed previously may result in alterations of drug pharmacokinetics, with clinical effects. Variations are rather minor in intestine comparing to those observed in the liver. Among the intestinal changes, the main one potentially affecting pharmacokinetics is CYP3A4 repression. In order to predict the impact of inflammation and to adapt drug dosage according to the level of inflammatory response, a physiologically based pharmacokinetic model may be useful. A first, model has already been built for a patient population with rheumatoid arthritis (29).

## CONCLUSION

This study shows that genes expression level and activity of drug-metabolizing enzymes may be altered by the pro-inflammatory cytokine IL-6 in intestinal cells. This may result in drug pharmacokinetics modification with clinical effects, and require dosage adaptation.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Participated in research design: Payen, Tod, Chenel  
 Conducted experiments: Simon, Garcia, Guyot, Guitton  
 Performed data analysis: Simon, Vilchez, Bardel  
 Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Simon, Tod, Payen, Chenel

## FUNDING INFORMATION

This work was supported by Institut de Recherches Internationales Servier.

## REFERENCES

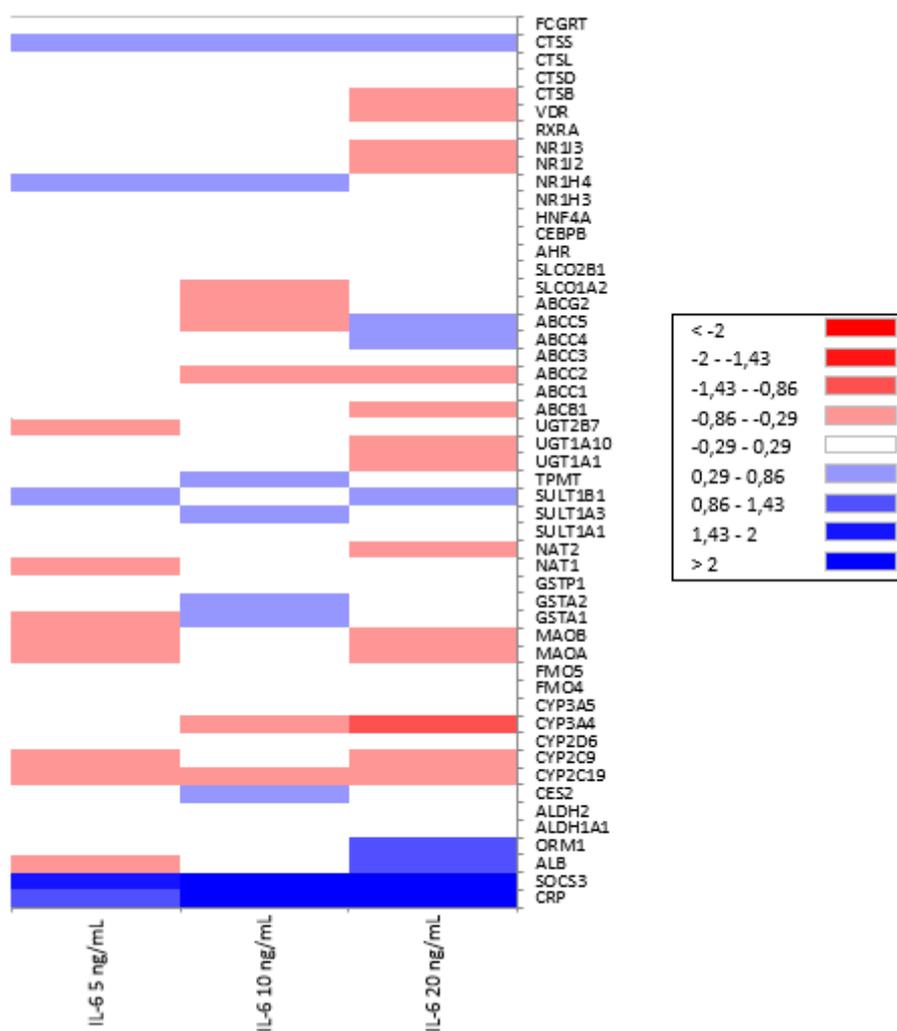
1. Klein M, Thomas M, Hofmann U, Seehofer D, Damm G, Zanger UM. A systematic comparison of the impact of inflammatory signaling on absorption, distribution, metabolism, and excretion gene expression and activity in primary human hepatocytes and hepaRG cells. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;43(2):273–83.
2. Dickmann LJ, Patel SK, Rock DA, Wienkers LC, Slatter JG. Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(8):1415–22.

3. Rubin K, Janefeldt A, Andersson L, Berke Z, Grime K, Andersson TB. HepaRG cells as human-relevant in vitro model to study the effects of inflammatory stimuli on cytochrome P450 isoenzymes. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(1):119–25.
4. Sukhai M, Yong A, Pak A, Piquette-Miller M. Decreased expression of P-glycoprotein in interleukin-1beta and interleukin-6 treated rat hepatocytes. *Inflamm Res.* 2001;50(7):362–70.
5. Bodeman CE, Dzierlenga AL, Tally CM, Mulligan RM, Lake AD, Cherrington NJ, et al. Differential regulation of hepatic organic cation transporter 1, organic anion-transporting polypeptide 1a4, bile-salt export pump, and multidrug resistance-associated protein 2 transporter expression in lymphocyte-deficient mice associates with interleukin-6 production. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;347(1):136–44.
6. Le Vee M, Lecqueur V, Stieger B, Fardel O. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(3):685–93.
7. Williams SJ, Baird-Lambert JA, Farrell GC. Inhibition of theophylline metabolism by interferon. *Lancet.* 1987;2(8565):939–41.
8. Lee EB, Daskalakis N, Xu C, Paccaly A, Miller B, Fleischmann R, et al. Disease-drug interaction of sarilumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56(6):607–15.
9. Schmitt C, Kuhn B, Zhang X, Kivitz AJ, Grange S. Disease-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(5):735–40.
10. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(5):541–7.
11. Klein M. Role of inflammatory cytokine signaling in the regulation of detoxifying functions in human hepatocytes and liver. Stuttgart: Stuttgart University; 2014.
12. Fernandez C, Buyse M, German-Fattal M, Gimenez F. Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J Pharm Pharm Sci.* 2004;7(3):359–71.
13. Pindakova L, Kasparikova V, Kejlava K, Dvorakova M, Krsek D, Jirova D, et al. Behaviour of silver nanoparticles in simulated saliva and gastrointestinal fluids. *Int J Pharm.* 2017;527(1–2):12–20.
14. Feidt DM, Klein K, Hofmann U, Riedmaier S, Knobloch D, Thasler WE, et al. Profiling induction of cytochrome p450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(9):1589–97.
15. Pozniak B, Pawlak A, Obminska-Mrukowicz B. Flow cytometric assessment of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein activity and expression in canine lymphoma. *In Vivo.* 2015;29(1):149–53.
16. Martin F, Santolaria F, Batista N, Milena A, Gonzalez-Reimers E, Brito MJ, et al. Cytokine levels (IL-6 and IFN-gamma), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer. *Cytokine.* 1999;11(1):80–6.
17. Zhong J, Cui Y, Guo J, Chen Z, Yang L, He QY, et al. Resolving chromosome-centric human proteome with translating mRNA analysis: a strategic demonstration. *J Proteome Res.* 2014;13(1):50–9.
18. Prueksaritanont T, Chu X, Gibson C, Cui D, Yee KL, Ballard J, et al. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. *AAPS J.* 2013;15(3):629–45.
19. Febvre-James M, Bruyere A, Le Vee M, Fardel O. The JAK1/2 Inhibitor ruxolitinib reverses interleukin-6-mediated suppression of drug-detoxifying proteins in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(2):131–40.
20. Xie W. Nuclear receptors in drug metabolism. Hoboken: John Wiley & Sons; 2008.
21. Mayo PR, Skeith K, Russell AS, Jamali F. Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50(6):605–13.
22. Fearon KC, Hansell DT, Preston T, Plumb JA, Davies J, Shapiro D, et al. Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer. *Cancer Res.* 1988;48(9):2590–5.
23. Fehr K, LoSpalluto J, Ziff M. Degradation of immunoglobulin G by lysosomal acid proteases. *J Immunol.* 1970;105(4):973–83.
24. Stefanovic J, Ferencik M. The inhibitory effect of homologous immunoglobulin G on the degradation of antigen (human serum albumin) by rabbit cathepsin D. *Folia Microbiol (Praha).* 1969;14(6):571–7.
25. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2017;6(9):576–88.
26. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):715–25.
27. Yeung YA, Leabman MK, Marvin JS, Qiu J, Adams CW, Lien S, et al. Engineering human IgG1 affinity to human neonatal Fc receptor: impact of affinity improvement on pharmacokinetics in primates. *J Immunol.* 2009;182(12):7663–71.
28. Liu X, Ye L, Christianson GJ, Yang JQ, Roopenian DC, Zhu X. NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences. *J Immunol.* 2007;179(5):2999–3011.
29. Jiang X, Zhuang Y, Xu Z, Wang W, Zhou H. Development of a physiologically based pharmacokinetic model to predict disease-mediated therapeutic protein-drug interactions: modulation of multiple cytochrome P450 enzymes by interleukin-6. *AAPS J.* 2016;18(3):767–76.

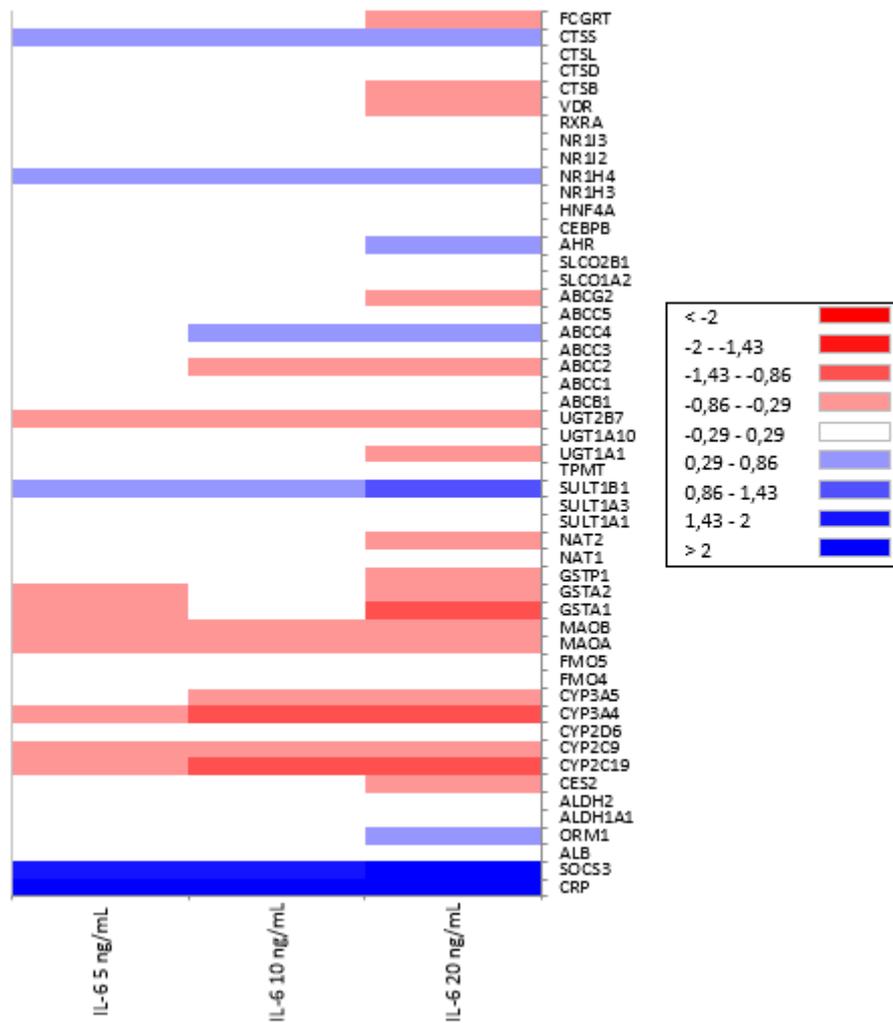
## Impact of interleukin-6 on drug-metabolizing enzymes and transporters in intestinal cells

Florian Simon, Jessica Garcia, Laetitia Guyot, Jérôme Guitton, Gaele Vilchez, Claire Bardel, Marylore Chenel, Michel Tod, and Léa Payen

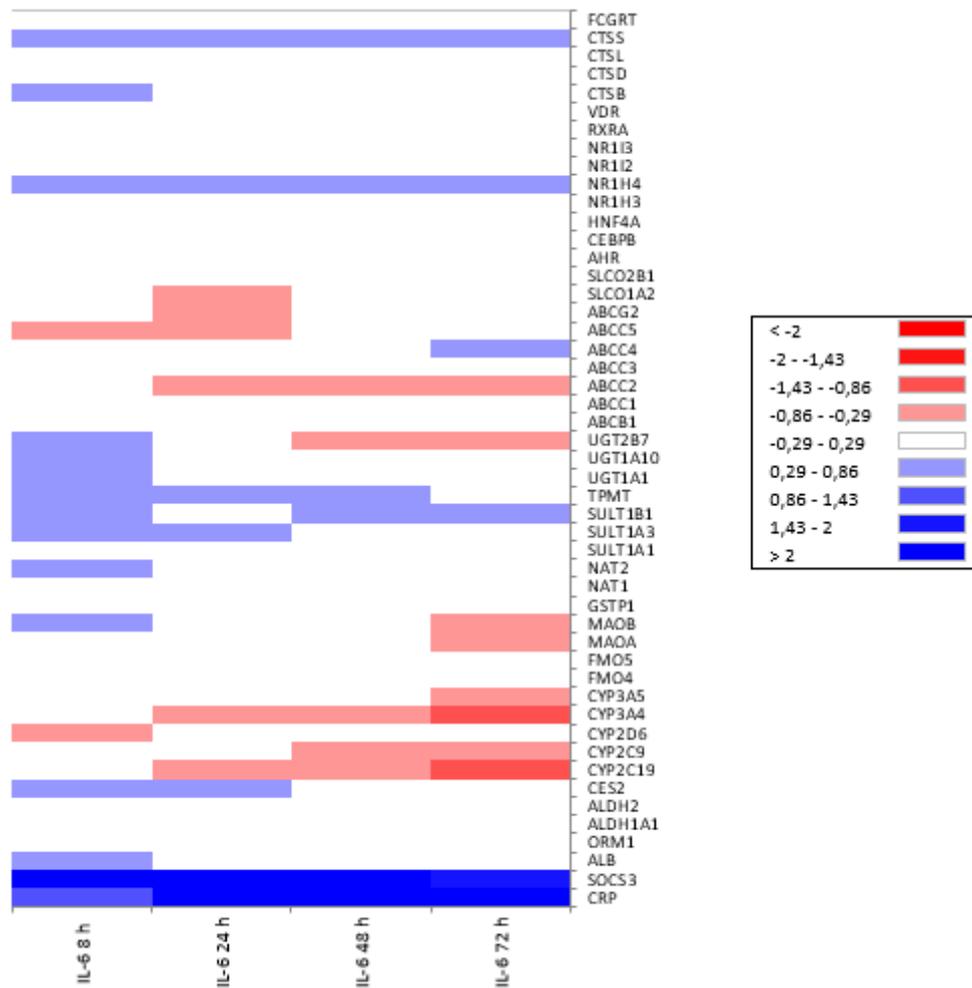
### Supplemental data



Supplementary figure 25 - Effect of IL-6 concentration on relative mRNA expression changes of inflammatory response proteins, phase I enzymes, phase II enzymes, drug-transporters, nuclear receptors and biologics elimination mediators in IL-6 exposed EpiIntestinal. Cells were treated with 5, 10, 20 ng/mL IL-6 for 24h. The mRNA expression of the indicated genes was determined using RNAsequencing. Data are expressed in mean Log<sub>2</sub>FC of 3 independent tissues.



Supplementary figure 26- Effect of IL-6 concentration on relative mRNA expression changes of inflammatory response proteins, phase I enzymes, phase II enzymes, drug-transporters, nuclear receptors and biologics elimination mediators in IL-6 exposed EpiIntestinal. Cells were treated with 5, 10, 20 ng/mL IL-6 for 72h. The mRNA expression of the indicated genes was determined using RNAsequencing. Data are expressed in mean Log<sub>2</sub>FC of 3 independent tissues.



Supplementary figure 27 - Effect of exposure duration on relative mRNA expression changes of inflammatory response proteins, phase I enzymes, phase II enzymes, drug transporters, nuclear receptors and biologics elimination mediators in IL-6 exposed EpiIntestinal. Cells were treated with 10 ng/mL IL-6 for 8, 24, 48 or 72 h. The mRNA expression of the indicated genes was determined using RNA sequencing. Data are expressed in mean Log<sub>2</sub>FC of 3 independent intestinal tissues

### Chapitre 3 : Impact de l'interleukine-6 sur la barrière hémato-encéphalique

## Résumé :

L'article 1 présentait l'impact de l'IL-6 sur la barrière intestinale et montrait que la biodisponibilité pouvait augmenter *via* une baisse du métabolisme. Dans ce second travail nous nous sommes intéressés à son impact sur la BHE.

Il est établi que dans le cadre de pathologies inflammatoires systémiques ou du système nerveux central, la BHE peut être altérée et sa perméabilité augmentée. Quelques travaux *in vitro* sur des lignées cellulaires ont étudié l'effet de différentes cytokines en ciblant des transporteurs ou des jonctions cellulaires. Dans un premier temps, nous avons exploré les différentes régulations mises en jeu au niveau génomique grâce au séquençage d'ARNm permettant ainsi d'étudier l'intégralité du transcriptome, après une exposition à l'IL-6. La concentration et la durée d'exposition utilisées correspondent aux conditions ayant montré le plus d'effet sur les tissus intestinaux lors de nos travaux de l'article 1, c'est-à-dire 20 ng/mL durant 72h. Ici encore l'approche était qualitative afin d'observer quelles régulations étaient mises en jeu en cas inflammation chronique avec un niveau élevé pour être sûr d'observer un effet. L'étude de l'impact de l'IL-6 sur les transporteurs ABC a été approfondie avec des tests fonctionnels par spectrophotométrie avec substrats et inhibiteurs spécifiques. Ces travaux ont mis évidence un impact relativement faible de l'IL-6 sur l'expression et l'activité des transporteurs ABC. En revanche, de nombreux gènes impliqués dans les jonctions cellulaires et le complexe d'adhésion focale ont été dérégulés, pouvant modifier le contact entre les cellules et donc l'intégrité de la barrière.

Nous avons ensuite effectué une extrapolation *in vitro in vivo* (IVIVE) de l'effet de l'IL-6 sur ABCB1 afin de réaliser des simulations PBPK. Ces simulations étaient réalisées en utilisant un modèle de la littérature déjà développé à partir de données cliniques plasmatiques. Nous avons ensuite simulé les profils cinétiques de digoxine dans le plasma et dans le cerveau avec ou sans effet de l'IL-6 sur ABCB1 cérébrale. Les résultats de ces simulations montrent très peu de différence sur les profils et paramètres PK de la digoxine. Cependant, cette démarche faisait l'objet de différentes hypothèses et notamment d'une absence d'effet de l'inflammation sur la diffusion passive ainsi que l'absence de prise en charge de la digoxine par d'autres transporteurs.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Fundamental & Clinical Pharmacology Journal*.

MR. FLORIAN SIMON (Orcid ID : 0000-0002-3731-3014)

Article type : Original Article

## Impact of interleukin-6 on drug transporters and permeability in the hCMEC/D3 blood–brain barrier model

Running title: Impact of interleukin-6 on blood-brain barrier

Florian Simon <sup>a,b,c,\*</sup>, Laetitia Guyot <sup>b</sup>, Jessica Garcia <sup>b</sup>, Gaele Vilchez <sup>c</sup>, Claire Bardel <sup>c</sup>,  
Marylore Chenel <sup>d</sup>, Michel Tod <sup>a</sup>, Léa Payen <sup>b</sup>

<sup>a</sup> : EA3738, Faculté de médecine de Lyon-Sud, Université de Lyon 1, Oullins (France)

<sup>b</sup> : Laboratoire de biochimie-toxicologie, Centre hospitalier Lyon-Sud, Hospices civils de Lyon, Pierre Bénite (France);

<sup>c</sup> : Hospices Civils de Lyon, Department of biostatistics, Lyon, France;

<sup>d</sup> : Institut de recherches internationales Servier, Direction of clinical PK and pharmacometrics, Suresnes, France

\*Corresponding author information

F. SIMON, address: 165 chemin du Grand Revoyet, Faculté de médecine et maïeutique, 69921 Oullins cedex, Université de Lyon 1, tel: 0426235953, fax: 0426235976, e-mail: fsimon.p5@gmail.com

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/FCP.12596](https://doi.org/10.1111/FCP.12596)

This article is protected by copyright. All rights reserved

## ABSTRACT

The blood–brain barrier (BBB) is a highly selective membrane composed predominantly of brain capillary endothelial cells expressing drug efflux transporters that prevent substrates from accessing the brain. Inflammation is associated with central nervous system diseases and can impair BBB permeability via several mechanisms, including altered transporter and cell junction expression. This can modify the brain's exposure to drugs. However, comprehensive genomic analysis of the impact of interleukin (IL)-6, which plays a key role in the inflammatory response, on the BBB is lacking. In the present study, we analyzed the effects of exposure of hCMEC/D3 cells to 20 ng/mL IL-6 for 72 h. We performed RNA sequencing and ABC-transporter efflux assays. Physiologically based pharmacokinetics (PBPK) simulations were conducted to evaluate the potential impact of IL-6 on the digoxin pharmacokinetics profile and brain exposure by decreasing BBB ABCB1 efflux activity. Exposure of hCMEC/D3 cells to IL-6 triggered the deregulation of numerous genes involved in barrier permeability, such as cell junctions, focal adherens complex, and cell adhesion molecules. We observed mild modification of the mRNA expression and efflux activities of ABC transporters. PBPK simulation showed that, if we only consider the impact of IL-6 on ABCB1-transporter, the modification of the digoxin pharmacokinetics profile and brain exposure is slight. IL-6 slightly affected the gene expression levels and activities of ABC transporters on BBB cells, exhibiting a weaker effect than on hepatic cells. However, inflammation may cause other modifications, such as altered BBB permeability, that could modify drug pharmacokinetics.

**Key words:** Interleukin-6 – blood brain barrier – RNA sequencing – ABC transporter - PBPK

## INTRODUCTION

Many drugs exert pharmacological effects in the brain, which can result in either therapeutic actions or adverse events. Thus, predicting the drug concentration profile and variability in the brain is important for drug development. Drug penetration in the brain is restricted by the blood–brain barrier (BBB), a highly selective barrier comprised mainly of brain capillary endothelial cells. The BBB protects the brain from toxic compounds and xenobiotics. Diffusion of small hydrophilic molecules is limited due to tight and adherens junctions that prevent paracellular passage (1). In addition, many compounds are unable to penetrate the brain due to ATP-binding cassette (ABC) transporters (e.g., ABCB1, ABCG2, and various ABCCs), which are efflux transporters expressed at the luminal membrane of endothelial cells of the BBB (2).

In diseases associated with systemic or central nervous system (CNS) inflammation (3), the inflammatory response can impair the BBB (4). These BBB changes involve several mechanisms, including deregulation of transporter expression (5), which is mainly induced by increased systemic cytokine levels (6). Several studies conducted in various *in vitro* and *in vivo* models have tested the effects of several cytokines on the BBB (5, 7). The results have varied in terms of drug-transporter genes and protein expression levels, but the main trend observed has been decreased activity. Inflammation does not only alter drug transport; for example, transport of tryptophan (8) and insulin (9) across the BBB is reportedly enhanced after exposure to tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$  or lipopolysaccharide (LPS).

Interleukin (IL)-6 is one of the main cytokines involved in inflammatory responses (10), promoting important deregulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters in hepatocytes (11, 12). Its mechanism of action remains unclear but has been examined in hepatic cell lines. IL-6 binds to a two-dimer-forming receptor. One subunit is the IL-6 receptor, or glycoprotein (gp)-80, which exists as a transmembrane (IL-6R) or soluble form (sIL-6R) and binds with IL-6. The other subunit is the gp-130 activated by IL-6/IL-6R stimulation (13) and induces activation of various signaling pathways mediated by kinases (e.g., JAK/STAT, MAP/ERK, or PI3K/AKT) (14). Activated NF- $\kappa$ B can then bind directly to CYPs gene promoters, or bind to RXR and antagonize its ability to heterodimerize with other nuclear receptor (NR) promoters involved in drug metabolizing enzymes and drug transporters synthesis, such as CAR, PPAR, and PXR (14).

In our experiments, we used the well-differentiated human brain endothelial cell line hCMEC/D3. This is a promising *in vitro* model that exhibits BBB characteristics, including the expression of tight junctions, chemokine receptors, and main efflux transporters (2, 15), and seems to be well-adapted for transport studies.

The pharmacokinetics (PK) of drugs in blood and tissues can be predicted using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling with experimental data. PBPK models comprise compartments that correspond to the different physiological organs of the body linked by systemic circulation, with a defined volume and blood flow rate for each organ. This approach can account for drug-dependent parameters, such as drug-unbound fraction, tissue-to-plasma distribution coefficient ( $K_p$ ), and active processes involved in drug transport or metabolism (16). A growing number of PBPK models have been generated for drug development, with the main applications of predicting the first-in-human dose using preclinical knowledge, drug–drug interactions, and PK profiles in special populations (17). Several PBPK models describe the BBB penetration of drugs for efflux transporter substrates (18, 19). However, currently available models do not account for the impact of inflammation on BBB permeability.

In the present study, our objective was to quantify the effects of IL-6 on the expression of various genes involved in drug PK and transport across the BBB. We then focused on the impact on ABC transporter activities. Our results can be integrated into a global strategy for using a PBPK approach to predict the impact of inflammation on drug PK, including brain distribution.

## METHODS

### Chemicals and reagents

Recombinant human IL-6 was provided by PreproTech (Neuilly-sur-Seine, France). Penicillin-streptomycin 100X was purchased from Life Technologies (Villebon-sur-yvette, France). Endothelial basal medium (EBM-2) was obtained from Lonza (Basel, Switzerland), ascorbic acid from Sigma-Aldrich, and cultrex rat collagen I from Bio-techne (Lille, France). Chemically defined lipid, HEPES, and recombinant human FGF-basic (bFGF) were purchased from Life Technologies. Hydrocortisone hemisuccinate (Serb) was a kind gift from the Lyon-Sud hospital pharmacy. We purchased 5-carboxyfluorescein diacetate (CFDA), rhodamine 123 (Rho123), elacridar, MK-571 sodium salt hydrate, and dimethylsulfoxide (DMSO) from Sigma-Aldrich, and 3,4,5-trinitropyrazole (TNP) from Safran.

### Standard solutions

Substrates and inhibitors for the transport assay were dissolved in DMSO at concentrations of 1 mM (elacridar) and 3 mM (CFDA), in ethanol at 5.25 mM (Rho123), or in water at 6 mM (MK571). IL-6 was reconstituted in 1X PBS + BSA 0.1% and diluted to obtain 1 µg/mL stock standard solutions. TNP was dissolved in water at a concentration of 100 mM.

### Cell culture

We obtained hCMEC/D3 cells from Tebu-bio (Le Perray en Yvelines, France). Flasks and wells were pre-coated with rat collagen I solution (150 µg/mL) and incubated for 1 h at 37°C. Cells were cultured in EBM-2 supplemented with 5% FBS (heat-inactivated and pre-mixed with 5% DMSO), 1% penicillin-streptomycin, 1% chemically defined lipid concentrate, 5 µg/mL ascorbic acid, 1.4 µM hydrocortisone hemisuccinate, 10 mM HEPES, and 1 ng/mL bFGF. After 3 days, the medium was replaced with the same medium without bFGF to promote junction differentiation. Then cells were cultured for 72 h with or without 20 ng/mL IL-6. In a previous study (20), we conducted several experiments, including RNA sequencing, cytochrome P450, and ABC transporter activity tests, in the presence of different IL-6 concentrations (5, 10, and 20 ng/mL) for different exposure durations (8, 24, 48, and 72 h). We chose the concentration (20 ng/mL) and duration exposure (72 h) that maximized the effects in the intestinal model.

### Library construction and RNA sequencing

We cultured hCMEC/D3 cells for 72 h with or without 20 ng/mL IL-6 and then isolated total RNA using the Maxwell 16 LEV Simply RNA cell kit (#AS1270; Promega, Charbonnières les bains, France). RNA concentrations were measured using the Qubit® HS RNA Assay kit and the RNA sample integrity evaluated by the RNA 6000 Pico Kit running on a 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, Santa-Clara, California, US) following the manufacturer's instructions.

For mRNA sequencing, total RNA samples with an RIN score >9 were diluted to 20 ng/μL in a final volume of 50 μL, for a total input of 1 μg. First, mRNAs were isolated from total RNA using the NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB# E7490; New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, US), with oligo dT beads complementary to the mRNA polyA tails. Next, libraries were created from the isolated mRNA using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB#E7760S). The sequencing reads were obtained after demultiplexing the raw sequencing data using bcl2fastq v2.19.1.403 Version v2.15.0 for NextSeq™ 500 (Illumina). We validated the quality controls of each sample using FastQC v0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), and then alignment files generated using STAR v2.5.2b in the "2-pass" mode on the hg19 human genome. After obtaining the final sorted alignment file, the reads were counted using GFOLD V1.1.4 (option: count; <https://bitbucket.org/feeldead/gfold/>) and the GENCODE annotation file of the human genome (gencode.v19.annotation.gtf). Finally, we determined the differential expression levels of genes using the GFOLD-diff bioinformatics pipeline based on the mean values of three independent samples. Complete data are available at the Gene Expression Omnibus ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) under accession number GSE138309.

### Bioinformatics analysis

The RNA sequencing dataset, including the differential expression status of each identified gene in log<sub>2</sub> fold changes, was uploaded into Ingenuity pathway analysis (IPA; Qiagen, Ingenuity Systems, Redwood City, CA). The selected cut criteria were log<sub>2</sub> fold changes ≥2 or ≤-2 to retain only the largest deviations. We used the "Core Analysis" function included in IPA to interpret the data in the context of pathways. Pathways were tested using Fisher's exact test. Pathways could also be ordered according to the ratio of the number of genes in a given pathway that met the cut criteria to the total number of genes in that pathway. We also studied BBB-related gene families using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database. Differentially regulated genes (fold change ≥1.2 or ≤0.8) and ratios were computed for each family.

To obtain variability information on fold-changes between IL-6 and control conditions, we randomly sampled one RPKM under IL-6 condition and one control among the three replicates; we computed the ratio and repeated the operation 1000 times. The standard deviation (SD) of these ratios was then calculated.

### Quantitative RT-PCR

We cultured hCMEC/D3 cells for 72 h with or without 20 ng/mL IL-6. Total RNA was isolated from hCMEC/D3 cells using the Maxwell 16 LEV Simply RNA cell kit (#AS1270; Promega, Charbonnières les bains, France). Reverse transcription was carried using the Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (#K1642). The expression levels of ABCB1, ABCC1, and ABCG2 genes were quantified by PCR using the BIORAD CFX96 Touch™ (BIORAD, #1855195). The mRNA expression levels were normalized to those of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Relative gene expression changes were calculated using the delta delta Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) method in three independent experiments.

### Uptake assays

Uptake assays were performed to assess the functional activity of ABCB1 and ABCCs. We used Rho123 (5.25  $\mu$ M) as the ABCB1 substrate (21). We also used CFDA (3  $\mu$ M) because its metabolite carboxyfluorescein (CF) is a substrate for ABCCs (22). Elacridar and MK571 were used as ABCB1 and ABCCs inhibitors at 5.25  $\mu$ M and 100  $\mu$ M, respectively, to obtain the maximum inhibitory effect.

We cultured hCMEC/D3 cells with or without 20 ng/mL IL-6 for 72 h, or with 0.25 mM TNP (an ABCB1 inducer) for 48 h. The cells were washed three times with PBS and loaded with Rho123 or CFDA for 30 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For one-third of the cell cultures, the reaction was stopped just after loading. These cells were washed three times with PBS on ice, incubated with PBS-Triton 1% for 15 min at 37°C, and then intracellular substrate accumulation measured by spectrofluorimetry with Fluoroskan (excitation: 485 nm, emission: 538 nm). To the remaining cells, we added medium with or without inhibitor for 2 h. Afterwards, the supernatants were transferred and the substrate concentrations measured by spectrofluorimetry. The cells were washed three times with PBS and incubated with PBS-Triton 1% for 15 min at 37°C. The intracellular accumulation was then measured by spectrofluorimetry. In all intracellular samples, proteins were measured at 280 nm using the GE NanoVue spectrophotometer (Biochrom US,

Holliston, MA, US). Three samples were used for each experimental condition: load with substrate, exposure with medium, and exposure with inhibitor. The experiment was repeated three times independently for ABCB1, and twice for ABCCs.

### Development of a human whole-body PBPK model to predict IL-6 effect on digoxin brain exposure

We selected digoxin as an ABCB1 substrate (23) to study how a decrease of its activity impacts digoxin exposure in the brain and plasma. PBPK simulations were performed using the results from the Rho123 transport assay. For this extrapolation, we assumed the Rho123 and digoxin active influx and inflammatory effect on passive diffusion as negligible.

#### *In vitro-in vivo extrapolation of IL-6 effect on ABCB1*

The hCMEC/D3 system was considered as a two-compartment model with an intracellular (Eq. 1) and extracellular (Eq. 2) compartment that mimic brain tissue and the brain vascular system (Figure 1). In control cells without elacridar, the transport of Rho123 is the result of both passive and active drug transport. Rho123 was actively transported from the intracellular to extracellular compartment by ABCB1. The model could be described by the following equations:

$$\frac{dA1}{dt} = PS_{passive} * C2 - PS_{passive} * C1 - CL_{efflux} * C1 \quad (1)$$

$$\frac{dA2}{dt} = CL_{efflux} * C1 + PS_{passive} * C1 - PS_{passive} * C2 \quad (2)$$

Where  $dA_X/dt$  is the rate of change of the amount of Rho123 in compartment X,  $PS_{passive}$  is the rate of bidirectional passive drug transfer,  $CL_{efflux}$  is the rate of active efflux out of the cells, and C1 and C2 are the Rho123 concentrations in the intracellular and extracellular compartment, respectively.

Assuming steady-state ( $dA1/dt=0$  and  $dA2/dt=0$ ), the supernatant-intracellular ratio (SIR) in the transport assay is given by Eq.3:

$$SIR_0 = \frac{C2}{C1} = \frac{PS_{passive} + CL_{efflux}}{PS_{passive}} \quad (3)$$

We assumed that Rho123 is only actively mediated by ABCB1. So passive diffusion can be approximated by using the results in the presence of the ABCB1 inhibitor elacridar. Therefore, the

equations for the intracellular compartment (Eq. 4), extracellular compartment (Eq.5), and SIR (Eq.6) became:

$$\frac{dA1}{dt} = PS_{passive} * C2 - PS_{passive} * C1 \quad (4)$$

$$\frac{dA2}{dt} = PS_{passive} * C1 - PS_{passive} * C2 \quad (5)$$

$$SIR_{0,ela} = \frac{C2}{C1} = \frac{PS_{passive}}{PS_{passive}} \quad (6)$$

After IL-6 incubation, ABCB1 activity is modified.  $CL_{efflux,IL6}$  is the rate of active efflux out of the cells under IL-6 exposure. We assume no effect of IL-6 on passive diffusion, resulting in the following equations:

$$\frac{dA1}{dt} = PS_{passive} * C2 - PS_{passive} * C1 - CL_{efflux,IL6} * C1 \quad (7)$$

$$\frac{dA2}{dt} = CL_{efflux,IL6} * C1 + PS_{passive} * C1 - PS_{passive} * C2 \quad (8)$$

$$SIR_{IL6} = \frac{C2}{C1} = \frac{PS_{passive} + CL_{efflux,IL6}}{PS_{passive}} \quad (9)$$

The ratio between the SIR in control cells with and without elacridar was equal to 0.34 in the transport assay, resulting in Eq. 10.

$$\frac{SIR_{0,ela}}{SIR_0} = 0.34 = \frac{PS_{passive}}{PS_{passive} + CL_{efflux}} \quad (10)$$

Rearranging Eq.10 allows us to relate  $PS_{passive}$  and  $CL_{efflux}$ :

$$PS_{passive} = 0.34 * (PS_{passive} + CL_{efflux}) = \frac{0.34}{(1-0.34)} * CL_{efflux} = 0.52 * CL_{efflux} \quad (11)$$

The ratio between SIR in IL-6-exposed cells and control cells was also measured in the transport assay and found to be equal to 0.72:

$$\frac{SIR_{IL6}}{SIR_0} = 0.72 = \frac{PS_{passive} + CL_{efflux,IL6}}{PS_{passive} + CL_{efflux}} \quad (12)$$

By reordering Eq. 12 (Eq. 13) and substituting Eq. 11, we obtain a relationship between  $CL_{efflux}$  in control cells and under IL-6 exposure (Eq. 14).

$$CL_{efflux,IL6} = 0.72 * (PS_{passive} + CL_{efflux}) - PS_{passive} \quad (13)$$

$$CL_{efflux,IL6} = 0.58 * CL_{efflux} \quad (14)$$

This relationship was used in the PBPK model.

### PBPK simulations

PBPK simulations were performed with PK-sim and Mobi 7.4. Table I summarizes the drug-dependent parameters (physicochemical, absorption, distribution, metabolism, and excretion processes) obtained from Hanke et al. (24). Target binding to ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting subunit alpha 2 (ATP1A2) and active efflux by ABCB1 were implemented in PK-sim. The equation for the active efflux of digoxin from the interstitial brain fluid to plasma by ABCB1 is described by a saturable process following Michaelis-Menten-type kinetics (Eq. 15). The factor  $k_{IL-6} = 0.58$  was included in this equation with Mobi to mimic the IL-6-induced decrease of ABCB1 activity.

$$\frac{dN}{dt} = k_{IL-6} * [ABCB1] * f_{int} * V * \frac{k_{cat} * K_{water_{int}} * [Digox]_{int}}{(K_m + K_{water_{int}} * [Digox]_{int})} \quad (15)$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[ABCB1]} \quad (16)$$

Where  $dN/dt$  is the transport rate;  $f_{int}$  is the fraction interstitial;  $K_{water_{int}}$  is the partition coefficient interstitial water;  $[ABCB1]$  is the ABCB1 concentration;  $V$  is the interstitial volume;  $[Digox]_{int}$  is the digoxin interstitial concentration;  $K_m$  is the Michaelis-Menten constant; and  $V_{max}$  is the maximal velocity.

The simulations included a generated population of 100 healthy European individuals (50% female; age range 20–50 years); demographic characteristics are summarized in Table II. We tested two administration protocols: a single intravenous administration of 0.5 mg digoxin, and the intravenous administration of 0.5 mg digoxin every 24 hours for 30 days. Different simulations of ABCB1 brain activity were performed for the two administration protocols with  $k_{IL-6} = 1$  or 0.58. Venous and brain-interstitial digoxin concentrations-time, and respective PK parameters were computed.

### Statistical analysis

RNA sequencing pathway results were statistically analyzed using Fisher's exact test for the IPA analysis. The mRNA fold-changes were expressed as mean  $\pm$  SEM and statistically analyzed by the Mann-Whitney test. For ABC transporter activity tests, SIRs were expressed as mean  $\pm$  SEM and analyzed by the Dunn and Mann-Whitney tests. For PBPK simulations, Student's t tests were used to analyze simulated PK parameters. The criterion of significance was  $P_p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Effects of IL-6 on gene expression in hCMEC/D3 cells

After hCMEC/D3 cells were exposed to 20 ng/mL IL-6 for 72 h, we performed RNA sequencing to analyze the changes in gene expression. By considering regulation with  $\log_2$  fold changes  $\geq 2$  and  $\leq -2$  to keep only the greatest deviations, we identified 12 significantly deregulated pathways ( $P < 0.05$ ). Of these pathways, 10 were involved in the inflammatory response (Table III): acute phase response signaling (20 genes), Th1 and Th2 activation pathway (16 genes), T-helper-cell differentiation (10 genes), complement system (7 genes), IL-10 signaling (8 genes), Th2 pathway (11 genes), crosstalk between dendritic cells and natural killer cells (8 genes), Th1 pathway (10 genes), IL-6 signaling (10 genes), and LPS/IL-1-mediated inhibition of RXR function (13 genes). The place of IL-6 among these pathways is represented in Supplementary data 1. These results show that IL-6 triggers changes in the expression pattern of genes in hCMEC/D3 cells with a role in the inflammatory response, such as cytokines, chemokines, complement proteins, and signaling proteins involved in immune reactions.

We investigated gene families involved in BBB permeability by considering fold changes of  $\geq 1.2$  and  $\leq 0.8$  (Table IV); these thresholds were chosen because of the slight variations among these genes. Details of the different gene expression levels expressed in reads per kilobase of transcript per million mapped reads (RPKM) are given in Supplementary data 2. Previous studies have highlighted the effect of inflammation on the degradation of barrier properties by impairing cell-cell contact, leading to increased paracellular pathways (25). Therefore, we looked at genes involved in junctional complex molecules and found changes in adherens-, tight-, and gap-junctions (4, 23, and 10 genes, respectively) after IL-6 exposure. Cellular attachment to the extracellular matrix also plays a key role in the endothelial barrier property (26). IL-6 exposure induced deregulation in the focal adhesion gene family (35 genes). Transporter expression also plays a major role in BBB permeability. We detected deregulation of some ABC and SLC transporters (7 and 11 genes, respectively), which were mostly induced.

Among these families, we focused on some important genes. Endothelial cells, including those from the BBB, synthesize IL-6 and its receptors (13). IL-6 transcripts are 2-times higher in IL-6-stimulated cells. IL-6 leads to a 56% increase in gp130 (IL-6ST), whereas IL-6R is slightly decreased by 15%. Chemokines, such as CCL2 and CXCL2, trigger conformational changes in

Accepted Article

leukocyte integrins that improve their binding to endothelial cell adhesion molecules (CAMs) and promote leukocyte diapedesis (4). The expression of these two major chemokines was increased 1.91- and 3.14-times after IL-6 exposure. ICAM-1 is promoted by inflammation and its expression increased by 43% with IL-6 stimulation. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates endothelial growth and permeability by interacting with two plasma membrane receptors on vascular endothelial cells: FLT-1 and KDR (27). By binding to its receptors, VEGF leads to phosphorylation cascades and alters tight junction expression. After IL-6 stimulation, VEGF, FLT-1, and KDR mRNA expression increased by 23%, 25%, and 14%, respectively. These changes are summarized in Figure 2A.

Within cellular junction gene families, we analyzed changes in the expression level of occludin (OCLN), zonula-occludens (ZO-1), claudin-5 (CLDN5), VE-cadherin 5 (CDH5), and integrin-1 $\beta$  (ITGB1) (Figure 2B). All of them have already been shown to be impacted by inflammation (13, 28, 29). In our experiment, mRNA deregulation of occludin, ZO-1, and integrin-1 $\beta$  was less than 10%. Claudin-5 and VE-cadherin 5 expression decreased by approximately 20%.

Transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC1 are major drug-transporters and decreased slightly. RTqPCR confirmed the deregulation; ABCB1, ABCG2, and ABCC1 expression decreased by 43%, 39%, and 29%, respectively (Figure 2C).

#### **Effects of IL-6 on ABC transporter activities**

After 30 min of substrate loading and 2 hours of incubation with culture medium with or without the ABCB1 inhibitor elacridar, we measured Rho123 in the supernatant and intracellular compartment. Compared to control cells, the SIR significantly decreased by 28% after IL-6 exposure, and significantly increased by 158% after TNP exposure (Figure 3A). Adding elacridar significantly decreased the ratio by 66% in control, 65% in IL-6-exposed cells, and 41% in TNP-exposed cells compared to the same cell groups without elacridar.

We conducted the same tests with CFDA, with or without the ABCC inhibitor MK571. The SIR of CF was non-significantly increased by 5% after IL-6 exposure (Figure 3B). With MK571, this ratio was decreased significantly by 98.4% for control cells and 98.5% for IL-6-exposed cells.

### PBPK simulations

Simulations were performed for a population of 100 people following single-dose administration of 0.5 mg digoxin with  $k_{IL-6} = 1$  (control) or 0.58 (IL-6 exposed). Venous plasma PK profiles (Figure 4A) and parameters (Table V) were the same in both settings. We observed slight differences in the interstitial brain PK profiles (Supplementary data 3), with a non-significant 4% increase of  $AUC_{inf}$  and 1% increase of  $C_{max}$  in the brain after IL-6 exposure (Table V). The elimination half-life of digoxin from the brain was significantly increased by 4 hours.

We also performed simulations for a population of 100 people after repeated administration of digoxin over 30 days using both values of  $k_{IL-6}$ . Venous plasma PK profiles (Figure 4B) and parameters (Table VI) were the same in both settings. Similar differences in interstitial brain profiles were observed: AUC during a steady-state dosing interval,  $C_{max}$ , and  $C_{trough}$  in the brain were non-significantly increased by 4%, 1%, and 5%, respectively, with IL-6 exposure (Figure 4B and Table VI). A significant increase in the half-life (by 3 hours) was observed in the brain.

## DISCUSSION

Inflammation is associated with several CNS diseases, including multiple sclerosis, Alzheimer's disease (30), and Parkinson disease, and leads to BBB disorders. The BBB dysfunction covers a wide range of phenomenon, including leakiness of the BBB, transporter deregulation, cell junction alteration, and up-regulation of selectins, CAM, and chemokines.

In the present study, IL-6 was selected as a key factor in the inflammatory response. Its impact on the whole transcriptome of a BBB cell line was studied for the first time using RNA sequencing. We provided an overview of genes involved in the inflammatory response and BBB permeability. Our transcriptomic approach was qualitative, as we aimed to determine which genes are deregulated with a maximum inflammatory effect. Though IL-6 plasma levels are only a few picograms per milliliter in healthy people, they can reach tens or hundreds of picograms per milliliter in some diseases, such as cancer (31)(30)(31) and rheumatoid arthritis (31, 32). We incubated cells with 20 ng/mL of IL-6 based on our previous studies (20). Our focus was not on early deregulation; therefore, cells were exposed for 72 h in order to mimic a chronic inflammatory state. We then focused on major ABC transporters and validated the slight

downregulation observed with RNA sequencing using RTqPCR. We also investigated whether the variation in mRNA expression correlated with efflux activity. Finally, PBPK simulation allowed us to predict the consequences of these changes on brain exposure to one ABCB1 substrate.

IL-6 promoted changes in the gene expression profile of hCMEC/D3 cells, including altered expression of genes with roles in chemokine and cytokine activities, leukocyte maturation, and migration across the BBB (Table II). These results indicate that, under our experimental conditions, cells were able to respond to IL-6 in an expected way.

Among families involved in BBB permeability, such as the focal adherens, cell junction, and transporter families, numerous genes were deregulated (Table III). Exposure of hCMEC/D3 cells to two other cytokines, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ , for 24 h triggered the same kind of changes among these three families (33).

Several chemokines and CAMs, including CCL2, CXCL2, and ICAM-1, enhance leukocyte arrest and diapedesis; their mRNA expression levels were up-regulated in hCMEC/D3 cells after IL-6 stimulation. This consolidates previous observations reported after LPS (4) or TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  exposure (33).

Similar to the observations by Ramirez et al. (33) after exposure to LPS, IL-6 and gp-130 were up-regulated in hCMEC/D3 cells, but not IL-6R. IL-6R and gp-130 play an important role in BBB disruption, and their expression levels are altered in the serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis (34, 35). Blecharz et al. (13) found an elevation of IL-6 and IL-6R, but not gp-130, in a mouse capillary endothelial cell line after stimulation with IL-6. This induces a decrease in tight junction expression and barrier integrity, which are restored by adding an anti-IL-6R antibody. The same trends were observed by Couto et al. (29); co-culture of glioblastoma, microglia, and endothelial cells exposed to exogenous IL-6 resulted in down-regulation of tight junctions and loss of barrier properties. An anti-IL-6 antibody and JAK/STAT3 pathway inhibitor reestablished normal barrier function. This corroborates the role of the IL-6/IL-6R and JAK/STAT3 pathways in BBB permeability and allow for reflection in regards to new therapeutics. The effects of LXR $\alpha$  (36) and NF-kB (28) have also been highlighted, but we observed only a small increase (<20%) in our model.

With regards to the main drug transporters, we observed slight decreases of ABCB1, ABCC1, and ABCG2 mRNA. IL-6 stimulation promoted a 28% decrease in the SIR for Rho123, reflecting a decline in Rho123 efflux and ABCB1 activity. Several studies have been conducted in different cell lines and animal models to evaluate the effects of cytokines on ABC transporters. Cytokines involved in inflammatory responses, such as TNF- $\alpha$ , have been shown to up-regulate ABCB1

mRNA and protein expression but not significantly impact its activity (5). In this study, IL-1 $\beta$  did not have a significant impact on ABCB1 mRNA, protein, or efflux activity. Association of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  for 24 h triggered a slight 25% decrease of ABCB1 and no deregulation of ABCC1 and ABCG2 (33). Another combination using TNF $\alpha$  and IL-6 highlighted a 40% decrease in ABCB1 efflux activity in human brain microvascular endothelial cells derived from induced pluripotent stem cells (37). A synergistic effect of concomitant exposure to IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-17 on barrier integrity has also been reported (37). However controversial results on ABCB1 expression and efflux activity have been observed depending on the cytokines. It points out the relevance of studying cytokine combinations to mimic the inflammatory response.

The in vivo BBB properties are regulated by interactions between vascular, immune, and neural cells. Co-culturing endothelial cells with astrocytes mitigates the effect of cytokine exposure on BBB alteration compared to culturing endothelial cells alone (37). Immunoglobulin (Ig)-G transport across the BBB is enhanced by TNF and IL-6 (37, 38), and this increase is mitigated by co-culture with astrocytes. We observed a 21% decrease in FcRn mRNA expression, which may be involved in reverse transcytosis of IgG (39).

Despite the limitations of the hCMEC/D3 model, the results of the ABC transporter activity test can provide a predictive index, similar to how the Caco2 model does for predicting intestinal absorption. However, in the present study, we used PBPK simulations to quantify and predict the potential impact of the decreased ABCB1 efflux activity on the PK profile of digoxin, an ABCB1 substrate. After single or repeated intravenous digoxin administration, we observed only slight effects on brain interstitial fluid exposure. These results have to be considered cautiously, as diffusion and paracellular transport changes were not taken into account in the model.

In our previous study (20), we demonstrated that inflammation can impair pre-systemic metabolism. The decreased intestinal and hepatic metabolism after cytokine exposure results in a decrease in the first-pass effect, and this increased bioavailability yields higher systemic drug concentrations. For drugs with an important first-pass effect, even if inflammation induces only mild alterations of drug transporters in the CNS, drug transport across the BBB may be significantly enhanced due to the previously increased total drug concentration in the plasma. These alterations may have clinical consequences and could necessitate dosage adaptation.

Inflammatory responses also impact plasma protein levels; albumin is decreased (40), whereas alpha-1 acid glycoprotein (AAG) is increased (14). In cases of systemic inflammation or neurological disease, both albumin (41, 42) and AAG (43, 44) levels are increased in the cerebrospinal fluid. An interaction between plasma proteins and brain capillary membranes in

vivo induces a conformational change in plasma protein structures that reduces the binding affinity and increases the capillary drug-unbound fraction during blood passage through the capillary bed (45). Therefore, inflammation may modify the availability of drugs to the brain. In the present study, digoxin was cleared by both glomerular filtration and metabolism in the liver. The extraction ratio for both organs is low (46). According to Benet et al., changes in protein binding do not impact the unbound AUC and is not clinically relevant in this case (47).

## **CONCLUSION**

In conclusion, IL-6 stimulation of hCMEC/D3 cells resulted in numerous and complex alterations in gene expression, which may impact BBB function. The induced variations in ABC transport are slight with mild impact on drug PK. Thus, from a PBPK modeling perspective, ABC transport processes that describe drug kinetics in the brain do not have to be modified at the BBB level if only IL-6 is elevated.

## **SUPPORTING INFORMATION**

Supplementary data associated with this article can be found in the online version.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

This study was supported by the Institut de recherches internationales Servier.

## REFERENCES

1. Poller B, Gutmann H, Krähenbühl S, Weksler B, Romero I, Couraud P-O, et al. The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *Journal of Neurochemistry*. 2008;107(5):1358-68.
2. Dauchy S, Miller F, Couraud PO, Weaver RJ, Weksler B, Romero IA, et al. Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(5):897-909.
3. de Vries HE, Kooij G, Frenkel D, Georgopoulos S, Monsonego A, Janigro D. Inflammatory events at blood-brain barrier in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders: implications for clinical disease. *Epilepsia*. 2012;53 Suppl 6:45-52.
4. Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2017;60:1-12.
5. Poller B, Drewe J, Krahenbuhl S, Huwyler J, Gutmann H. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(1):63-70.
6. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol*. 1996;64(1):37-43.
7. Goralski KB, Hartmann G, Piquette-Miller M, Renton KW. Downregulation of mdr1a expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin. *Br J Pharmacol*. 2003;139(1):35-48.
8. Ando T, Dunn AJ. Mouse tumor necrosis factor-alpha increases brain tryptophan concentrations and norepinephrine metabolism while activating the HPA axis in mice. *Neuroimmunomodulation*. 1999;6(5):319-29.
9. Banks WA, Dohgu S, Lynch JL, Fleegal-DeMotta MA, Erickson MA, Nakaoke R, et al. Nitric oxide isoenzymes regulate lipopolysaccharide-enhanced insulin transport across the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 2008;149(4):1514-23.
10. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010;13(5):541-7.
11. Klein M, Thomas M, Hofmann U, Seehofer D, Damm G, Zanger UM. A Systematic Comparison of the Impact of Inflammatory Signaling on Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Gene

Expression and Activity in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;43(2):273-83.

12. Le Vee M, Lecureur V, Stieger B, Fardel O. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  or interleukin-6. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(3):685-93.

13. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelha M, Rosner J, Schneider UC, et al. Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Transl Stroke Res*. 2018;9(6):631-42.

14. Klein M. Role of inflammatory cytokine signaling in the regulation of detoxifying functions in human hepatocytes and liver: Stuttgart University; 2014.

15. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. 2005;19(13):1872-4.

16. Zhuang X, Lu C. PBPK modeling and simulation in drug research and development. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(5):430-40.

17. Kuepfer L, Niederalt C, Wendl T, Schlender JF, Willmann S, Lippert J, et al. Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Build a PBPK/PD Model. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2016;5(10):516-31.

18. Ball K, Bouzom F, Scherrmann JM, Walther B, Declèves X. Development of a physiologically based pharmacokinetic model for the rat central nervous system and determination of an in vitro-in vivo scaling methodology for the blood-brain barrier permeability of two transporter substrates, morphine and oxycodone. *J Pharm Sci*. 2012;101(11):4277-92.

19. Gaohua L, Neuhoff S, Johnson TN, Rostami-Hodjegan A, Jamei M. Development of a permeability-limited model of the human brain and cerebrospinal fluid (CSF) to integrate known physiological and biological knowledge: Estimating time varying CSF drug concentrations and their variability using in vitro data. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2016;31(3):224-33.

20. Simon F, Garcia J, Guyot L, Guitton J, Vilchez G, Bardel C, et al. Impact of Interleukin-6 on Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Intestinal Cells. *AAPS J*. 2019;22(1):16.

21. Jouan E, Le Vee M, Mayati A, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O. Evaluation of P-Glycoprotein Inhibitory Potential Using a Rhodamine 123 Accumulation Assay. *Pharmaceutics*. 2016;8(2).

22. Pozniak B, Pawlak A, Obminska-Mrukowicz B. Flow cytometric assessment of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein activity and expression in canine lymphoma. *In Vivo*. 2015;29(1):149-53.

23. de Lannoy IA, Silverman M. The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189(1):551-7.
24. Hanke N, Frechen S, Moj D, Britz H, Eissing T, Wendl T, et al. PBPK Models for CYP3A4 and P-gp DDI Prediction: A Modeling Network of Rifampicin, Itraconazole, Clarithromycin, Midazolam, Alfentanil, and Digoxin. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2018;7(10):647-59.
25. Lopez-Ramirez MA, Fischer R, Torres-Badillo CC, Davies HA, Logan K, Pfizenmaier K, et al. Role of caspases in cytokine-induced barrier breakdown in human brain endothelial cells. *J Immunol.* 2012;189(6):3130-9.
26. Alexander JS, Elrod JW. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat.* 2002;200(6):561-74.
27. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* 2002;68(5):311-23.
28. Voirin AC, Perek N, Roche F. Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF-alpha) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells in vitro BBB model. *Brain Res.* 2020;1730:146647.
29. Couto M, Coelho-Santos V, Santos L, Fontes-Ribeiro C, Silva AP, Gomes CMF. The interplay between glioblastoma and microglia cells leads to endothelial cell monolayer dysfunction via the interleukin-6-induced JAK2/STAT3 pathway. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):19750-60.
30. Takeda S, Sato N, Ikimura K, Nishino H, Rakugi H, Morishita R. Increased blood-brain barrier vulnerability to systemic inflammation in an Alzheimer disease mouse model. *Neurobiol Aging.* 2013;34(8):2064-70.
31. Martin F, Santolaria F, Batista N, Milena A, Gonzalez-Reimers E, Brito MJ, et al. Cytokine levels (IL-6 and IFN-gamma), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer. *Cytokine.* 1999;11(1):80-6.
32. Robak T, Gladalska A, Stepien H, Robak E. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 1998;7(5):347-53.
33. Lopez-Ramirez MA, Male DK, Wang C, Sharrack B, Wu D, Romero IA. Cytokine-induced changes in the gene expression profile of a human cerebral microvascular endothelial cell-line, hCMEC/D3. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):27.
34. Michalopoulou M, Nikolaou C, Tavernarakis A, Alexandri NM, Rentzos M, Chatzipanagiotou S, et al. Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) in cerebrospinal fluid of patients with inflammatory and non-inflammatory neurological diseases. *Immunol Lett.* 2004;94(3):183-9.

35. Padberg F, Feneberg W, Schmidt S, Schwarz MJ, Korschenhausen D, Greenberg BD, et al. CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1999;99(2):218-23.
36. Wouters E, de Wit NM, Vanmol J, van der Pol SMA, van Het Hof B, Sommer D, et al. Liver X Receptor Alpha Is Important in Maintaining Blood-Brain Barrier Function. *Front Immunol.* 2019;10:1811.
37. Mantle JL, Lee KH. A differentiating neural stem cell-derived astrocytic population mitigates the inflammatory effects of TNF-alpha and IL-6 in an iPSC-based blood-brain barrier model. *Neurobiol Dis.* 2018;119:113-20.
38. Mantle JL, Lee KH. Immunoglobulin G transport increases in an in vitro blood-brain barrier model with amyloid-beta and with neuroinflammatory cytokines. *Biotechnol Bioeng.* 2019;116(7):1752-61.
39. Zhang Y, Pardridge WM. Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol.* 2001;114(1-2):168-72.
40. Don BR, Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Semin Dial.* 2004;17(6):432-7.
41. LeVine SM. Albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurol.* 2016;16:47.
42. Elwood E, Lim Z, Naveed H, Galea I. The effect of systemic inflammation on human brain barrier function. *Brain Behav Immun.* 2017;62:35-40.
43. Vrethem M, Ohman S, von Schenck H, Forsberg P, Olsson JE. Comparison of concentration of orosomucoid in serum and cerebrospinal fluid in different neurological diseases. *Acta Neurol Scand.* 1987;75(5):328-31.
44. Adam P, Sobek O, Taborsky L, Hildebrand T, Tutterova O, Zacek P. CSF and serum orosomucoid (alpha-1-acid glycoprotein) in patients with multiple sclerosis: a comparison among particular subgroups of MS patients. *Clin Chim Acta.* 2003;334(1-2):107-10.
45. Mandula H, Parepally JM, Feng R, Smith QR. Role of site-specific binding to plasma albumin in drug availability to brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(2):667-75.
46. Holford NY, D-S. Clearance. *Transl Clin Pharmacol.* 2015;23(2):42-5.
47. Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71(3):115-21.

## TABLES

Table I. Drug-dependent parameters of the final physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for digoxin

Parameter	Unit	Digoxin model	Description
MW	g/mol	780.93	Molecular weight
Solubility (pH)	mg/L	64.8 (water)	Solubility
LogP		1.40	Lipophilicity
fu	%	71.0	Fraction unbound
ATP1A2 Kd	μmol/L	0.0256	Dissociation constant
ATP1A2 koff	1/min	9.89E-04	Dissociation rate constant
ABCB1 K <sub>M</sub>	μmol/L	177.0	Michaelis-Menten constant
ABCB1 kcat	1/min	71.2	P-gp catalytic rate constant
CL <sub>hep</sub>	mL/min	41.1	Hepatic plasma clearance
GFR fraction		1	Fraction of filtered drug reaching the urine

fu: unbound fraction, ATP1A2: ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting subunit alpha 2, CL: clearance, GFR: glomerular filtration rate.

Table II. Population demographic parameters for the PBPK model of digoxin

Parameter	Unit	Mean (SD)
Number of individuals		100
Proportion of females	%	50
Age	years	69.5 (12.6)
Weight	kg	35.7 (9.2)
Height	cm	168.9 (10.7)
BMI	kg/m <sup>2</sup>	24.3 (3.28)

Table III. Ingenuity pathway analysis (IPA) of the genes differentially expressed in hCMEC/D3 cells after IL-6 stimulation (72 h; 20 ng/mL)

Ingenuity canonical pathway	P-value	Ratio	Differentially expressed genes
Acute phase response signaling	1.46E-04	20/179	SOCS3, SERPING1, C3, C1S, SERPINA3, SAA2, IL6, SAA4, SAA2-SAA4, FGG, SERPIND1, C1R, C4A/C4B, IL18, SAA1, CRP, OSMR, LBP, TNFRSF11B, AGT
LXR/RXR activation	1.43E-03	14/121	C3, IL1RAPL2, IL1RL1, SAA2, IL6, SAA4, C4A/C4B, IL18, SAA1, CD14, LBP, AGT, TNFRSF11B, APOC3
Th1 and Th2 activation pathway	3.66E-03	16/187	CD247, SOCS3, IL2RG, IL5, IL1RL1, IL6, SPI1, TSLP, IL18R1, IL18, LTA, HLA-DRA, HLA-DMB, CXCR6, JAK3, IFNA1/IFNA13
T-Helper cell differentiation	4.01E-03	10/73	IL18, IL2RG, IL5, HLA-DMB, HLA-DRA, IL6, BCL6, RORC, TNFRSF11B, IL18R1
Complement system	6.94E-03	7/37	C4A/C4B, C1R, SERPING1, ITGAM, C3, C1S, C7
IL-10 signaling	1.83E-02	8/69	SOCS3, IL18, IL1RAPL2, IL1RL1, FCGR2A, CD14, LBP, IL6
Th2 pathway	3.34E-02	11/152	CD247, SOCS3, IL2RG, IL5, IL1RL1, HLA-DMB, HLA-DRA, CXCR6, JAK3, TSLP, SPI1
Crosstalk between dendritic cells and natural killer cells	3.96E-02	8/89	IL2RG, IL18, LTA, HLA-DRA, IL6, ACTG2, CSF2, IFNA1/IFNA13
Th1 pathway	4.20E-02	10/137	CD247, SOCS3, IL18, LTA, HLA-DMB, HLA-DRA, IL6, JAK3, IFNA1/IFNA13, IL18R1
IL-6 signaling	4.42E-02	10/139	SOCS3, IL18, IL1RAPL2, IL1RL1, HSPB2, CRP, CD14, LBP, IL6, TNFRSF11B
Dendritic cell maturation	4.98E-02	12/196	TLR2, CD1D, IL18, FCGR2A, LTA, HLA-DMB, HLA-DRA, IL6, CSF2, PLCH2, IFNA1/IFNA13, TNFRSF11B
LPS/IL-1-mediated inhibition of RXR function	4.98E-02	13/224	SLC10A1, IL1RAPL2, SLC27A2, FMO2, IL1RL1, ALDH8A1, SULT2B1, IL18, CD14, FMO1, HS6ST3, LBP, TNFRSF11B

Ratio: number of differentially expressed genes in a pathway divided by the total number of genes in the same pathway.

Table IV. Genes related to modulation of BBB permeability in hCMEC/D3 cells after IL-6 stimulation (72 h; 20 ng/mL)

Gene families	Regulation	Ratio	Differentially expressed genes
ABC transporters	Increase	6/35	ABCC11, ABCA4, ABCG1, ABCA6, ABCA1
	Decrease	1/35	ABCD2
SLC transporters	Increase	8/141	SLCO4A1, SLC6A16, SLC38A5, SLC25A37, SLC39A14, SLCO2B1, SLCO2A1, SLC2A3
	Decrease	3/141	SLC2A12, SLC7A7, SLC22A18AS
Focal adherens	Increase	13/173	ITGB3, FLT1, VEGFA, TLN2, PDGFB, VWF, PAK3, FLT4, COL4A4, ITGA4, TNXB, COL6A3, CAV3
	Decrease	22/173	MYL2, CCND2, THBS4, ITGA10, PARVG, RASGRF1, COL1A2, PDGFD, MYLK3, MYLK2, COMP, CCND1, ITGA11, LAMB3, COL6A2, VEGFC, ITGA6, COL9A3, ITGB7, CAPN2, CAV1, PGF, MYLPF
Adherens junctions	Increase	2/64	SORBS1, SNAI1
	Decrease	2/64	CDH1, PTPN6
Tight junctions	Increase	10/142	CLDN6, CLDN10, PRKCI, MARVELD3, PRKCZ, ACTR3B, TUBA3D, JAM2, YBX3, CD1D
	Decrease	13/142	MYL2, CRB3, CLDN3, ACTR3C, CLDN9, AMOT, CLDN20, CCND1, TJP3, CGNL1, PARD6A, MYL6, CLDN14
Gap junctions	Increase	8/69	ITPR1, ITPR2, PRKG2, ADCY4, PDGFB, TUBA3D, ADCY1, TUBB4A
	Decrease	2/69	PDGFD, HTR2B

Ratio: number of differentially expressed genes in a pathway divided by the total number of genes in the same pathway.

Table V. Simulated pharmacokinetic parameters in a virtual population (N = 100) after a single intravenous administration of 0.5 mg digoxin with or without an inflammatory effect on brain ABCB1.

	Brain	Brain, IL6	Plasma	Plasma, IL6	Brain, IL6/Brain	Brain/Plasma	Brain, IL6/Plasma, IL6
AUC <sub>inf</sub> , ng*min/mL	1578 (422)	1638 (438)	1989 (539)	1989 (539)	1.04	0.79	0.82
C <sub>max</sub> , ng/mL	0.81 (0.15)	0.82 (0.15)	12.6 (2.10)	12.6 (2.09)	1.01	0.06	0.07
Half-life, h	122 (6.64)	126 (6.92)***	30.1 (3.59)	30.1 (3.58)	1.04	4.05	4.20

Data are presented as mean (±SD). \*\*\*P<0.001, Student's t test.

Table VI. Simulated pharmacokinetic parameters in a virtual population (N = 100) after repeated intravenous administration of 0.5 mg digoxin over 30 days with or without an inflammatory effect on brain ABCB1.

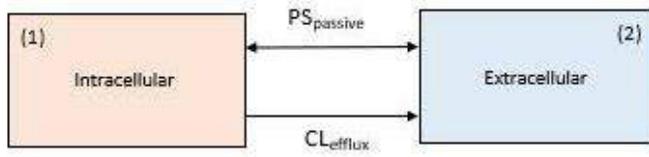
	Brain	Brain, IL6	Plasma	Plasma, IL6	Brain, IL6/Brain	Brain/Plasma	Brain, IL6/Plasma, IL6
AUC <sub>clast-tlast-1τ</sub> ng*min/mL	1525 (385)	1578 (398)	1993 (542)	1994 (542)	1.04	0.77	0.79
C <sub>max</sub> ng/mL	2.14 (0.34)	2.16 (0.34)	28.7 (4.56)	28.7 (4.56)	1.01	0.075	0.075
C <sub>trough</sub> ng/mL	0.85 (0.22)	0.89 (0.23)	0.35 (0.16)	0.35 (0.16)	1.05	2.43	2.54
Half-life, h	125 (5.97)	128 (6.08)***	28.3 (3.42)	28.3 (3.42)	1.02	4.42	4.53

Data are presented as mean (±SD). \*\*\*P<0.001, Student's t test.

## FIGURES

Figure 1

A)



B)

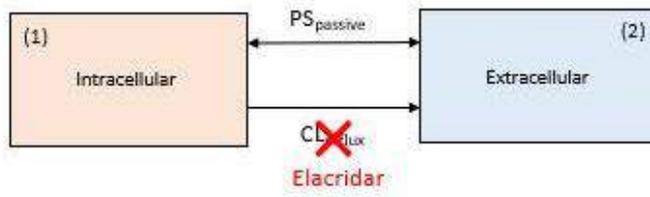


Figure 2

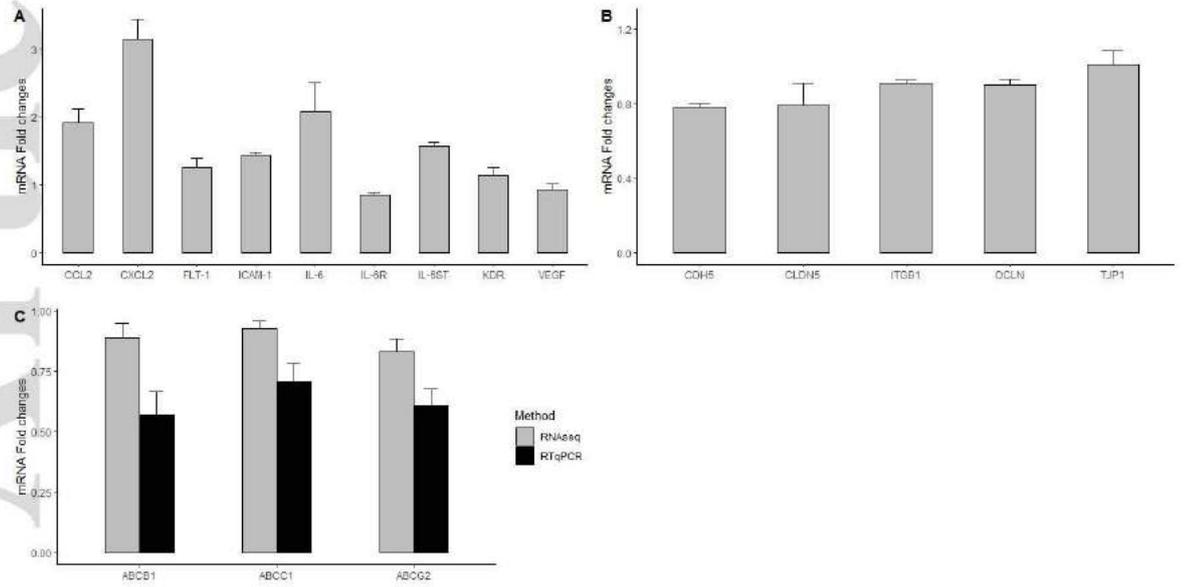


Figure 3

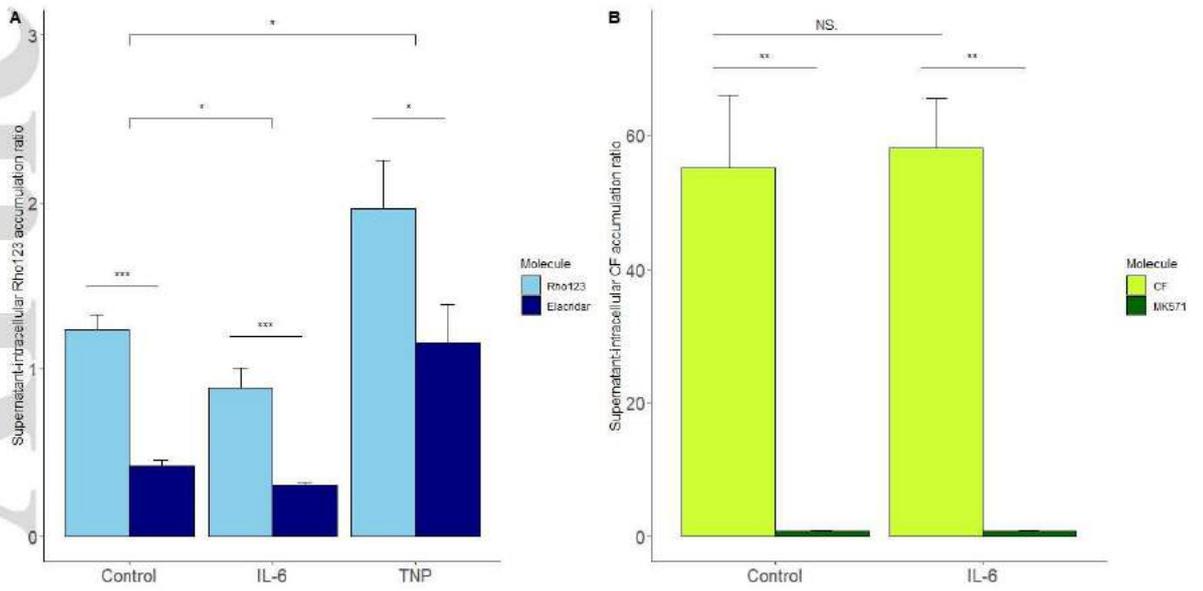
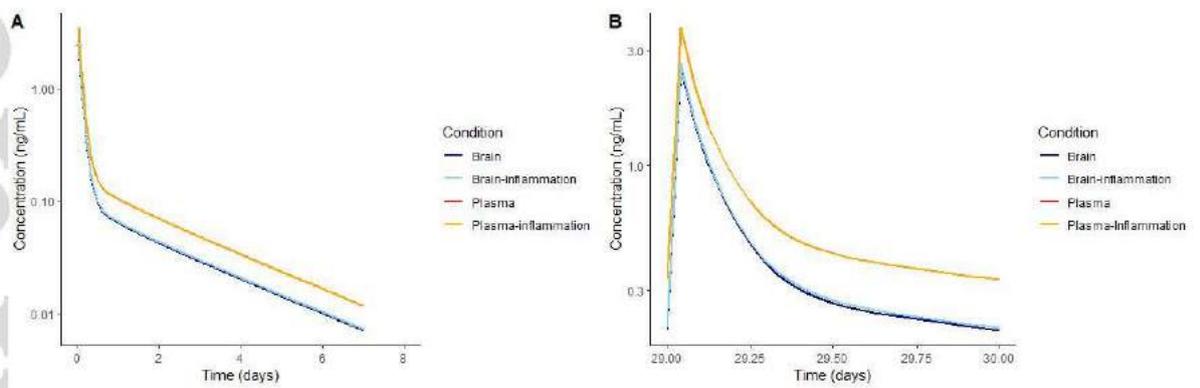


Figure 4



## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Bicompartamental model of Rho123 in the hCMEC/D3 transporter assay. (A) Absence or (B) presence of elacridar.

Figure 2. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Relative changes in mRNA expression in hCMEC/D3 cells after 72 h treatment with 20 ng/mL IL-6. (A) CAM, chemokines, and cytokines. (B) Cell junctions. (C) Transporters. RNA sequencing (grey) or RTqPCR (black); \*P<0.05, Mann-Whitney test.

Figure 3. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Supernatant-intracellular accumulation ratios. (A) Rho 123 with or without elacridar treatment in hCMEC/D3 cells incubated with culture medium (Control; N=9), 20 ng/mL IL-6 for 72 h (N=9), or 0.25 mM TNP for 48 h (N=7). (B) CF with or without MK571 treatment in hCMEC/D3 cells incubated for 72 h with culture medium (Control; N=6) or 20 ng/mL IL-6 (N=6). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, Dunn and Wilcoxon tests.

Figure 4. Mean simulated digoxin pharmacokinetics profiles in venous blood and interstitial brain fluid with or without an inflammatory effect on brain ABCB1 in a virtual population (N=100). (A) Following a single intravenous administration of 0.5 mg digoxin. (B) Following an intravenous administration of 0.5 mg digoxin after repeated administration over 30 days.

# Matériel supplémentaire :

Acute Phase Response Signaling

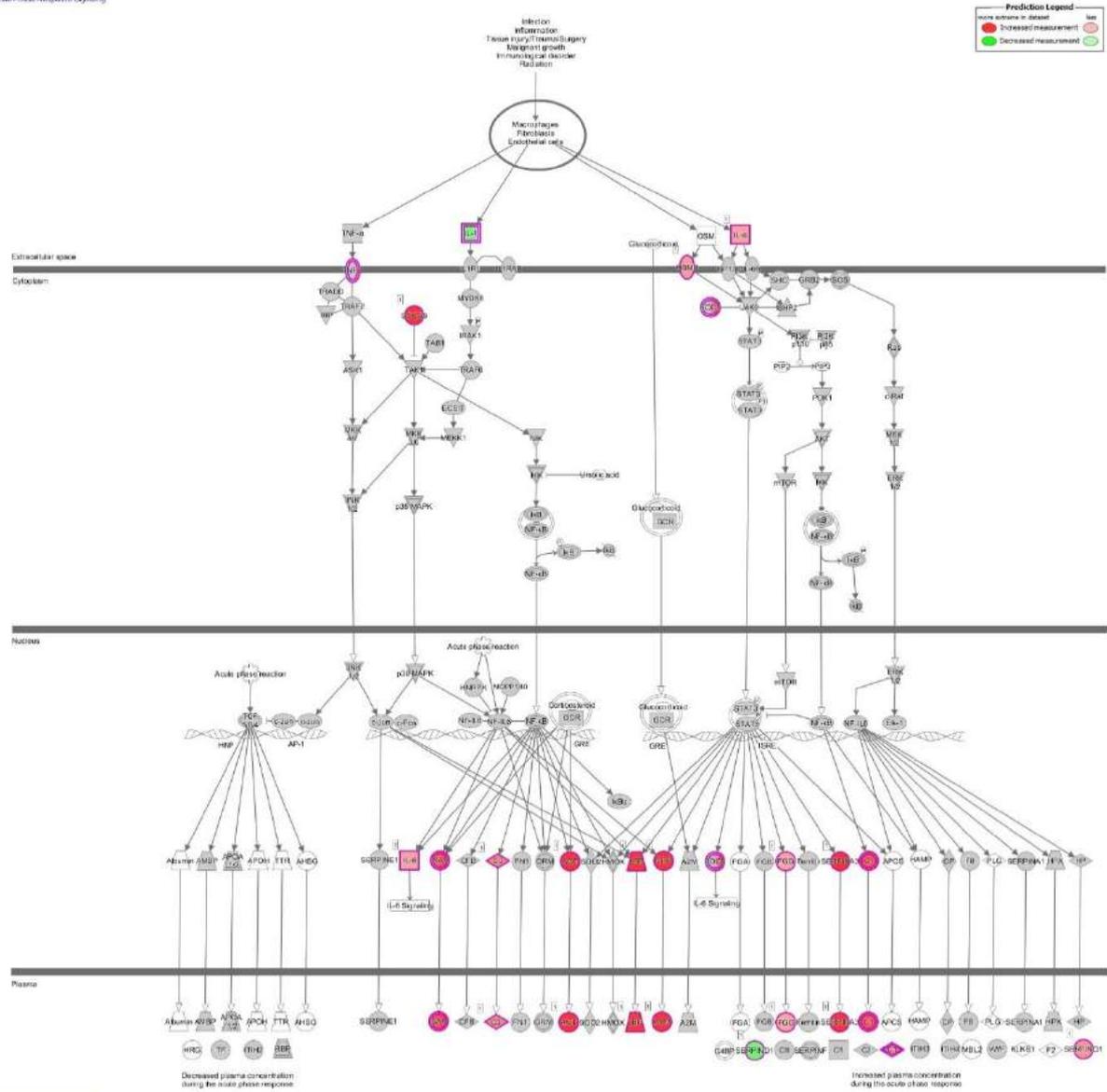
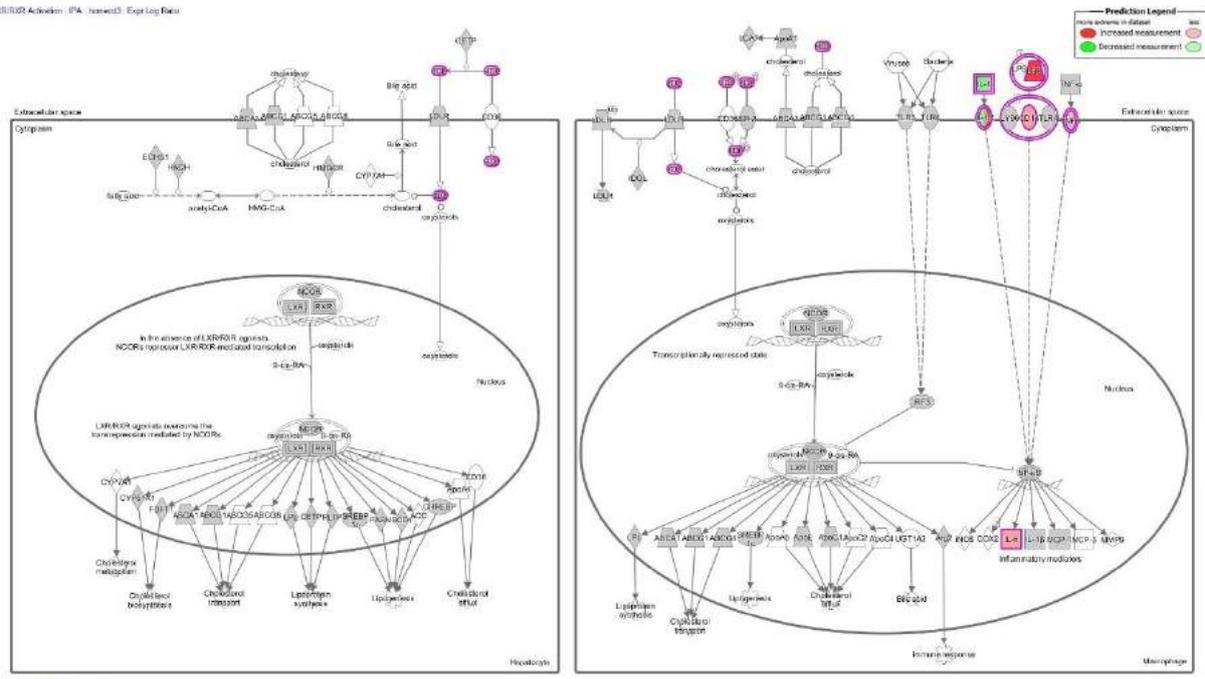
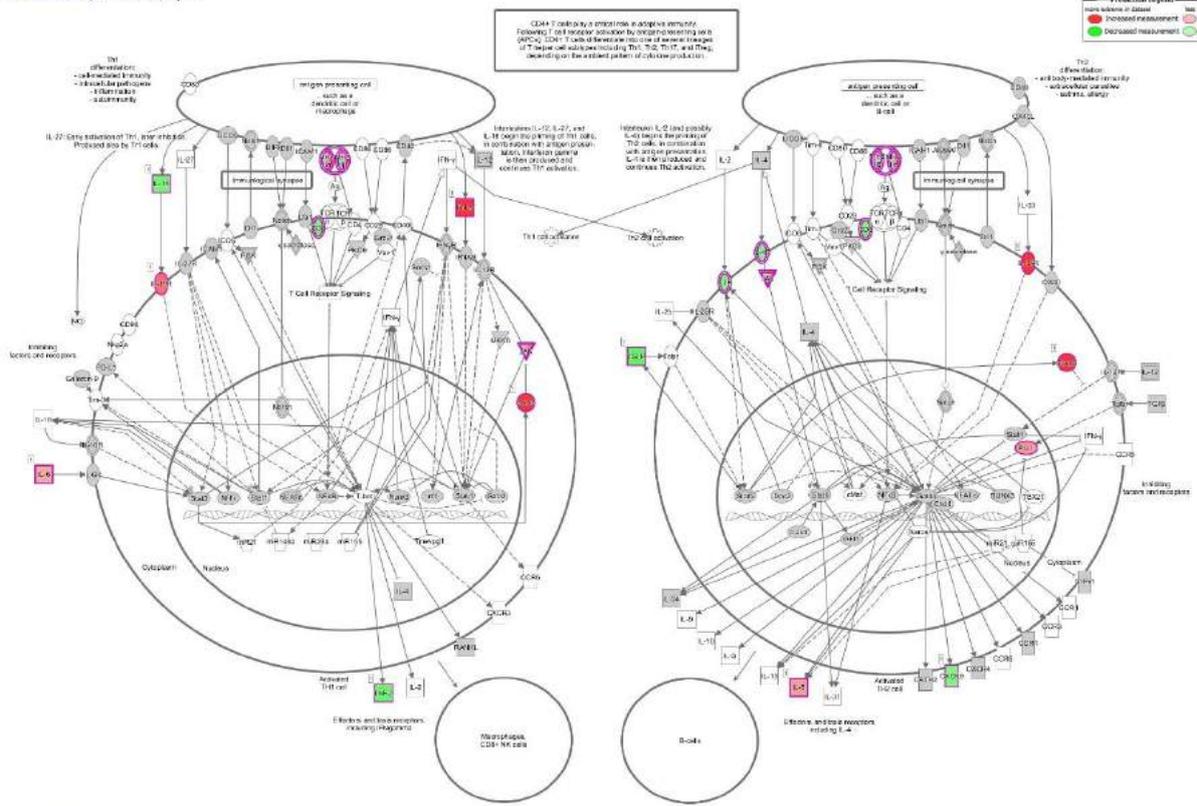


Figure 28 - IPA Analysis : Schematic representation of acute phase response pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in acute phase response signalling after IL-6 treatment for 72 hours.



9/28/2010 10:58:41 AM (GMT+08:00)

Figure 29 - IPA Analysis : Schematic representation of LXR/RXR activation pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in LXR/RXR response signalling after IL-6 treatment for 72 hours.



© 2006-2008 KEGG, EpiSig Res.

Figure 30 - IPA Analysis : Schematic representation of Th1 and Th2 activation pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in Th1 and Th2 activation signalling after IL-6 treatment for 72 hours.

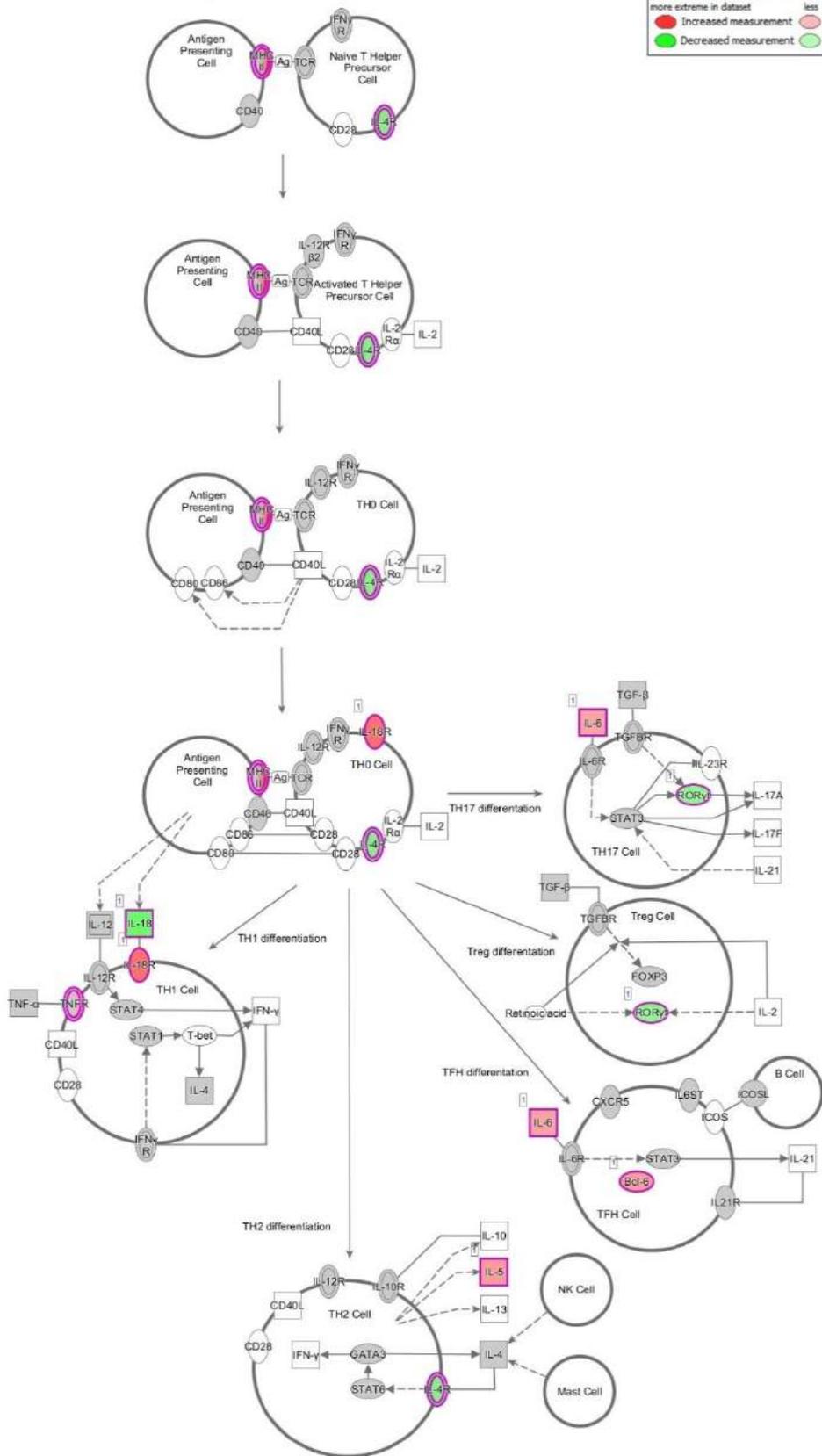


Figure 31- IPA Analysis : Schematic representation of T-helper-cell differentiation pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in T-helper-cell differentiation signalling after IL-6 treatment for 72 hours.

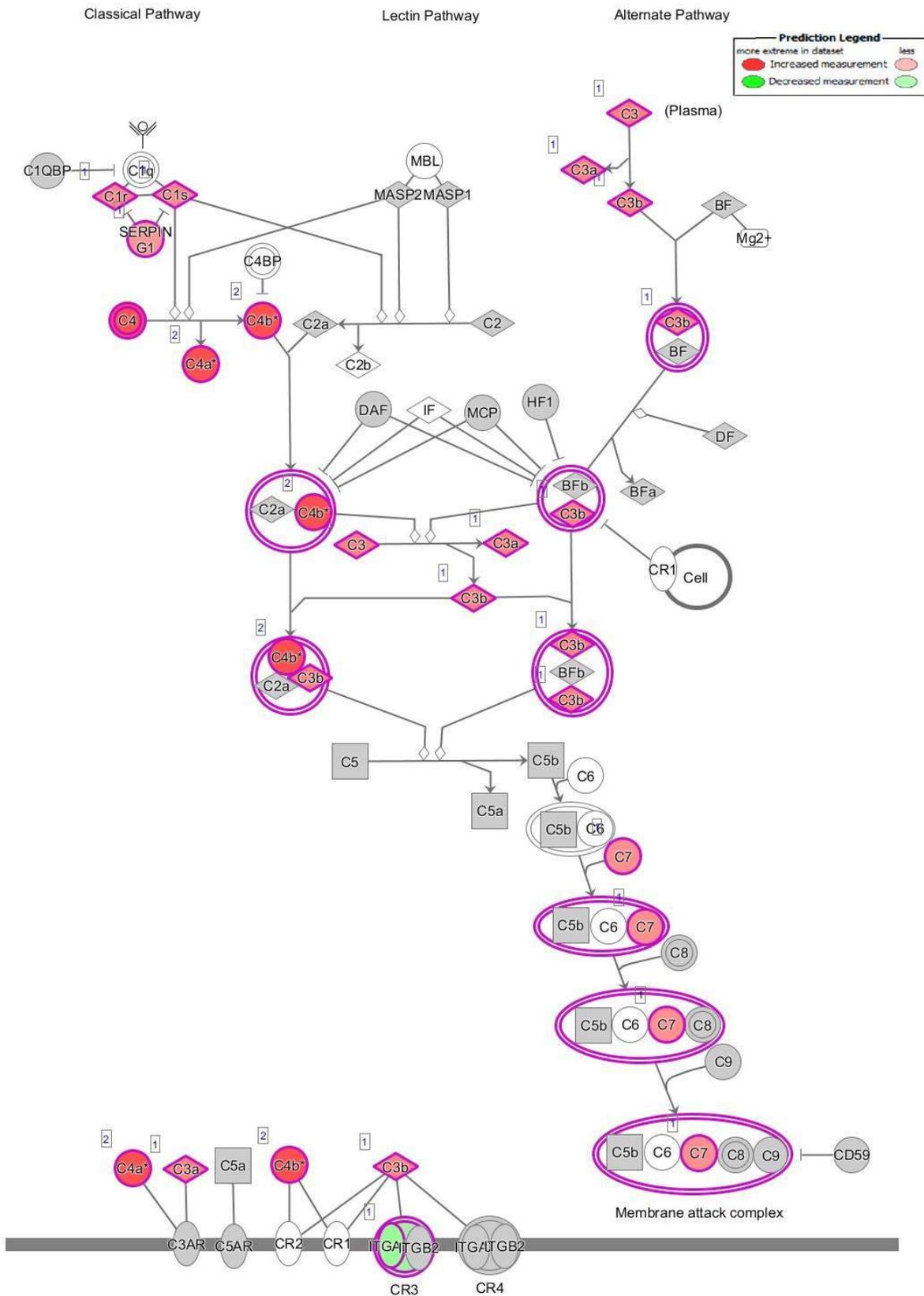


Figure 32 - IPA Analysis : Schematic representation of complement system pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in complement system signalling after IL-6 treatment for 72 hours.

IL-10 Signaling : IPA - hcmecd3 : Expr Log Ratio

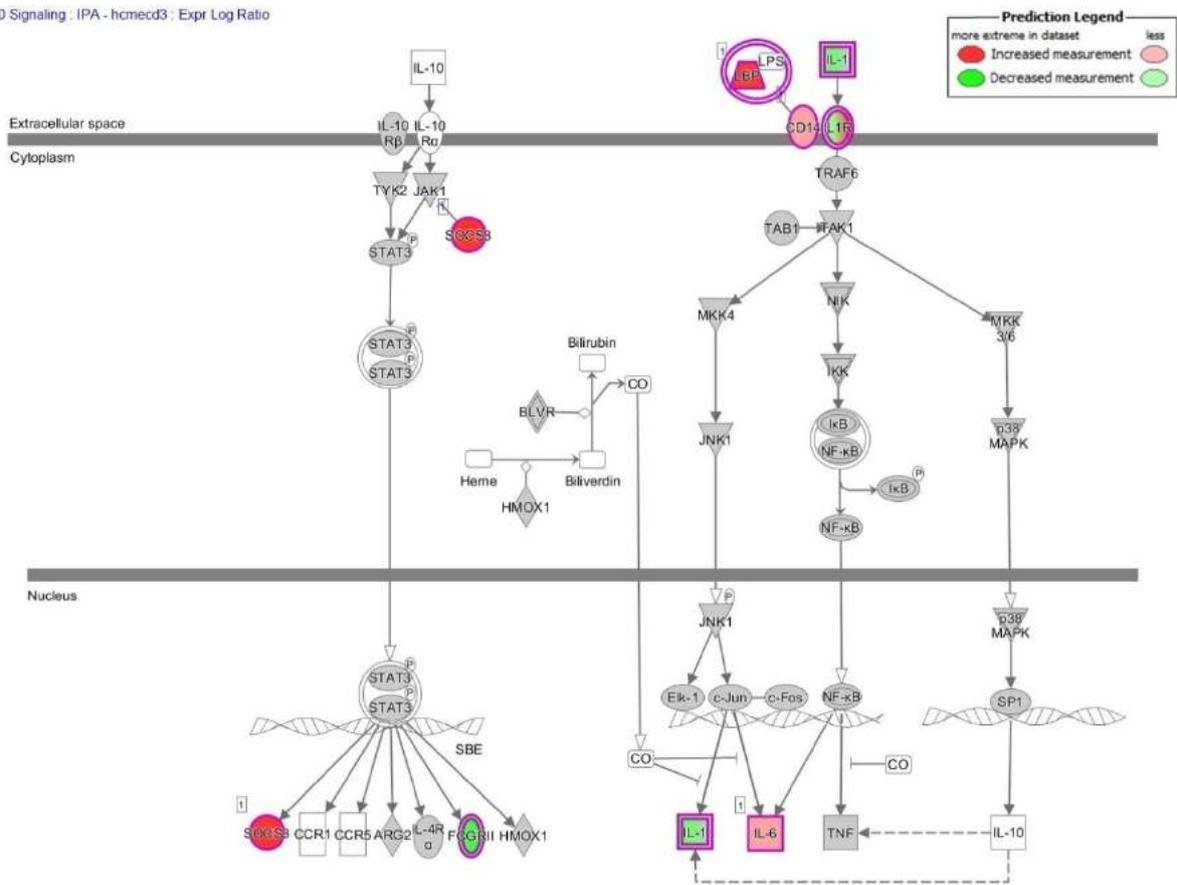


Figure 33 - IPA Analysis : Schematic representation of IL-10 signalling pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in IL-10 signalling after IL-6 treatment for 72 hours.

CD4+ T cells play a critical role in adaptive immunity. Following T cell receptor activation by antigen-presenting cells (APCs), CD4+ T cells differentiate into one of several lineages of T helper cell subtypes including Th1, Th2, Th17, and iTreg, depending on the ambient pattern of cytokine production.

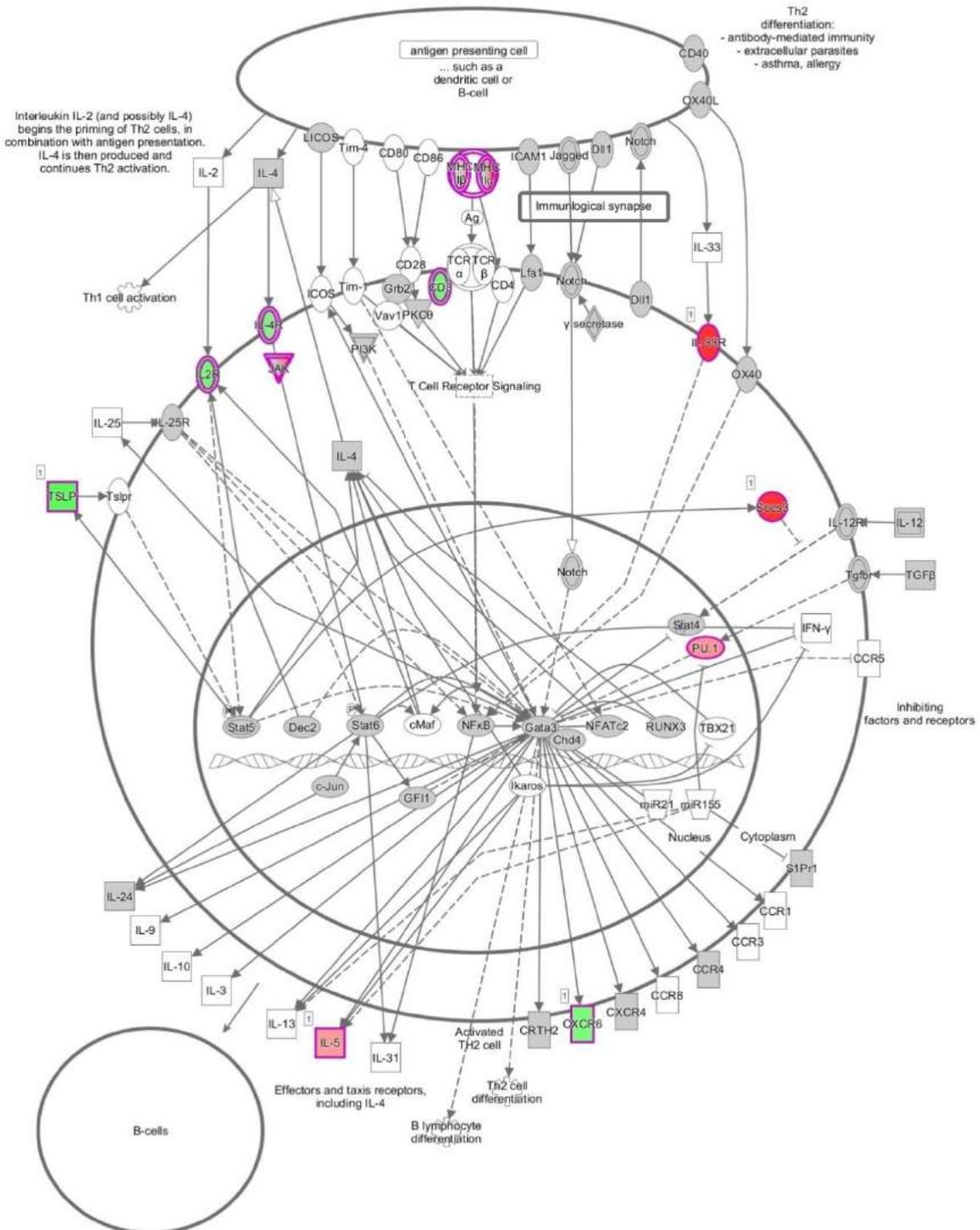
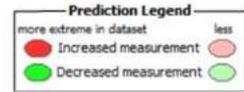
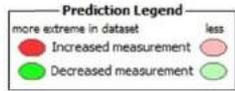


Figure 34 - IPA Analysis : Schematic representation of Th2 pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in Th2 signalling after IL-6 treatment for 72 hours.





CD4+ T cells play a critical role in adaptive immunity. Following T cell receptor activation by antigen-presenting cells (APCs), CD4+ T cells differentiate into one of several lineages of T helper cell subtypes including Th1, Th2, Th17, and iTreg, depending on the ambient pattern of cytokine production.

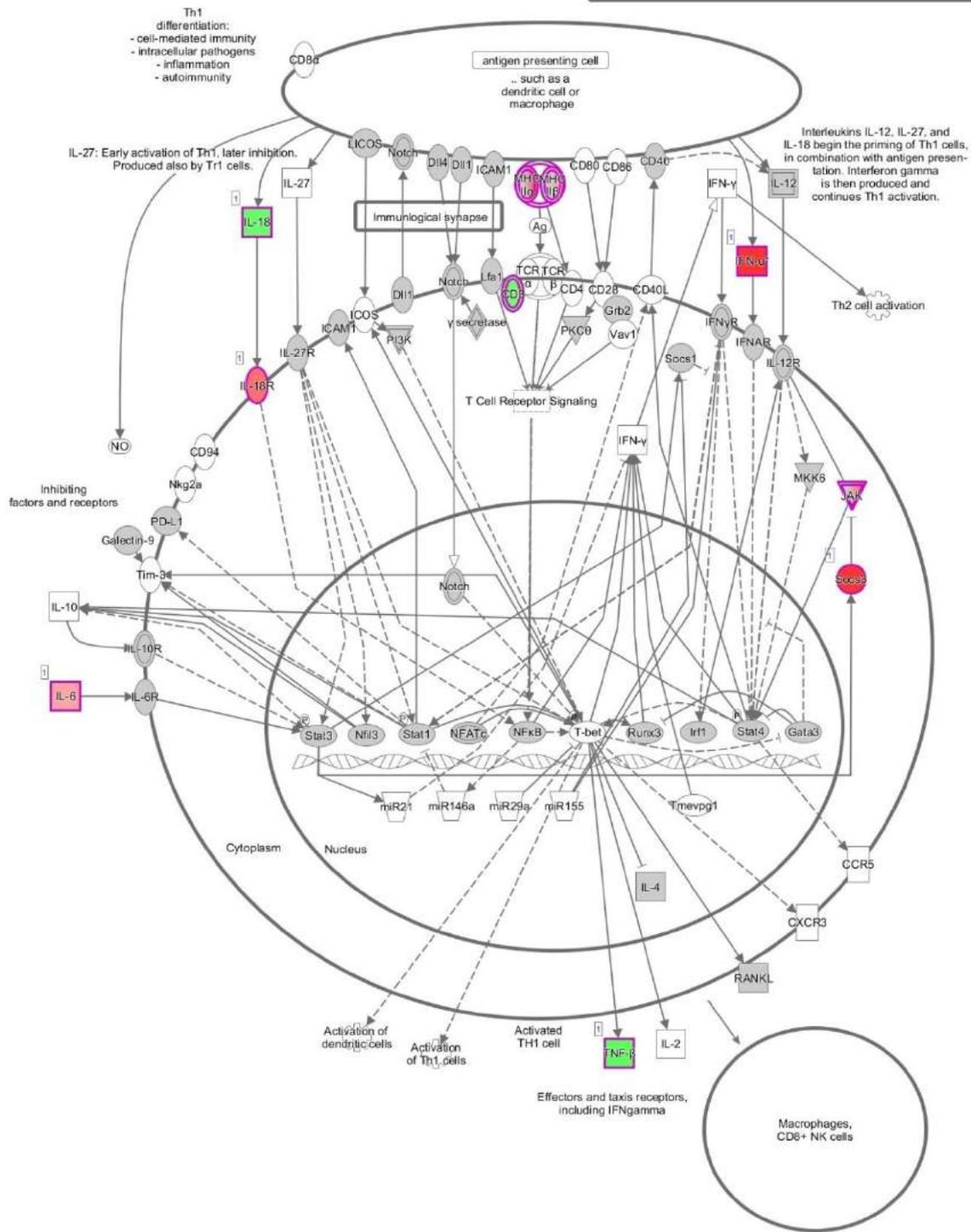
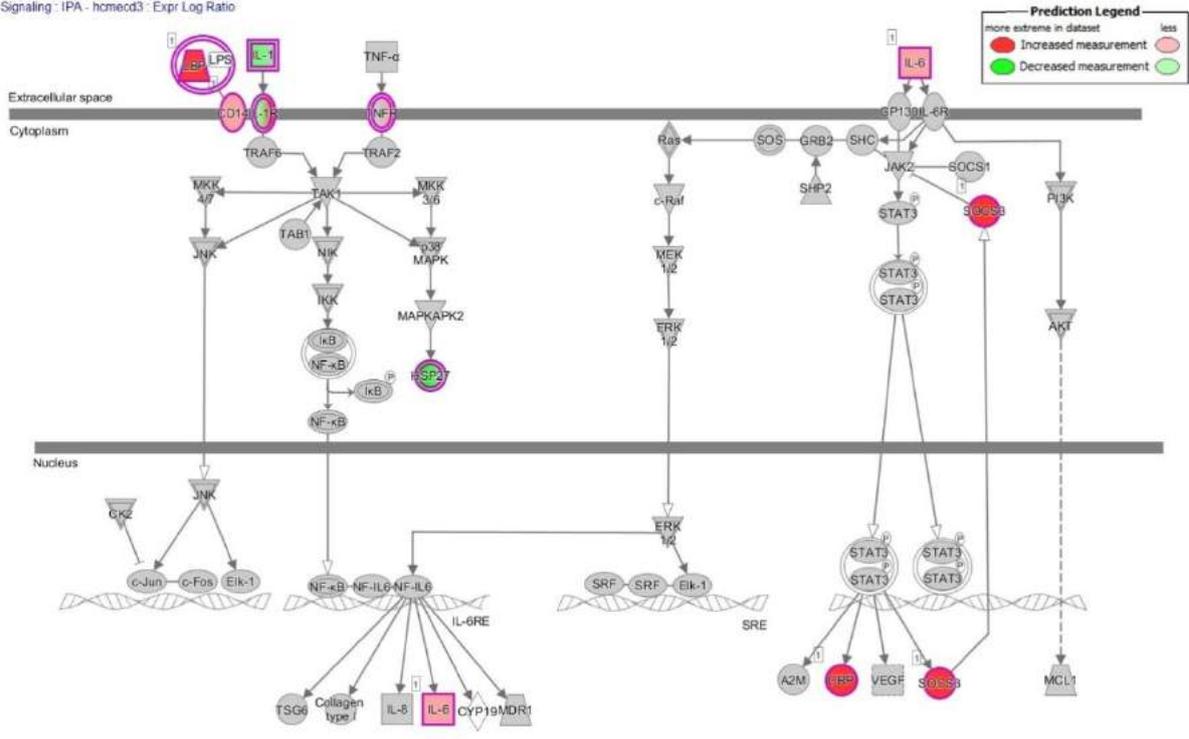


Figure 36 – IPA Analysis : Schematic representation of Th1 pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in Th1 signalling after IL-6 treatment for 72 hours.



© 2008-2020 QIAGEN. All rights reserved.

Figure 37 - IPA Analysis : Schematic representation of IL-6 signaling pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in IL-6 signalling after IL-6 treatment for 72 hours.



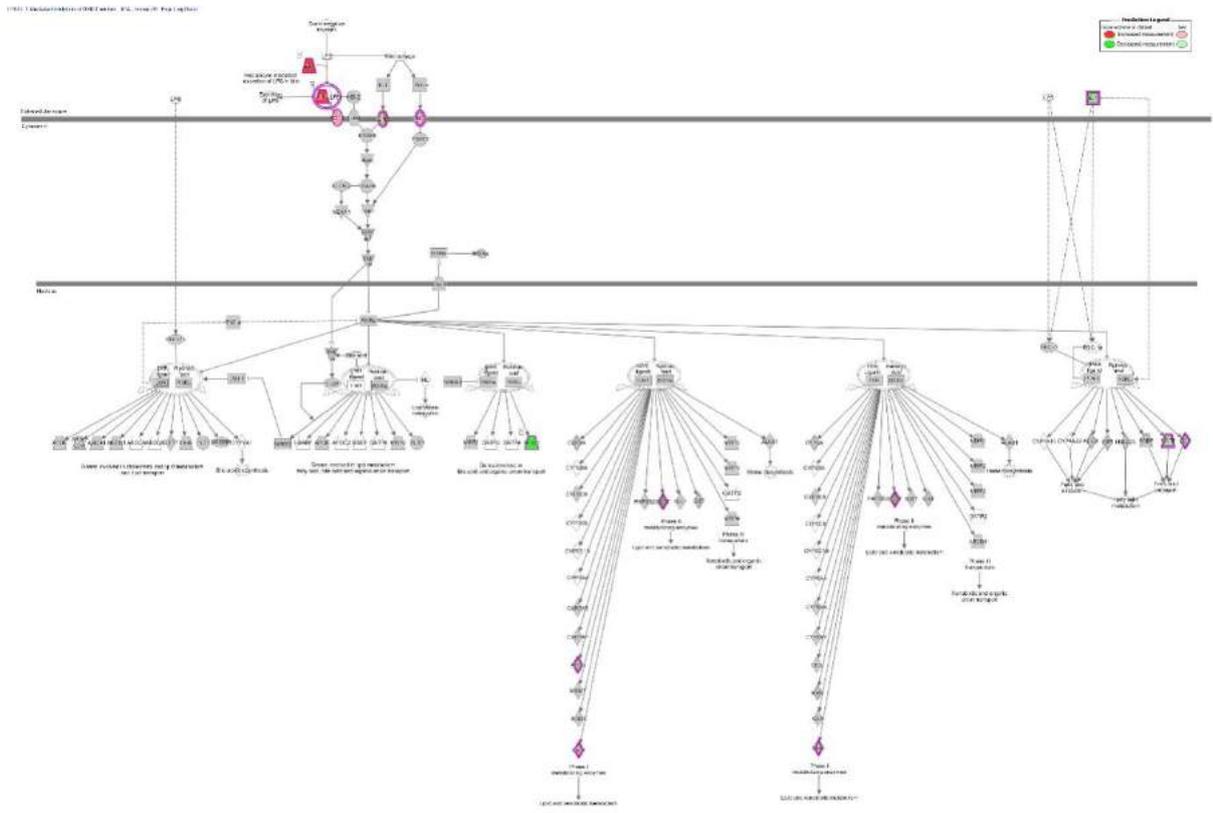


Figure 39 - IPA Analysis : Schematic representation of LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function pathway. IPA analysis revealed changes in the expression of proteins involved in LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function signalling after IL-6 treatment for 72 hours.

Chapitre 4 : Prédiction de l'impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique de substrats des CYP2C19 et -3A4 par modélisation

## Résumé

Les résultats du travail de l'article 1 ainsi que différents travaux *in vitro* issus de la littérature montrent que l'activité des CYPs, notamment celles du 2C19 et du 3A4, diminue après exposition à différentes cytokines. Des études cliniques confirment également ces observations. Néanmoins rares sont les travaux permettant de quantifier l'impact sur la pharmacocinétique de médicaments *in vivo*.

C'est dans cet optique qu'ont été développés les modèles PBPK de ce chapitre. La première partie du travail porte sur le CYP3A4. La relation avec le niveau de CRP a été construite puis validée à partir de données pharmacocinétiques du midazolam, un substrat du CYP3A4. La calibration s'est faite en utilisant les simulations de profils de midazolam pour différents niveaux de CRP issus d'une étude de PK de population. La relation fut ensuite validée avec des données cliniques d'une autre étude pharmacocinétique du midazolam.

Dans un 2<sup>ème</sup> temps, nous avons cherché à relier le niveau de CRP avec l'activité du CYP2C19. Pour cela nous avons utilisé des données cliniques de voriconazole, substrat du CYP2C19 et du 3A4. La grande hétérogénéité des données utilisées, liée aux différents génotypes du CYP2C19, aux différentes voies d'administration ainsi qu'aux différents niveaux de CRP, nous a conduit à utiliser une approche de population pour la calibration de l'effet sur ce CYP. La relation avec le CYP3A4 préalablement développée avec le midazolam a été conservée. L'effet des génotypes sur l'activité du CYP2C19 ainsi que les interactions avec des co-traitements étaient pris en compte par des relations issues de modèles physiologiques statiques [179]. Le modèle a ensuite été validé par des données cliniques issues de la littérature. Pour la validation du modèle, en l'absence d'information sur la répartition des fréquences des génotypes, des simulations répétées avec tirages au sort dans des lois de Dirichlet ont été effectués. Enfin dans une dernière étape, ces deux relations ont été validées grâce à des données d'oméprazole également substrat des deux CYPs. Chacune des deux relations aura donc été validée avec au moins un 2<sup>ème</sup> substrat.

Cet article va être soumis pour faire l'objet d'une publication.

**Modelling approach to predict the inflammation impact on CYP2C19 and -3A4 substrates pharmacokinetics**

Florian Simon<sup>a,b</sup>, Elodie Gautier-Veyret<sup>c</sup>, MaryloreChenel<sup>d</sup>, Léa Payen<sup>b</sup>, Françoise Stanke-Labesque<sup>c</sup> and Michel Tod<sup>a</sup>

a : EA3738, Faculté de médecine de Lyon-Sud, Université de Lyon 1, Oullins (France)

b : Laboratoire de biochimie-toxicologie, Centre hospitalier Lyon-Sud, Hospices civils de Lyon, Pierre Bénite (France);

c : Laboratoire de Pharmacologie, Pharmacogenetique et Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire des Alpes, Grenoble 38043, France;

d : Institut de recherches internationales Servier, Direction of clinical PK and pharmacometrics, Suresnes, France

Corresponding author informations:

F. SIMON, address: 165 chemin du Grand Revoyet, Faculté de médecine et maïeutique, 69921 Oullins cedex, Université de Lyon 1, tel: 0426235953, fax: 0426235976, e-mail: fsimon.p5@gmail.com

Key words: Inflammation – CYP3A4 – CYP2C19 – PBPK

## Introduction

Systemic inflammation is known to impact drugs pharmacokinetics (PK) by different ways such as impairing their metabolism and elimination[180]. Indeed, pro-inflammatory cytokines lead to repression of drug-metabolizing enzymes (DME) for instance cytochromes P450 (CYPs) [181]. Cytokines level have been found elevated in several diseases such as rheumatoid arthritis, cancer or autoimmune diseases [182, 183]. *In vitro* studies on hepatic and intestinal cell lines highlighted decreases of CYPs mRNA expression, protein expression and metabolic activities after exposure to different cytokines such as interleukine(IL)-6[19, 33, 184]. CYP2C19 and -3A4, majors DMEs, were strongly impacted either in intestinal and hepatic models.

C-reactive protein (CRP) is an acute inflammatory protein synthesized by hepatocytes, then secreted in plasma and normally found at concentration less than 10 mg/L. Its production is mainly regulated by IL-6 and its concentration is commonly measured in clinical assays, more than other cytokines.

Significant differences of PK profiles have been highlighted by clinical studies between patients with high or low systemic inflammation level. For example, two studies on rheumatoid patients have shown simvastatin AUC (a CYP3A4 substrate) decrease by 57% and 43% after anti-interleukin(IL)-6 antibodies administration (sarilumab and tocilizumab), meaning anti-IL6 reversed CYP repression and restored simvastatin metabolism [71, 72]. A retrospective study on 128 patients taking voriconazole showed a significant correlation between trough concentration and CRP level [185]. CYP2C19 genetic polymorphism have also been well established as a source of PK variability and may influence the impact of inflammatory response [186]. These drug disposition modifications could have clinical consequences and require dosing rate adaptations. These modifications should be anticipated during drug development in order to refine patients selection in clinical studies and/or prescribing information.

Physiologically based PK (PBPK) models have been increasingly used in drug development and encouraged by regulatory agencies during the last decade. They distinguish drug-related and system-related parameters and allow to simulate PK under a range of clinical conditions by a bottom-up approach. Several models have been developed to predict the impact of IL6 on CYPs probe substrates and interactions with anti-IL6 monoclonal antibody administration [159, 160]. They all used prior *in vitro* results to predict this impact, while quantitative extrapolation of *in vitro* results have been questioned because of the parameters uncertainty [187]. Using models derived from clinical data (a top-down approach) combined with the bottom-up approach may improve the robustness of the predictions.

The objectives of the study were to use CRP level as inflammatory response biomarker and, by a combined bottom-up and top-down approach, to quantify the impact on CYP3A4 and CYP2C19 activities in order to predict PK profiles of their substrates. We used midazolam (a pure CYP3A4 substrate), voriconazole and omeprazole (which are both substrates of CYP3A4 and CYP2C19) as probe drugs.

## Methods

### 1) Global strategy

First, we estimated and validated a CRP level-CY3A4 activity relation by a PBPK approach using midazolam clinical data. Then, a population analysis of voriconazole pharmacokinetics was carried out to estimate a relation between CRP level and CYP2C19 activity, while taking into account the previous relation with CYP3A4 activity. This new relation was validated with voriconazole data from Veringa et al. by PBPK modeling. Finally, we used data from Zhuang et al. to validate the two relations on omeprazole, another drugsubstrate of both CYPs. The workflow of models development is presented in Fig.1. Characteristics of the different studies used are summarized in Table-1.

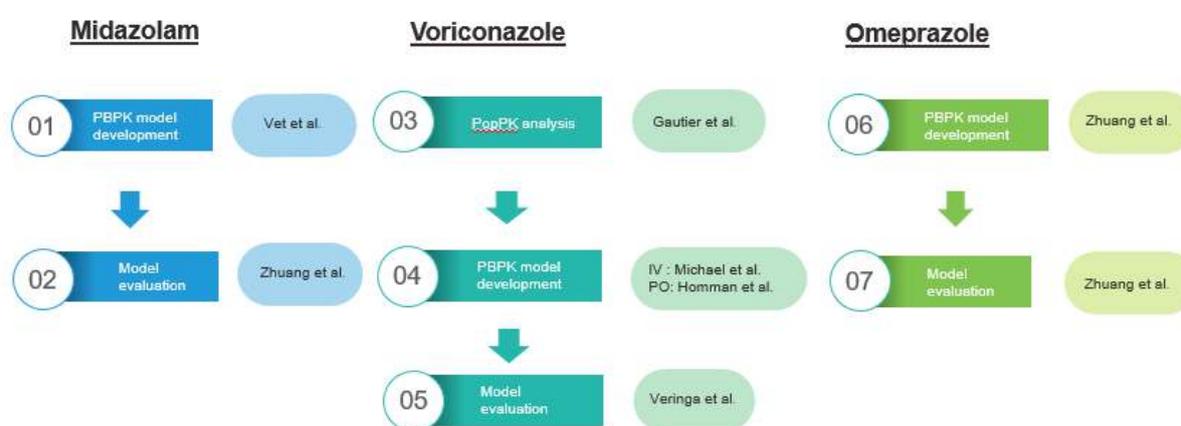


Figure 1 - General workflow and datasets used to models development and evaluation

For each molecule, PBPK model development followed Peters et al. framework [156]: first, using intravenous data, clearance was adjusted to match simulated and observed AUC. Then, distribution coefficients were optimized in order to match simulated and observed lineshapes. Finally oral data were used to optimise absorption parameters.

Midazolam, voriconazole and omeprazole metabolized fraction (fm) by each CYPs were taken from [www.ddi-predictor.org](http://www.ddi-predictor.org). These fms stand for the wild type genotype of the CYPs.

Tableau 1 - Clinical studies used for midazolam, omeprazole and voriconazole models development and evaluation

<b>Study</b>	Vet et al. [188]	Zhuang et al. [189]	Gautier et al. [186, 190]	Michael et al. [191]	Hohmann et al. [192]	Veringa et al. [193]
<b>Drug(s)</b>	Midazolam	Midazolam and	Voriconazole	Voriconazole	Voriconazole	Voriconazole

		omeprazole				
<b>Number of individual</b>	1	12	91	12	14	34
<b>Condition</b>	Critically ill children	Healthy	Hematological malignancies	Hematological malignancies (adults)	Healthy	Hematological malignancy (74%) Other (26%)
<b>Age</b>	NA	50.4 (9.2) IQR	68.3 (13.5) mean SD	44.2 (25-58) range	24-53	60 (40-66)
<b>Weight</b>	10	67.8 (8.7) IQR	49.6 (11.8) mean SD	79.8 (61-111) range	NA	79 (68-95)
<b>CYP2C19 genotypes</b>	NA	PM excluded	*1/*1 (39.5%) *1/*17 (33.1%) *17/*17 (5.1%) *2/*17 (1%) *1/*2 (20.7%) *2/*2 (0.6%)	NA	6 *1/*1 4 *1/*17 2 *17/*17 1 *2/*17 3 *1/*2	20 genotyping : 45% EM 25% UM 30% IM
<b>Route administration</b>	Infusion	Oral	IV (18%) Oral (82%)	IV	Oral	IV (73.5%) Oral (26.5%)
<b>Dose</b>	100 µg/kg/h	Midazolam : 0.03mg/kg Omeprazole : 20mg	215.6 mg (bi-daily)	Loading dose 6 mg/kg (bi-daily) Maintenance dose 4 mg/kg (bi-daily)	400 mg	2.85 mg/kg (bi-daily)
<b>DDI</b>	NA	0	Esomeprazole (44.3%)	Esomeprazole (100%)	NA	PPI (68%)

			Lansoprazole (46.8%) Methylprednisolone (17.5%) Prednisone/Prednisolone (4.46%)			
<b>Use</b>	Learning	Validation	Learning	Learning	Learning	Validation

PBPK models were built using PK-sim 8.0. Drug-drug interactions (DDI), fractional activities (FAs) for each CYP2C19 genotype and relationships between CRP concentrations and CYPs metabolic clearances were processed with Mobi 8.0. Repeated population simulations that include sampling of CYP2C19 genotypes in their distribution were performed with the OSPsuite-R package. Tissue expression distribution of enzymes was provided by the PK-Sim® expression database based on reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) profiles, with the reference value of 4.32 µmol CYP3A4 and 0.76 µmol CYP2C19 per liter of liver tissue. Population PK (Pop PK) analysis was performed using NONMEM 7.4. PsN was used for model running, Xpose and Pirana for post-processing analysis. Concentration-time profiles or concentration-CRP graphs from the different studies were digitized using webplotdigitizer[194].

## 2) Modelsdevelopment

### i. **Midazolam**

#### a. Description of available PK data

Learning data: Vet et al (13) collected midazolam plasma concentrations from 83 critically ill children [188]. They developed a population pharmacokinetic model to study the impact of inflammation on its PK and CRP level was a significant covariate of drug clearance. Concentration-time profiles were simulated for four CRP concentrations of 10, 30, 100 and 300 mg/L, after a continuous midazolam infusion of 100 µg/kg/h for a typical individual of 10 kg.

Validation data: To validate the PBPK model, we used data obtained from the sirukumab clinical cocktail TP-DI study [189], which was an open-label phase 1 study, including 12 patients who had a diagnosis of rheumatoid arthritis. Patients received an oral cocktail of CYP probe substrates consisting

of 0.03 mg/kg midazolam, 10 mg warfarin (plus 10 mg vitamin K), 20 mg omeprazole, and 100 mg caffeine at 1 week prior to (day 1) and 3 weeks after (day 29) a single subcutaneous dose of 300 mg sirukumab. The mean serum CRP level was 25.3 mg/L on day 1 and 0.5 mg/L on day 29. Plasma concentration versus time and PK parameters were described as geometric mean and standard deviation (SD).

#### b. Model development

The PBPK model was developed with a stepwise strategy. First, we used physico-chemical (PC) and ADME properties from Hanke et al. [195] to build our model, then simulated a concentration-time profile for a 10 kg individual after a continuous midazolam infusion of 100 µg/kg/h and compared to the one from Vet et al. [188] with a CRP concentration of 10 mg/L. No clearance and distribution parameters adaptation were needed to match curves lineshape.

The metabolism of midazolam was described using Michaelis–Menten kinetics. Severity of inflammation was related to CYP3A4 metabolic activity by including a factor,  $k_{crp}$ , on midazolam-metabolite formation equation rate (Eq.1-2) :

$$\frac{dN}{dt} = k_{crp} * \frac{k_{cat} * [MDZ]}{K_m + [MDZ]} \quad (1)$$

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[CYP3A4]} \quad (2)$$

$dN/dt$ : metabolite formation rate (µmol/min);  $[MDZ]$ : midazolam concentration (µM);  $K_m$ : Michaelis-Menten constant (µM);  $V_{max}$ : maximal velocity (µM/min)

$k_{crp_{3A4}}$  value as a function of CRP concentration was estimated by fitting the four midazolam concentration versus time profiles with CRP concentrations of 10, 30, 100 and 300 mg/L. The four  $k_{crp_{3A4}}$  values (Figure) allowed us to relate  $k_{crp_{3A4}}$  with CRP concentration by non linear regression (Eq.3):

$$k_{crp_{3A4}} = A_{3A4} + (1 - A_{3A4}) * e^{-\frac{\ln 2}{\alpha_{3A4}} * [CRP]} \quad (3)$$

where  $A_{3A4}$  was to be estimated in the range [0,1] and  $\alpha$  is the CRP concentration corresponding to half the maximal decrease of  $k_{crp}$ .

### c. Model evaluation

Zhuang et al. population mean CRP levels at day 1 and 29 were used in Eq.3 to perform simulations on a 12 patients population with PKSim. Information on age, body weight, and proportion of female participants were integrated into the software for the virtual population creation. A visual check was applied to evaluate the predictive accuracy of the PBPK model by comparing its prediction to the observed concentration-time profiles.

## ii. Voriconazole

### a. Description of available PK data

Learning data: Three sources of data were combined. First, PK data from 91 hematological patients recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation were used [186, 190]. Patients receive IV or oral administration of voriconazole twice daily. Plasma samples were drawn 12 hours post-dose at steady-state, 314 trough concentrations were collected. The steady state was reached after six doses (200 mg) if patient received two loading doses (400 mg) or after ten doses in the absence of loading dose. CRP levels were measured. CYP2C19 genotyping was performed. Proton pump inhibitors (PPIs) were administered to 91% of patients and glucocorticoids to 22.9%.

Next, IV data from Michael et al. [191] and PO data from Hommann et al. [192] were used to build a PBPK model and optimize distribution related parameters (lipophilicity and partition coefficient calculation method) and absorption parameters of voriconazole, without information on CRP levels.

Validation data: to validate the CRP-CYP2C19 activity relation, we used data from a prospective study on 34 patients, among who 75% had haematological malignancies, treated with IV or oral voriconazole [193]. 489 voriconazole trough concentrations were drawn at steady-state. Steady-state was assumed to be achieved within 24 h after administration of two loading doses of voriconazole or after 10 doses if no loading dose was given. A loading dose was defined as two intravenous doses of 6 mg/kg or two oral doses of 400 mg on the first day, followed by an intravenous dose of 4 mg/kg or an oral dose of 200 mg twice daily. Data were splitted in four CRP groups: 0-50, 50-100, 100-150 and >150 mg/L. CYP2C19 genotype was available. Proton pump inhibitors were administered to 68% of patients.

b. Model development

- PopPK analysis to estimate CYPs elimination and inflammatory impact on CYP2C19

The structural model was built using a set of differential equations that were solved with the ADVAN13 subroutine of NONMEM. Pharmacokinetic model building was conducted in a sequential manner; the base model was the model previously developed by Dolton et al.[196]. This is a two-compartment model, with a single saturable elimination pathway, and several covariates on the elimination rate: CYP2C19 genotype, inducing effect of glucocorticoids, type of subject (healthy versus patient with proven or suspected fungal infection). We refined this model in several ways. A second non-linear elimination pathway was added in order to describe separately the elimination by CYP2C19 and CYP3A4. The fraction metabolized by each CYP (fm), were fixed respectively to 0.68 and 0.31 [197] while the ratio between  $K_{m_{2C19}}$  and  $K_{m_{3A4}}$  was fixed to 4.29 [198]. A CYP2C19 fractional activity (FA) with respect to the reference genotype was assigned to each genotype (Table-2) [179]. DDI with proton pump inhibitors and glucocorticoids were taken into account using inhibition (IR) [197] and induction (IC) potency factors [196] on both CYPs clearances (Table-2).

*Tableau 2 - Covariate voriconazole population model*

<b>Parameter</b>	<b>Value</b>
FA - CYP2C19 *1/*1	1
FA - CYP2C19 *1/*17	1.59
FA - CYP2C19 *17/*17	2.03
FA - CYP2C19 *1/*2	0.3
FA - CYP2C19 *2/*17	0.8
FA - CYP2C19 *2/*2	0.005
Esomeprazole – IR <sub>CYP2C19</sub>	0.6
Esomeprazole – IR <sub>CYP3A4</sub>	0.33
Lansoprazole – IR <sub>CYP2C19</sub>	0.26
Methylprednisolone – IC	0.564
Prednisone/Prednisolone – IC	0.366

The relation between CRP concentration and CYP3A4 was provided from our previous work on midazolam,  $V_{max_{3A4}}$  was multiplied by  $k_{crp_{3A4}}$  determined in the midazolam study above.

CYP2C19 activity was related to CRP by multiplying  $V_{max_{2C19}}$  by  $k_{crp_{2C19}}$ :

$$k_{crp_{2C19}} = A_{2C19} + (1 - A_{2C19}) * e^{-\frac{\ln 2}{\alpha_{2C19}} * [CRP]} \quad (4)$$

where  $A_{2C19}$  and  $\alpha_{2C19}$  were estimated.  $V_{max_{2C19}}$  and  $K_{m_{2C19}}$  inter-individual variability (IIV) were described by an exponential model and the residual error by a combined proportional and additive error model.

This refined model was fitted to the learning data in order to estimate the typical value of  $V_{m_{2C19}}$ ,  $K_{m_{2C19}}$ ,  $k_{crp_{2C19}}$ ,  $\alpha_{2C19}$ , the interindividual variabilities of  $V_{m_{2C19}}$  and  $K_{m_{2C19}}$ , and the proportional residual error variance. PopPK model evaluation was based on the objective function value (OFV) and the fold errors (= predicted (PRED) to observed concentration ratio) of the model.

- PBPK model building

PBPK model was developed using  $V_{max}$  and  $K_m$  estimated by our previous PopPK analysis. Then,  $K_m$  was converted from total concentration in mg/L to free molar concentration, because our PopPK model considered total concentration while PBPK model considered the intracellular unbound concentration.  $V_{max}$  was also converted from mass to molar rate and weighted by the amount of CYP in the intracellular liver compartment ( $CYP_{2C19}=1.074 \mu\text{mol}$  and  $CYP_{3A4}=6.011 \mu\text{mol}$ ). IV data [191] were then used to adjust lipophilicity, and per os data [192] to adjust the absorption parameters.

### c. Model evaluation

OSP-suite R package was used to validate the relation between CRP and CYP2C19 activity, using voriconazole trough concentration from Veringa et al. [193] that was split into four CRP concentration groups: 0-50, 50-100, 100-150 and >150 mg/L. We performed repeated simulations on a virtual population of 200 patients, with CRP level arising from a uniform law between the limit values of each group. Information on age, body weight, and proportion of female participants were integrated in the virtual population. In Veringa's study, CYP2C19 genotypes were only determined for 20 out of 34 patients and could not be used in our simulation. So for each of the 200 fictive individual, a genotype was sampled from a Dirichlet law with characteristics corresponding to CYP2C19 genotype frequencies in the caucasian population [199, 200]. The median trough concentration at steady-state was computed for each of the 4 CRP groups. Random draw in the Dirichlet law and population simulation were repeated 50 times, to account for the variability in genotype distribution. 73.5% of voriconazole administrations were by IV and 26.5% by oral route. Since a combination of different

administration routes in a single population is not allowed in PK-sim, we performed separated simulations for each route and weighted the results. The 25th, 50th and 75th percentile of the 50 simulated median trough concentration at steady-state were compared to those of Veringa et al. [193] for each CRP group.

### iii. Omeprazole

#### a. Description of available PK data

Omeprazole PBPK model was built and relations between CRP and both CYPs were validated using data from Zhuang et al. study [189].

#### b. Model development

Clearance and absorption parameters were adjusted with data from day 29 (CRP = 0.5 mg/L). Omeprazole  $V_{max_{2C19}}$  and  $V_{max_{3A4}}$  optimization took into account their respective fm 0.84 and 0.11.

#### c. Model evaluation

OSP-suite R package was used to performe the population simulations. In Zhuang study, poor-metabolizers had been excluded but CYP2C19 genotypes repartition was otherwise unknown. As before, we sampled frequencies of CYP2C19 genotype in a Dirichlet law correponding to a caucasian population [199, 200], without \*2-3/\*2-3 genotypes. In a population of 12 patients, genotypes and corresponding FA were assigned to the relevant number of patients according to the random draw result. After each single population simulation, the mean time-concentration profile and mean PK parameters ( $C_{max}$  and  $AUC_{inf}$ ) were computed. Genotype random draw and population simulation were repeated 50 times. These whole steps were completed with CRP concentrations of 25.3 mg/L and 0.5 mg/L. The median PK profiles and PK parameters of the 50 simulated means were compared to the observed means from Zhuang et al. [189].

## Simulations

To investigate the impact of CRP level on midazolam PK, simulations were performed on 12 virtual patients with CRP levels of 0.5, 50, 100, 200 and 300 mg/L. Fold-changes of AUC<sub>inf</sub> and C<sub>max</sub> parameters were computed for the different CRP levels against the reference group (CRP = 0.5 mg/L).

The impact of CYP2C19 genotype on the interaction between CRP level and omeprazole was studied by performing simulations on 12 virtual patients with CRP concentration of 50, 100, 200 and 300 mg/L for each genotype. Fold-changes of AUC<sub>inf</sub> and C<sub>max</sub> parameters were computed for the different CRP levels against the reference group (CRP = 0.5 mg/L and CYP2C19\*1\*1).

## Results

### Midazolam

The input parameters are listed in Table-3 and came from Hanke and al. [195].

Tableau 3 - Drug-dependent parameters of the final midazolam PBPK model

Parameter	Units	Value	Source
MW	g/mol	325.77	
pKa		6.15	[195]
Solubility (pH)	mg/L	49 (6.5)	[195]
logP		3.13	[195]
Fu	%	1.6	[195]
Specific intestinal permeability	cm/min	$2.3 \cdot 10^{-5}$	Optimized
Partition coefficients		Rodgers and Rowland	
Cellular permeabilities		PK-sim standard	
CYP3A4 $K_M$	$\mu\text{mol/L}$	2.73	[195]
CYP3A4 $k_{\text{cat}}$	1/min	13.0	[195]
GFR fraction		1	[195]
Formulation		Solution	

Simulated PK profile after an IV infusion of 100  $\mu\text{g/kg/h}$  in a 10 years old child is closed to the simulated one from Vet et al. with CRP level at 10 mg/L.  $k_{\text{crp}}$  was estimated for the different CRP levels, and the

relation between CRP level and  $k_{\text{crp}}$  is illustrated in (Fig.2):  $k_{\text{crp}} = 0.2 + 0.8 * e^{-\frac{\ln 2}{35} * [\text{CRP}]}$ .

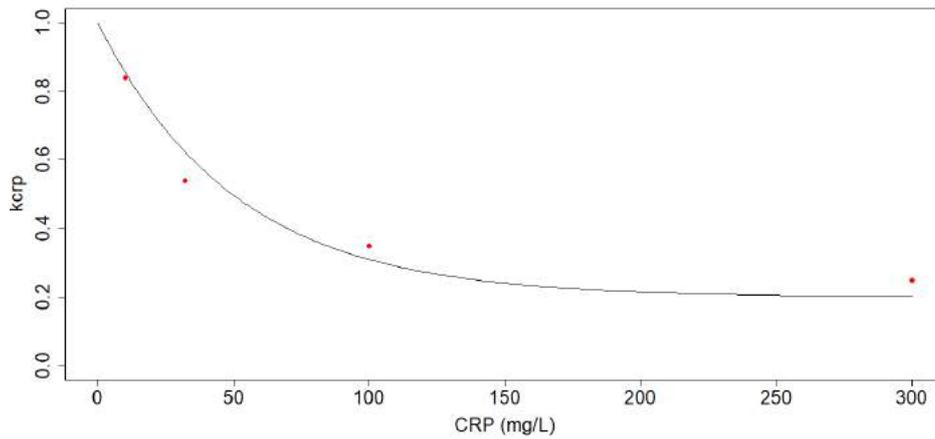


Figure 240 -  $k_{crp}$  estimation for four CRP levels (red points). Black line represents the simulated relation between  $k_{crp}$  and CRP (Eq.3).

Specific intestinal permeability was then optimized with data from day 29 (CRP 0.5 mg/L) to better fit the absorption. The optimal value was  $2.5 \cdot 10^{-5}$  cm/min. Simulations on a virtual 12 patients population were performed with the mean CRP levels of day 1 and day 29. The model seems to reasonably capture the impact of inflammation on CYP3A4 activity as shows the comparison between observed and predicted PK profiles for 25.3 mg/L (Fig.3-A) and 0.5 mg/L CRP concentration (Fig.3-B).

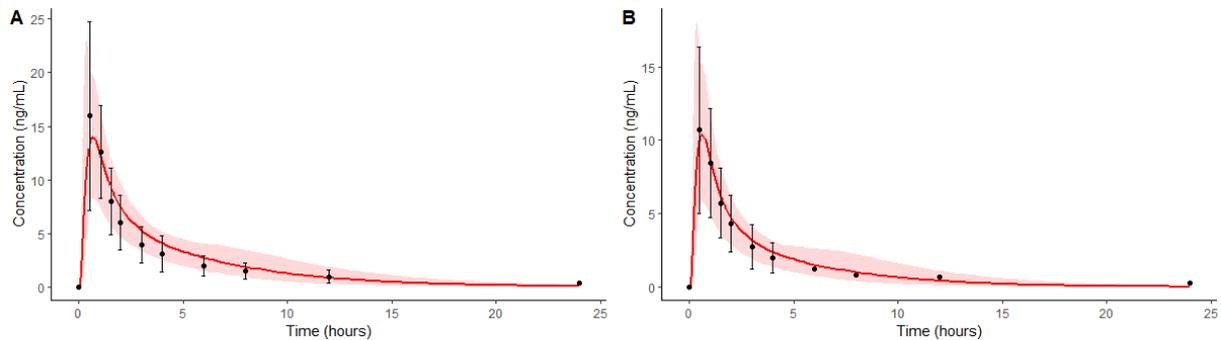


Figure 3 - Observed versus predicted midazolam plasma concentration profiles for 12 patients with a mean CRP level of 25.3 mg/L (A) and 0.5 mg/L (B). Black symbols represent observed mean  $\pm$  standard deviation (SD). Predicted mean population are shown as red lines and the shade areas correspond to the 90% population prediction interval.

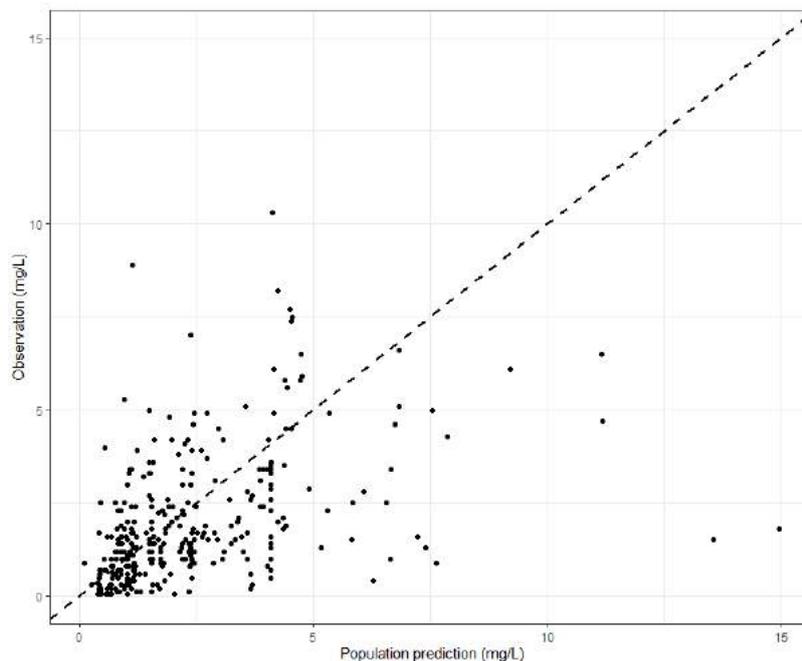
## Voriconazole

A two-compartment pharmacokinetic model with first-order oral absorption and two parallel Michaelis–Menten elimination adequately described the dataset. Structural parameters, e. g.  $V_{max_{CYP2C19}}$ ,  $K_{M_{CYP219}}$ ,  $k_{crp_0}$  and  $\alpha$ , IIV of  $V_{max_{CYP2C19}}$  and  $K_{M_{CYP219}}$ , and residual variability were estimated, all other parameters values were fixed regarding Dolton et al. model [196]. Parameter estimates and associated standard errors for the final model are shown in supplemental table 1.

Parameter (unit)	Value	Precision (RSE%)	Source
<u>Structural model</u>			
$k_a$ ( $h^{-1}$ )	0.53	Fixed	[196]
F	0.942	Fixed	[196]
$V_c$ (L)	27.1	Fixed	[196]
$V_p$ (L)	127	Fixed	[196]
Q (L/h)	35.1	Fixed	[196]
$V_{max_{CYP2C19}}$ (mg/h)	65.6	5.35	
$K_{MCYP2C19}$ (mg/L)	7.21	8.66	
$k_{crp_0}$	0.641	8.69	
$\alpha$ (L/mg)	0.0282	3.90	
<u>IIV (CV%)</u>			
$k_a$	41.6	Fixed	[196]
F	36.7	Fixed	[196]
$V_c$	83.4	Fixed	[196]
$V_p$	38.1	Fixed	[196]
Q	37.4	Fixed	[196]
$V_{max_{CYP2C19}}$	36.2	33.8	
$K_{MCYP2C19}$	73.2	24.2	
<u>Residual variability</u>			
Additive (mg/L)	0.005	Fixed	[196]
Proportional (CV%)	30.9	38.3	

Supplemental table 1 – Voriconazole population model

Goodness-of-fit plots used throughout model development indicated acceptable model fit (Supplemental figure 1).



Supplemental figure 1 - Basic goodness-of-fit plot for the final voriconazole population pharmacokinetic model. Observed voriconazole concentrations (mg/L) are plotted versus population prediction

We tried to estimate FA, IR and IC values but it did not improve OFV (Supplemental table-2).

Run	Parameterestimate	OFV
71	Cf. Table-5	692
74	Run 71 + IR	718
75	Run 71 + FA	769
76	Run 71 + IC	726

Supplemental table 2 – Covariates estimation

Input parameters for voriconazole PBPK model development are listed in Table-4.  $V_{max_{CYP2C19}}$  and  $K_{MCYP219}$  values came from our previous PopPK estimation,  $V_{max_{CYP3A4}}$  and  $K_{MCYP3A4}$  were then computed from Eq.4 and Eq.5. Lipophilicity was optimized to 2.29 in order to match simulated lineshape with IV data [191]. Absorption parameters (intestinal permeability, tablet dissolution time, tablet dissolution shape) did not need to be adjusted because simulations fitted well per os data [192].

Tableau 3 - Drug-dependent parameters of the final voriconazole PBPK model

Parameter	Units	Value	Source
MW	g/mol	349.3	
pKa		1.60	
Solubility (pH)	mg/mL	2.7 (1.2), 3.2 (1.0), 0.10 (7.0)	[201]
logP		2.29	Optimized
Fu	%	42	[201]
Specific intestinal permeability	cm/min	$2.28 \cdot 10^{-5}$	Optimized
Partition coefficients		Rodgers and Rowland	
Cellular permeabilities		PK-sim standard	
CYP3A4 $K_M$	$\mu\text{mol/L}$	37.20	NONMEM
CYP3A4 $V_{\text{max}}$	pmol/min/pmolenz.	1	NONMEM
CYP2C19 $K_M$	$\mu\text{mol/L}$	8.67	NONMEM
CYP2C19 $V_{\text{max}}$	pmol/min/pmolenz.	2.91	NONMEM
DT <sub>50</sub> for tablet	Min	30	[201]
Shape factor for tablet		1.29	[201]

For each CRP group, 50 population simulations were performed with CYP2C19 genotypes random draw in a Dirichlet law. Predicted steady-state trough concentrations were closed to the observed median in each group (Fig.4).

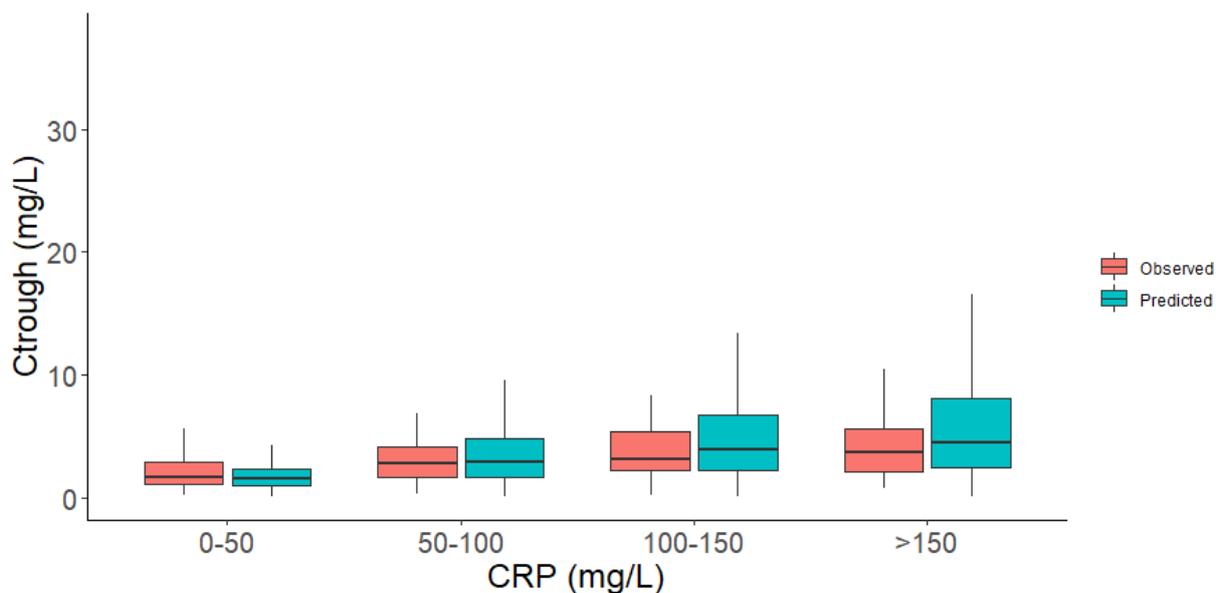


Figure 4 - Box plots (median and 25th to 75th percentiles) of observed and predicted steady-state voriconazole trough concentrations. Observations were splitted according to CRP level: 0-50 (n=134), 50-100 (n=93), 100-150 (n=47) and >150 mg/L (n=62). Predictions represent the 50 medians steady-state trough concentration from the 50 population simulation for each CRP group.

## Omeprazole

Input parameters for omeprazole PBPK model development are listed in Table-5.  $V_{max_{CYP2C19}}$  and  $V_{max_{CYP3A4}}$  were optimized to match observed AUCinf of omeprazole at day 29 respecting fm of both CYPs, optimal values were 3.1 and 0.9 pmol/min/pmol of enzyme. Then, specific intestinal permeability, tablet dissolution time (50% dissolved) and dissolution shape were optimized to better describe the absorption.

Tableau 4 - Drug-dependent parameters of the final omeprazole PBPK model

Parameter	Units	Value	Source
MW	g/mol	345.42	
pKa		4.40 ; 8.70	
Solubility (pH)	mg/mL	0.36 (drugbank)	
logP		2.23	[202]
Fu	%	5	
Specific intestinal permeability	cm/min	$4 \cdot 10^{-5}$	Optimized
Partition coefficients		Rodgers and Rowland	

Cellular permeabilities		PK-sim standard	
CYP3A4 $K_M$	$\mu\text{mol/L}$	22	[202]
CYP3A4 $V_{\text{max}}$	$\text{pmol/min/pmole}$	0.9	Optimized
CYP2C19 $K_M$	$\mu\text{mol/L}$	1.75	[202]
CYP2C19 $V_{\text{max}}$	$\text{pmol/min/pmole}$	3.1	Optimized
Formulation		Tablet	
$DT_{50}$ for tablet	min	60	Optimized
Shape factor for tablet		3	Optimized

50 population simulations with 12 patients were performed with CYP2C19 genotypes random draw in Dirichlet law for CRP level of 25.3 mg/L and 0.5 mg/L. Median of the 50 means PK profiles are shown in Fig.5. and fitted well the mean of the observations. In addition, predicted median of the 50 AUCinf and Cmax means are closed the observed means (Table-11) before and after sirukumab administration, therefore the model seems to capture the impact of inflammation on omeprazole PK.

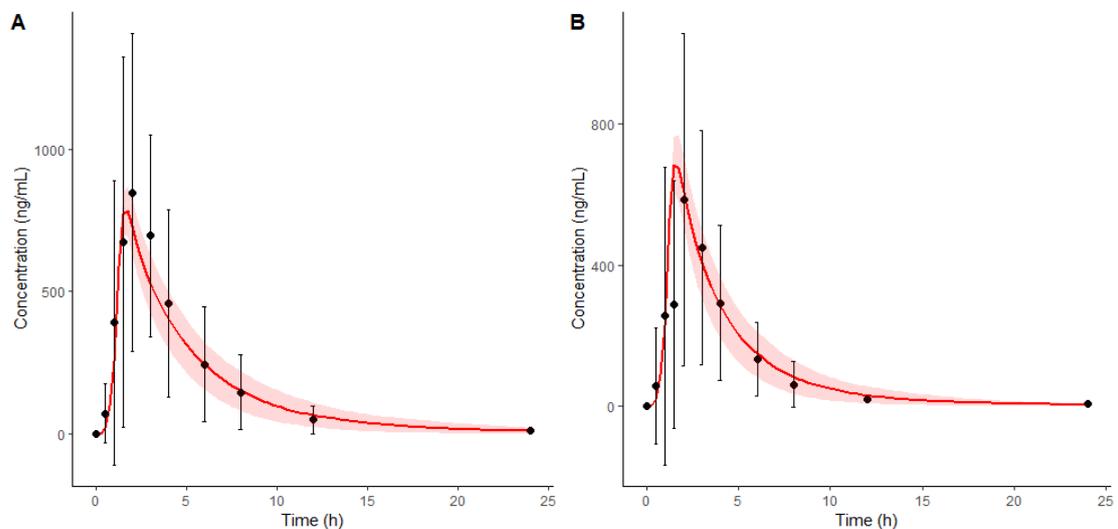


Figure 5 - Observed versus predicted omeprazole plasma concentration profiles for 12 patients with a mean CRP level of 25.3 mg/L (A) and 0.5 mg/L (B). Black symbols represent observed mean  $\pm$  standard deviation (SD). Median of the 50 predicted means population are shown as red lines.

## Simulations

The predicted mean midazolam plasma concentration-time profiles following 0.03 mg/kg per os administration in 12 virtual patients with 0.5, 50, 100, 200 or 300 mg/L CRP are shown in Fig.6-A. The mean predicted C<sub>max</sub> fold-change increased from 1.7 with 50 mg/L CRP to 2.6 with 300 mg/L compared to 0.5 mg/L (Fig.6-B). A bigger impact on AUC<sub>inf</sub> is reported, indeed, the mean predicted fold-change increased from 2.5 with 50 mg/L CRP to 7.3 with 300 mg/L (Fig.6-B).

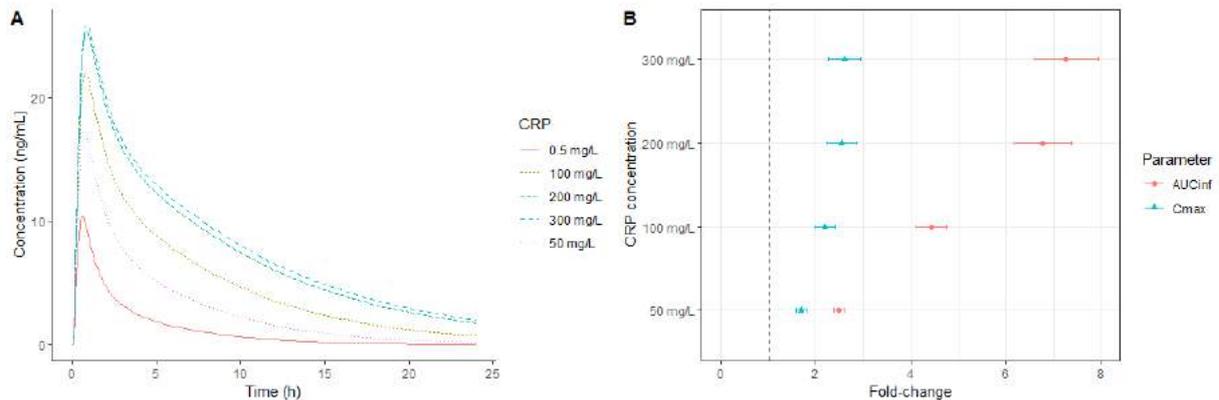


Figure 6 - (A) Mean predicted systemic concentration (A) and mean predicted (and 95% CIs) fold changes of C<sub>max</sub> and AUC<sub>inf</sub> (B) following a 0.03 mg/kg midazolam per os administration in 12 patients with CRP level of 0.5, 50, 100, 200 and 300 mg/L.

About the impact of CYP2C19 polymorphism on the interaction between inflammation and omeprazole PK, the different mean plasma concentration-time profiles following 20 mg per os administration are presented in fig 7. The impact of inflammation on AUC<sub>inf</sub> was quite similar for all genotypes by reaching a mean fold-changes of about 3 with a 300 mg/L CRP, excepted for poor metabolizer (\*2-3/\*2-3 genotype) for which the impact was more important and the fold-change reached 4.75 (Fig.7). About the effect on C<sub>max</sub>, it was proportionnal to the FA value, indeed it was 1.06 for the poor metabolizers and of 1.62 for ultra-rapid metabolizers.

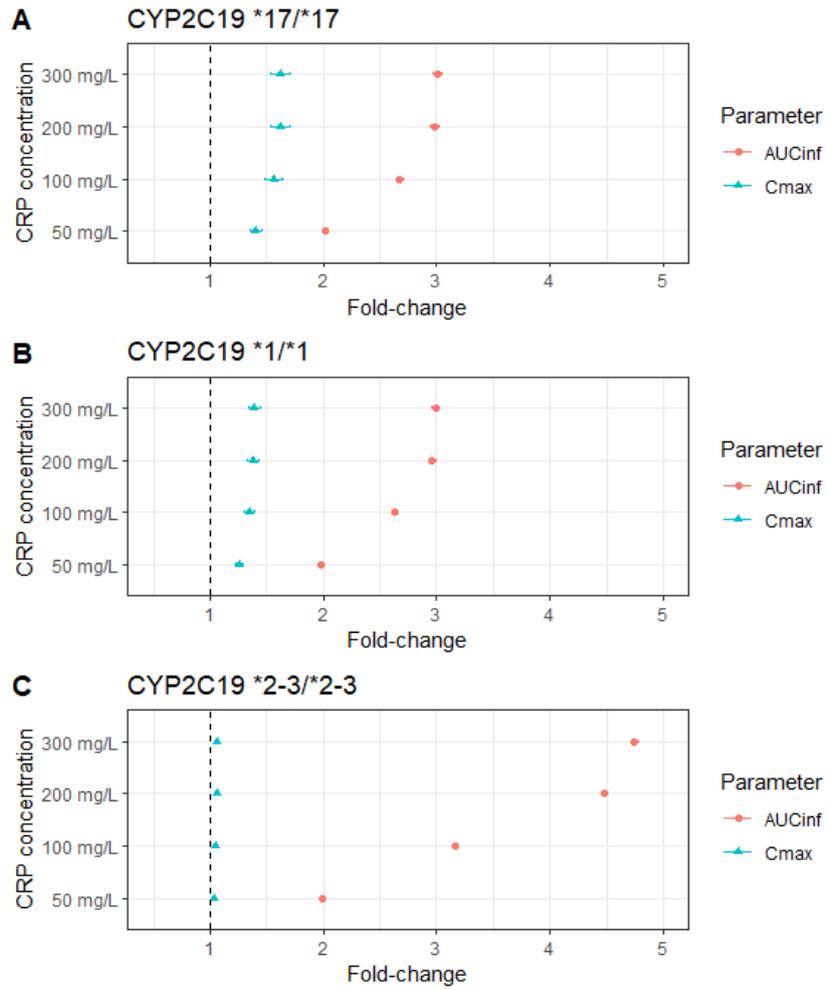


Figure 7 - Impact of 50, 100, 200 and 300 mg/L CRP concentration on predicted mean (and 95% CIs) fold changes of Cmax and AUC following 20 mg omeprazole per os administration in 12 patients with CYP2C19 \*17/\*17 (A), \*1/\*1 (B) and \*2-3/\*2-3 (C) genotypes.

## Discussion

Inflammation is associated with some cytokines increase that leads, after binding to their receptors, to activation of several signaling pathways resulting in DME and drug-transporter impairment [181]. CYP2C19 and -3A4 are two major phase I DME impacted by cytokines exposure as shown in different *in vitro* studies [19, 184].

In the present study, we incorporated the impact of inflammation on these two CYPs in a PBPK model and we evaluated the ability to predict the pharmacokinetics of drugs metabolized by these enzymes. CRP was selected as a biomarker of inflammatory response, its synthesis is stimulated by IL-6, one of the major actor of CYPs repression during inflammatory response. Elevations of IL6 and CRP concentrations have been shown to be correlated [203, 204]. We choose CRP level because of its easy and common measurement. The elimination half-life of CRP is about 18h. This value makes CRP an interesting marker of inflammation, from a kinetic point of view: a shorter half-life would result in rapid variations of its concentration, making a single measurement poorly informative about the mean level of inflammation. A longer half-life would result in slow, delayed variations and the biomarker concentration would not reflect the current inflammatory status.

Several PBPK models have already been developed studying the effect of endogenous elevated IL-6 level and mAbs anti-IL6 administration on several CYPs substrates PK [159-161, 205]. They all used *in vitro* results to predict the IL-6 suppressor effect on CYPs, assuming IL-6 concentration in plasma reflects IL-6 in liver or intestine. A limit of using *in vitro* data, is the lack of robustness and standardized procedures, resulting in inter-labs variability in addition of the inter-donor variability. Another limit is that the possible impact of other cytokines (additive or antagonist) is not taken into account. Therefore in our study we only used *in vitro* results as qualitative information and performed a « fitting » approach to derive *in vivo* parameters for CYPs activities suppression.

We related CRP concentration in plasma with CYP2C19 and -3A4 activities by an empirical model, integrated into a PBPK model. We first used midazolam data to establish the link between CRP concentration and CYP3A4 metabolism. Voriconazole data were used to compute the relation between CRP and CYP2C19 activity and confirmed the one with CYP3A4. Finally both relations were validated with omeprazole data. These impacts were assumed to be the same in every organs expressing CYPs.

The top-down approach (the use of clinical data to derive an empirical model) is frequently impaired by several complexities, due to missing data, heterogenous data, co-morbidities, drug-drug interactions, etc. Pop PK modelling is a usefull approach to analyse pooled data from several studies

with different administration routes and dosages, while integrating covariates information (e. g. genetic polymorphisms, inflammation level or concomitant medications). Therefore we used this approach to analyse through voriconazole concentrations and estimate the relation between CRP and CYP2C19 activity.

Evaluation of a mechanistic model (or semi-mechanistic, in our case) by comparing predictions to data observed in another study is also prone to the same difficulties related to missing or heterogenous data, co-morbidities, drug-drug interactions, etc. To overcome this issue, the simulations have to be refined by putting appropriate distributions on the unknown or uncertain parameters or covariates included in the model. For example, the CYP2C19 genotypes random draws in a Dirichlet law allowed to accurately describe voriconazole and omeprazole observations, when the exact genotypes repartitions in the studied populations were not known. As a result, our models reasonably captured midazolam and omeprazole PK profiles and exposure before and after sirukumab administration.

Regarding the link between CRP level and CYP activities,  $A_{3A4}$  is smaller than  $A_{2C19}$  (0.20 versus 0.36), which means that for high CRP levels CYP3A4 activity is more reduced than CYP2C19. Alpha is smaller for CYP2C19 than for CYP3A4 (25 versus 35 L/mg), reflecting a more potent inflammatory impact on CYP2C19 at intermediate values of CRP (20 to 40 mg/L). The maximal effect of inflammation is reached earlier for CYP2C19 than for CYP3A4 as CRP level increases.

Regarding drug specific parameters,  $f_m$ s by CYP3A4 are 0.91, 0.31 and 0.11 for midazolam, voriconazole and omeprazole respectively. Voriconazole and omeprazole CYP2C19  $f_m$ s are 0.68 and 0.84. The higher the  $f_m$ , the higher the sensitivity to CYP3A4 and CYP2C19 variations. The inflammatory impact may have been greater for a drug with a CYP3A4 or CYP2C19  $f_m$  of 1, indeed a 300 mg/L CRP level would have decreased its clearance by respectively 80% or 64%.

This kind of model could be used in case of diseases with chronic inflammation in order to propose a dosage adaptation. It could be useful as well in case of administration of monoclonal antibody against cytokines or an anti-Janus kinase (JAK)-1/2, to predict the *in vivo* suppression of CYPs repression and potential DDIs with probe substrates, as it has already been shown *in vitro* [33, 35].

Regarding the limits of our study, a transient release of cytokines was observed for 48h after blinatumomab administration [161]. CRP elevation duration appeared to be more indicative of CYP3A4 suppression duration than other cytokines, however this observation remains to be confirmed. Xu et al. also highlighted the importance of inflammation duration more than its magnitude to impact CYPs clearances.

Another limit is related to transporters. In vitro experiments have studied the effect of cytokines exposure on efflux and uptake transporters [31]. Changes in transporter expression or activities could modify drugs exposure and have not been considered in our model. Inflammatory response also impact plasma proteins levels, indeed albumin level decreased up to 20% [206] and alpha-1 acid glycoprotein increased up to 100% (Coutant 2018). These changes may modify drugs unbound fraction and impact their disposition especially for drugs with high plasma protein binding such as midazolam or omeprazole. These changes were not considered in the model. Binding partner(s) needs to be well characterised because of the opposite variations of the two major plasma proteins. It was not the case for our three substrates so these changes were not considered in the model.

Some simulations were carried out to illustrate the usefulness of our model. To quantify the potential impact of the inflammatory response, several simulations were performed for different CRP levels after midazolam or omeprazole administration. Midazolam AUC could reach a fold-change of 7 with a CRP of 300 mg/L, Cmax variation is slightlier and reaches 2.5. CYP2C19 is polymorphic so simulations of omeprazole administration were conducted in population for each CYP2C19 genotypes. The effect of increasing CRP level is quite similar in each population excepted for poor metabolizers (\*2-3/\*2-3), the impact is higher and the AUC fold-change reached nearly 5. This can be explained by the absence of active CYP2C19 so omeprazole was metabolized only by CYP3A4 and in our model, inflammation effect is quiet more important on CYP3A4 than on CYP2C19 for high CRP concentrations.

## **Conclusion**

These findings suggest that CYP2C19 and -3A4 substrates PK could be predicted depending on the level of CRP. This model may be useful for adapting drugs dosing rate and to avoid toxicities in case of high inflammatory response. This strategy may be extended at other CYPs also affected by inflammatory response. Other PK concerns should be further investigated such as the impact on binding proteins, drug-transporters or DDI.

1. Klein M. Role of inflammatory cytokine signaling in the regulation of detoxifying functions in human hepatocytes and liver: Stuttgart University; 2014.
2. Martin F, Santolaria F, Batista N, Milena A, Gonzalez-Reimers E, Brito MJ, et al. Cytokine levels (IL-6 and IFN-gamma), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer. *Cytokine*. 1999;11(1):80-6.
3. Robak T, Gladalska A, Stepień H, Robak E. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 1998;7(5):347-53.
4. Klein M, Thomas M, Hofmann U, Seehofer D, Damm G, Zanger UM. A Systematic Comparison of the Impact of Inflammatory Signaling on Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Gene Expression and Activity in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;43(2):273-83.
5. Dickmann LJ, Patel SK, Rock DA, Wienkers LC, Slatter JG. Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(8):1415-22.
6. Simon F, Garcia J, Guyot L, Guitton J, Vilchez G, Bardel C, et al. Impact of Interleukin-6 on Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Intestinal Cells. *AAPS J*. 2019;22(1):16.
7. Lee EB, Daskalakis N, Xu C, Paccaly A, Miller B, Fleischmann R, et al. Disease-Drug Interaction of Sarilumab and Simvastatin in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(6):607-15.
8. Schmitt C, Kuhn B, Zhang X, Kivitz AJ, Grange S. Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(5):735-40.
9. van Wanrooy MJ, Span LF, Rodgers MG, van den Heuvel ER, Uges DR, van der Werf TS, et al. Inflammation is associated with voriconazole trough concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7098-101.
10. Gautier-Veyret E, Bailly S, Fonrose X, Tonini J, Chevalier S, Thiebaut-Bertrand A, et al. Pharmacogenetics may influence the impact of inflammation on voriconazole trough concentrations. *Pharmacogenomics*. 2017;18(12):1119-23.
11. Jiang X, Zhuang Y, Xu Z, Wang W, Zhou H. Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Predict Disease-Mediated Therapeutic Protein-Drug Interactions: Modulation of Multiple Cytochrome P450 Enzymes by Interleukin-6. *AAPS J*. 2016;18(3):767-76.
12. Machavaram KK, Almond LM, Rostami-Hodjegan A, Gardner I, Jamei M, Tay S, et al. A physiologically based pharmacokinetic modeling approach to predict disease-drug interactions: suppression of CYP3A by IL-6. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(2):260-8.
13. Kraynov E, Martin SW, Hurst S, Fahmi OA, Dowty M, Cronenberger C, et al. How current understanding of clearance mechanisms and pharmacodynamics of therapeutic proteins can be applied for evaluation of their drug-drug interaction potential. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(10):1779-83.
14. Peters SA. Evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for lineshape analysis. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(4):261-75.
15. Ankit Rohatgi. WebPlotDigitizer. 4.2 ed2019.
16. Vet NJ, Brussee JM, de Hoog M, Mooij MG, Verlaat CW, Jerchel IS, et al. Inflammation and Organ Failure Severely Affect Midazolam Clearance in Critically Ill Children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194(1):58-66.
17. Zhuang Y, de Vries DE, Xu Z, Marciniak SJ, Jr., Chen D, Leon F, et al. Evaluation of disease-mediated therapeutic protein-drug interactions between an anti-interleukin-6 monoclonal antibody (sirukumab) and cytochrome P450 activities in a phase 1 study in patients with rheumatoid arthritis using a cocktail approach. *J Clin Pharmacol*. 2015;55(12):1386-94.

18. Hanke N, Frechen S, Moj D, Britz H, Eissing T, Wendl T, et al. PBPK Models for CYP3A4 and P-gp DDI Prediction: A Modeling Network of Rifampicin, Itraconazole, Clarithromycin, Midazolam, Alfentanil, and Digoxin. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2018;7(10):647-59.
19. Gautier-Veyret E, Truffot A, Bailly S, Fonrose X, Thiebaut-Bertrand A, Tonini J, et al. Inflammation is a potential risk factor of voriconazole overdose in hematological patients. *Fundam Clin Pharmacol*. 2019;33(2):232-8.
20. Michael C, Bierbach U, Frenzel K, Lange T, Basara N, Niederwieser D, et al. Voriconazole pharmacokinetics and safety in immunocompromised children compared to adult patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(8):3225-32.
21. Hohmann N, Kocheise F, Carls A, Burhenne J, Weiss J, Haefeli WE, et al. Dose-Dependent Bioavailability and CYP3A Inhibition Contribute to Non-Linear Pharmacokinetics of Voriconazole. *Clin Pharmacokinet*. 2016;55(12):1535-45.
22. Veringa A, Ter Avest M, Span LF, van den Heuvel ER, Touw DJ, Zijlstra JG, et al. Voriconazole metabolism is influenced by severe inflammation: a prospective study. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(1):261-7.
23. Dolton MJ, Mikus G, Weiss J, Ray JE, McLachlan AJ. Understanding variability with voriconazole using a population pharmacokinetic approach: implications for optimal dosing. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(6):1633-41.
24. GENOPHAR II WORKING GROUP. DDI-predictor [Available from: <https://www.ddi-predictor.org/>].
25. Damle B, Varma MV, Wood N. Pharmacokinetics of voriconazole administered concomitantly with fluconazole and population-based simulation for sequential use. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):5172-7.
26. Goutelle S, Bourguignon L, Bleyzac N, Berry J, Clavel-Grabit F, Tod M. In vivo quantitative prediction of the effect of gene polymorphisms and drug interactions on drug exposure for CYP2C19 substrates. *AAPS J*. 2013;15(2):415-26.
27. Strom CM, Goos D, Crossley B, Zhang K, Buller-Burkle A, Jarvis M, et al. Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory. *Genet Med*. 2012;14(1):95-100.
28. Martis S, Peter I, Hulot JS, Kornreich R, Desnick RJ, Scott SA. Multi-ethnic distribution of clinically relevant CYP2C genotypes and haplotypes. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(4):369-77.
29. McArdle PA, McMillan DC, Sattar N, Wallace AM, Underwood MA. The relationship between interleukin-6 and C-reactive protein in patients with benign and malignant prostate disease. *Br J Cancer*. 2004;91(10):1755-7.
30. Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1991;101(3):782-5.
31. Febvre-James M, Bruyere A, Le Vee M, Fardel O. The JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Reverses Interleukin-6-Mediated Suppression of Drug-Detoxifying Proteins in Cultured Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2018;46(2):131-40.
32. Machavaram KK, Endo-Tsukude C, Terao K, Gill KL, Hatley OJ, Gardner I, et al. Simulating the Impact of Elevated Levels of Interleukin-6 on the Pharmacokinetics of Various CYP450 Substrates in Patients with Neuromyelitis Optica or Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders in Different Ethnic Populations. *AAPS J*. 2019;21(3):42.
33. Xu Y, Hijazi Y, Wolf A, Wu B, Sun YN, Zhu M. Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Assess the Influence of Blinatumomab-Mediated Cytokine Elevations on Cytochrome P450 Enzyme Activity. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2015;4(9):507-15.
34. Le Vee M, Lecureur V, Stieger B, Fardel O. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(3):685-93.

35. Don BR, Kaysen G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. *Semin Dial.* 2004;17(6):432-7.

Annexe : Script NONMEM pour le modèle de population du voriconazole.

;; 1. Based on: run69

;; 2. Description: VORI

;; x1. Author: user

\$PROBLEM VORI

\$INPUT ID DATE TIME DV MDV EVID SS II AMT CMT BW AGE CRP FA OCC

Cortico IPP IR1 IR2 IC

\$DATA voric6.prn IGNORE=#

\$SUBROUTINE ADVAN13 TOL=4

\$MODEL NCOMP=3 COMP=(DEPOT) COMP=(CENTRAL) COMP=(PERIPH)

\$PK

KA=THETA(1)\*EXP(ETA(1)) ; Absorption rate

FABS=THETA(2)\*EXP(ETA(2)) ; Biodisp

V2=THETA(3)\*EXP(ETA(3)) ; Volume central

Q=THETA(4)\*EXP(ETA(4)) ; Clairance intercompartimentale

V3=THETA(5)\*EXP(ETA(5)) ; Volume périphérique

VM1=THETA(6)\*EXP(ETA(6)) ; Vmax 2C19

KM1=THETA(7)\*EXP(ETA(7)) ; Km 2C19

;VM2=THETA(8)\*EXP(ETA(8)) ; Vmax 3A4

;KM2=THETA(8)\*EXP(ETA(8)) ; Km 3A4

KCRP0=THETA(8) ; KCRP0

ALPHA=THETA(9) ; Alpha kcrp

KM2=4.29\*KM1

VM2=VM1\*(KM2/KM1)\*(0.31/0.68)

KCRP=(1-KCRP0)+KCRP0\*exp(-ALPHA\*CRP)

S2=V2

\$DES

DADT(1)=-KA\*A(1)

DADT(2)=FABS\*KA\*A(1)-Q/V2\*A(2)+Q/V3\*A(3)-VM1\*FA\*KCRP\*(1+IC)\*A(2)/(KM1\*V2\*(1+(IR1/(1-IR1)))+A(2))-VM2\*(1+IC)\*A(2)\*(0.8+0.2\*exp(-0.693/35\*CRP))/(KM2\*V2\*(1+(IR2/(1-IR2)))+A(2))

DADT(3)=Q/V2\*A(2)-Q/V3\*A(3)

\$THETA 0.53 FIX ; KA

\$THETA 0.942 FIX ; FABS

\$THETA 27.1 FIX ; V2

\$THETA 35.1 FIX ; Q

\$THETA 127 FIX ; V3

\$THETA (30,,80) ; VM1

\$THETA (4,,20) ; KM1

\$THETA (0.5,,0.8) ;KCRP0

\$THETA (0.01,,0.03) ;Alpha

\$OMEGA 0.173 FIX ; KA\_

\$OMEGA 0.135 FIX ; FABS\_

\$OMEGA 0.696 FIX ; V2\_

\$OMEGA 0.140 FIX ; Q\_

\$OMEGA 0.145 FIX ; V3\_

\$OMEGA 0.5 ; VM1

\$OMEGA 0.5 ; KM1

\$ERROR

IPRED=F

IRES=DV-IPRED

Y=F\*(1+EPS(1))+EPS(2) ;S

\$SIGMA 0.5

0.000025 FIX ;S

\$ESTIMATION METHOD=0 MAXEVAL=5000 NOABORT POSTHOC

\$COV UNCONDITIONAL

\$TABLE ID MDV EVID AMT TIME IPRED IRES NPDE FILE=sdtab71

\$TABLE ID DV MDV EVID CRP FA IR1 IR2 IC BW AGE VM1 KM1 ;KCRPO ALPHA

FIRSTONLY NOAPPEND ONEHEADER NOPRINT FILE=patab71

## Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de la réponse inflammatoire sur la pharmacocinétique des médicaments. En effet, depuis de nombreuses années l'inflammation est connue pour être une source de variabilité, notamment concernant la biodisponibilité, le métabolisme et le passage dans le cerveau des médicaments. Parmi les différents acteurs de la réponse inflammatoire, l'IL-6 a démontré un rôle important dans la baisse d'expression et d'activité des CYPs et des transporteurs. La première partie des travaux visait donc à étudier son impact sur des entérocytes humains et sur une lignée de BHE. Le niveau de l'inflammation peut dépendre de la pathologie, de son stade mais également d'une modulation éventuelle par la prise d'un co-traitement. Cependant, à ce jour, peu d'études ont quantifié son retentissement sur la PK des médicaments. L'utilisation de modélisation mathématique est recommandée par les agences réglementaires et est utilisée de manière croissante dans le développement des médicaments ces dernières années. Un modèle PBPK a été développé en ce sens afin de prédire les modifications de profils PK et l'éventuelle nécessité d'une adaptation de posologie en fonction du niveau d'inflammation.

#### Analyses *in vitro* de l'impact de l'exposition à l'IL-6 sur modèles d'intestin et de barrière hémato-encéphalique

La première partie de ces travaux de thèse visait à mettre en évidence sur tissus intestinaux humains les variations des différents acteurs de la biodisponibilité et du métabolisme intestinal des médicaments, induites suite à l'exposition à différentes concentrations d'IL-6 pendant différentes durées. Une baisse d'expression et d'activité des enzymes de phase I a été observée tandis que les enzymes de phase II et les transporteurs étaient peu impactés. L'effet sur les CYPs était proche de celui observé sur hépatocytes, l'inflammation semble donc pouvoir diminuer l'effet de premier passage des médicaments et leur biodisponibilité. Cette information peut être particulièrement pertinente dans le cadre de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, pour lesquelles on retrouve des acteurs de l'inflammation aussi bien au niveau luminal que systémique. Les concentrations d'IL-6 utilisées dans nos travaux étaient globalement supérieures aux concentrations plasmatiques mesurées en clinique (même, si dans de rares cas, elles peuvent atteindre plusieurs dizaines de nanogrammes par millilitre). L'inflammation étant un phénomène local, les concentrations systémiques ne sont pas forcément représentatives du niveau d'IL-6 dans les tissus. De plus, l'objectif de ces travaux était d'obtenir une information qualitative et non quantitative sur les modifications induites.

Le modèle *in vitro* utilisé était un modèle 3D de micro-tissus humains possédant les caractéristiques structurelles et physiologiques de l'intestin grêle. Le choix des concentrations d'IL-6 visait à encadrer les concentrations ayant obtenu le plus d'effet dans la littérature (e. g. 10 ng/mL). Ces résultats ont

confirmé ceux observés sur hépatocytes au sujet des CYP2C19 et -3A4, orientant nos choix de substrats pour l'approche prédictive.

Il est également connu que l'inflammation entraîne une perturbation de la BHE, notamment en affectant sa perméabilité. L'impact de l'IL-6 avait déjà fait l'objet d'études mais pas par approche transcriptomique qui permet d'avoir une vision de son impact sur l'ensemble des gènes. Celui-ci se révéla être relativement faible sur les transporteurs ABC. Suite à une extrapolation *in vitro-in vivo* de l'effet de l'IL-6 sur l'activité d'ABCB1, des simulations des profils de digoxine dans le plasma et le tissu interstitiel cérébral étaient effectuées, ne mettant pas en évidence de différence importante. L'objectif était d'observer si l'effet de l'IL-6 sur ABCB1 uniquement pouvait avoir un effet sur le passage de la BHE d'un de ses substrats. Le modèle PBPK avait été construit et validé à partir de données cliniques plasmatiques. Les profils dans le cerveau ainsi que l'effet de l'IL-6 étaient de pures simulations sans validation avec des données cliniques. Lors de ces simulations, le transport et la diffusion passive de la digoxine à travers la BHE, ainsi que l'impact de l'inflammation sur ces processus étaient considérés comme négligeables. Néanmoins, nous avons vu que l'expression de différentes jonctions cellulaires étaient diminuées ce qui pouvaient détériorer l'intégrité de la barrière et augmenter le phénomène de diffusion.

#### Utilisation de la modélisation PBPK pour prédire l'impact de l'inflammation sur la PK de substrats des CYP2C19 et -3A4

Les résultats obtenus *in vitro* sur cellules intestinales et hépatocytaires, ainsi que les données cliniques de la littérature, ont montré que l'expression et l'activité des CYP2C19 et -3A4, deux CYPs majeurs impliqués dans le métabolisme de nombreux médicaments, étaient diminués par l'inflammation. Nous avons alors cherché à développer un modèle PBPK permettant de relier le niveau d'inflammation, représenté par la concentration en CRP, avec la clairance métabolique de ces CYPs et donc la PK de leurs substrats. Pour chaque CYP un modèle a été développé, les différents polymorphismes du CYP2C19 et les interactions avec les co-traitements étaient prises en compte en utilisant des relations issues de modèles physiologiques statiques. Chaque relation a été construite puis validée en utilisant des bases de données provenant d'études différentes. De plus, la validation a également pu s'opérer en utilisant des données de plusieurs substrats. Lors du développement des modèles, l'effet sur les CYPs hépatiques et intestinaux était considéré comme identique. Seul l'effet sur les CYPs était pris en compte lors de cette étude, l'impact potentiel sur les transporteurs, la diffusion ou le niveau de protéines plasmatiques n'était pas considéré.

Actuellement, les rares modèles PBPK existants qui visent à prédire l'influence de l'inflammation sur les CYPs utilisent le niveau d'IL-6 comme marqueur de l'inflammation. Ils ont tous une approche bottom-up et se basent sur des résultats d'études *in vitro* sur hépatocytes humain exposés à différentes concentrations d'IL-6 pour calibrer cet impact. Cette approche comporte certaines limites comme la variabilité des résultats *in vitro* (inter-donneur et inter-laboratoire), la prise en compte de l'effet d'une seule cytokine, la concentration plasmatique d'IL-6 considérée comme la concentration active sur la synthèse des CYPs et enfin la rareté de la mesure de cette concentration dans les études cliniques ou lors du suivi biologique de patients. Pour ces raisons nous avons choisi d'utiliser le niveau de CRP comme marqueur de l'inflammation, malgré sa variabilité, mais régulièrement dosée en routine, et une approche « top-down » basée sur des données *in vivo* pour estimer l'effet de l'inflammation.

Dans le cadre de cette thèse nous avons développé un modèle hybride comportant à la fois une partie « bottom-up » et « top-down », ce type d'approche est parfois appelée approche « middle-out » [207]. Le modèle initial est basé sur des données physico-chimiques, ADME, *in vitro* et pré-cliniques. Certains paramètres peuvent ensuite être affinés grâce à l'utilisation de données cliniques. L'estimation de ces paramètres peut se faire par analyse de sensibilité ou grâce à des algorithmes d'estimation de paramètres plus puissants. En cas de disponibilité des profils individuels, ils peuvent également être estimés par approche de population via des modèles semi-mécanistiques.

Nous avons choisi de ne pas utiliser une approche intégralement « bottom-up ». La majorité des travaux *in vitro* ne quantifient l'effet de l'exposition que d'une seule cytokine, rarement en combinaison, cela ne permet pas de prendre en compte les effets synergiques ou de rétrocontrôles induits par d'autres cytokines *in vivo* lors d'une réaction inflammatoire. D'autres limites telles que la variabilité inter-donneur (dans le cas d'hépatocytes humains) et inter-laboratoires, l'absence de consensus sur l'utilisation de contrôles positifs impliquant les différentes voies de régulations, le fait que seules les cytokines ayant leur récepteur présent dans le modèle peuvent être étudiées (par exemple l'absence d'effet de l'exposition à l'IL-23 sur hépatocytes du à l'absence d'expression de son récepteur lorsqu'elle joue un rôle dans la régulation d'autres cytokines [208]), et que le système d'étude soit souvent isolé sans interactions entre les cytokines et les différents types cellulaires (l'impact de l'exposition à l'IL-1 $\beta$  est plus important lors de co-culture avec des cellules de Kupffer), sont des freins à l'extrapolation *in vitro-in vivo* de la réponse de façon quantitative. Enfin, les gammes de concentrations de cytokines utilisées doivent être suffisamment larges pour permettre d'établir une relation dose-réponse, quelques travaux ont pu établir cette relation entre les concentrations d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 ou de TNF $\alpha$  et les dérégulations de gènes ou d'activité de CYPs, sur

hépatocytes. Dans notre étude la gamme de concentrations d'IL-6 était trop restreinte et ne permettait pas d'établir une relation dose-réponse sur les tissus intestinaux ou de BHE. Enfin les cytokines majeures ayant fait l'objet d'études *in vitro* sont assez rarement dosées lors d'études cliniques rendant moins accessible l'utilisation d'un modèle par approche bottom-up qui utilise une concentration cytokinique comme paramètre d'entrée.

Slatter et al. ont posé l'hypothèse que la CRP pouvait servir de marqueur de l'inflammation dans le but de mesurer l'impact clinique d'une pathologie inflammatoire sur la clairance des médicaments éliminés par des CYPs [209]. Schmitt et al. ont noté que la cinétique de la CRP dans le sang était parallèle à celle de l'effet du tocilizumab sur la simvastatine [71]. La production de CRP par les hépatocytes et sa libération dans la circulation systémique est provoquée par l'IL-6 et médiée par les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et NF- $\kappa$ B[210]. Compte tenu de ces observations et de celles précédemment évoquées par Rivory et al. [63] mettant en évidence une corrélation entre le niveau de CRP et l'activité du CYP3A4, nous avons utilisé le niveau de CRP comme biomarqueur quantitatif de l'inflammation et de la suppression de l'activité des CYPs.

Ces modèles ont pour objectif de permettre la prédiction d'un profil PK moyen ainsi qu'une variabilité associée dans une population en fonction du niveau de CRP, la connaissance de l'index thérapeutique du médicament ou d'un modèle PK/PD pourrait permettre de proposer une adaptation de posologie. Ces modèles sont utiles pour étudier l'interaction entre la maladie et la PK de médicaments mais il pourrait également l'être pour prédire des IAMs avec des anti-inflammatoires, des mAbs ciblant certaines cytokines ou au contraire des molécules entraînant leur libération.

### Limites

Les travaux réalisés durant cette thèse présentent malgré tout un certain nombre de limites. Tout d'abord l'utilisation d'une seule cytokine lors des expérimentations *in vitro*, bien que l'IL-6 ait montré un effet important, d'autres cytokines peuvent également jouer un rôle, directement ou indirectement, et leur exposition concomitante pourrait améliorer la compréhension des mécanismes *in vivo*. La présence d'un seul type cellulaire dans les modèles intestinaux et de BHE utilisés pourrait également être améliorés par des co-cultures, ou par une culture sur insert pour les expérimentations de transport avec les hCMEC/D3. L'impact de l'IL-6 sur les enzymes et transporteurs n'a pas été étudié au niveau protéique, ni celui sur l'intégrité des barrières. Enfin les simulations des profils PK cérébraux de digoxine n'ont pas été validées avec des données observées.

Concernant la modélisation, le choix de la CRP comme marqueur de l'inflammation peut être discuté à cause de la forte variabilité mais est justifié dans notre approche par la forte disponibilité de sa mesure en pratique.

### Perspectives

Les expérimentations effectuées sur cellules intestinales et de BHE pourraient être reproduites avec l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ , deux autres cytokines majeures ayant montré qu'elles pouvaient jouer un rôle dans la repression des enzymes du métabolisme des médicaments. Les effets observés au niveau génomique et en termes d'activité des CYPs et transporteurs ABC lors de ces travaux pourraient également être étudiés au niveau protéique, par exemple par western-blot, afin de compléter les données obtenues. Les variations du niveau d'expression protéique des différentes jonctions cellulaires (par exemple claudine, occludine et zonula occludens-1) ainsi que l'impact sur le transport paracellulaire (via un test fonctionnel en mesurant le passage membranaire de la fluorescéine par exemple) pourraient également être effectués.

Des études *in vivo* sur modèles murins pourraient également être intéressantes afin de mesurer l'effet sur les différents acteurs de la pharmacocinétique des médicaments tout en mesurant les concentrations cytokiniques au niveau plasmatique et tissulaire. Bodeman et al. ont regardé l'effet observé sur différents transporteurs de médicaments après administration de LPS à un modèle de souris tout en mesurant le niveau de cytokine au niveau hépatique [211].

L'approche prédictive développée pour le CYP2C19 et -3A4 pourrait être étendue à des substrats d'autres CYPs en fonction des données disponibles. L'étude de Zhuang et al. dont les données du midazolam et de l'oméprazole ont été utilisées pour valider nos modèles comporte également des profils cinétiques observés de caféine, substrat du CYP1A2, et de warfarine, substrat du CYP2C9, associés aux niveaux de CRP préalablement utilisés. Ces CYPs ont montré une baisse d'activité lors de l'exposition d'hepaRG à différentes cytokines [19].

Les relations établies lors du développement des modèles physiologiques pourront être utilisées afin de simuler et prédire, par approche physiologique statique, l'impact de l'inflammation sur les IAM de médicaments déjà connues (les données nécessaires sont compilées dans [www.ddi-predictor.org](http://www.ddi-predictor.org)). De plus, ces relations pourront également servir dans le cadre de prédiction d'IAM entre un médicament anti-inflammatoire ou anti-cytokine, ou à l'inverse une molécule augmente la réponse inflammatoire, et un médicament substrat des CYP2C19 et -3A4.

Enfin, nous avons vu que la PK des protéines thérapeutiques pouvait également être modifiée par l'inflammation. Nous disposons de données nivolumab de l'hôpital Cochin, il serait intéressant de développer un modèle PBPK avec la même stratégie afin de relier le niveau de CRP son profil PK, et ainsi de vérifier si nous observons une hausse de la clairance lorsque la CRP augmente, comme ce qui semble être attendu dans la littérature.

## Bibliographie

1. Zhou, X., et al., *Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. **13**(5): p. 541-7.
2. Vigushin, D.M., M.B. Pepys, and P.N. Hawkins, *Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1351-7.
3. Clyne, B. and J.S. Olshaker, *The C-reactive protein*. *J Emerg Med*, 1999. **17**(6): p. 1019-25.
4. Ansar, W. and S. Ghosh, *C-reactive protein and the biology of disease*. *Immunol Res*, 2013. **56**(1): p. 131-42.
5. Cameron, M.J. and D.J. Kelvin, *Cytokines and chemokines--their receptors and their genes: an overview*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **520**: p. 8-32.
6. Justiz Vaillant, A.A. and A. Quirie, *Interleukin*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
7. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(7): p. 436-45.
8. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
9. Zanger, U.M. and M. Schwab, *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. *Pharmacol Ther*, 2013. **138**(1): p. 103-41.
10. Allorge, D. and M.A. Lorient, *[Pharmacogenetics or the promise of a personalized medicine: variability in drug metabolism and transport]*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2004. **62**(5): p. 499-511.
11. Caldwell, J., I. Gardner, and N. Swales, *An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion*. *Toxicol Pathol*, 1995. **23**(2): p. 102-14.
12. Nigam, S.K., *What do drug transporters really do?* *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(1): p. 29-44.
13. Mizuno, N., et al., *Impact of drug transporter studies on drug discovery and development*. *Pharmacol Rev*, 2003. **55**(3): p. 425-61.
14. Petzinger, E. and J. Geyer, *Drug transporters in pharmacokinetics*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2006. **372**(6): p. 465-75.
15. (GEPK), G.d.e.d.p., *Pharmacocinétique : les fondamentaux*. 2018. 408.
16. Morgan, E.T., *Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection*. *Drug Metab Rev*, 1997. **29**(4): p. 1129-88.
17. Morgan, E.T., et al., *Selective suppression of cytochrome P-450 gene expression by interleukins 1 and 6 in rat liver*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1219**(2): p. 475-83.
18. Morgan, E.T., *Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin*. *Mol Pharmacol*, 1989. **36**(5): p. 699-707.
19. Klein, M., et al., *A Systematic Comparison of the Impact of Inflammatory Signaling on Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Gene Expression and Activity in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2014. **43**(2): p. 273-283.
20. Thal, C., et al., *Administration of high doses of human recombinant interleukin-2 decreases the expression of several cytochromes P-450 in the rat*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **268**(1): p. 515-21.
21. Bleau, A.M., et al., *Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **473**(2-3): p. 197-206.
22. Le Vee, M., et al., *Janus kinase-dependent regulation of drug detoxifying protein expression by interleukin-22 in human hepatic cells*. *Int Immunopharmacol*, 2020. **83**: p. 106439.

23. Nyagode, B.A., C.M. Lee, and E.T. Morgan, *Modulation of hepatic cytochrome P450s by Citrobacter rodentium infection in interleukin-6- and interferon- $\gamma$ -null mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **335**(2): p. 480-8.
24. Dickmann, L.J., et al., *Effects of interleukin 1beta (IL-1beta) and IL-1beta/interleukin 6 (IL-6) combinations on drug metabolizing enzymes in human hepatocyte culture*. Curr Drug Metab, 2012. **13**(7): p. 930-7.
25. Aitken, A.E. and E.T. Morgan, *Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(9): p. 1687-93.
26. Rubin, K., et al., *HepaRG cells as human-relevant in vitro model to study the effects of inflammatory stimuli on cytochrome P450 isoenzymes*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(1): p. 119-25.
27. Mimura, H., et al., *Effects of cytokines on CYP3A4 expression and reversal of the effects by anti-cytokine agents in the three-dimensionally cultured human hepatoma cell line FLC-4*. Drug Metab Pharmacokinet, 2015. **30**(1): p. 105-10.
28. Richardson, T.A., et al., *Expression of UDP-glucuronosyltransferase isoform mRNAs during inflammation and infection in mouse liver and kidney*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(3): p. 351-3.
29. Congiu, M., et al., *UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(2): p. 129-34.
30. Le Vee, M., et al., *Down-regulation of organic anion transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokine interleukin 1beta*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(2): p. 217-22.
31. Le Vee, M., et al., *Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(3): p. 685-93.
32. Le Vee, M., et al., *Regulation of drug transporter mRNA expression by interferon-gamma in primary human hepatocytes*. Fundam Clin Pharmacol, 2011. **25**(1): p. 99-103.
33. Dickmann, L.J., et al., *Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(8): p. 1415-22.
34. Moreau, A., et al., *Effect of Gevokizumab on Interleukin-1beta-Mediated Cytochrome P450 3A4 and Drug Transporter Repression in Cultured Human Hepatocytes*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2017. **42**(5): p. 871-878.
35. Febvre-James, M., et al., *The JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Reverses Interleukin-6-Mediated Suppression of Drug-Detoxifying Proteins in Cultured Human Hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2018. **46**(2): p. 131-140.
36. Morgan, E.T., *Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(4): p. 434-8.
37. Coutant, D.E. and S.D. Hall, *Disease-Drug Interactions in Inflammatory States via Effects on CYP-Mediated Drug Clearance*. J Clin Pharmacol, 2018. **58**(7): p. 849-863.
38. Baumann, H., et al., *Role of CAAT-enhancer binding protein isoforms in the cytokine regulation of acute-phase plasma protein genes*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19744-51.
39. An, M.R., et al., *Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2295-306.
40. Martinez-Jimenez, C.P., et al., *Transcriptional regulation of the human hepatic CYP3A4: identification of a new distal enhancer region responsive to CCAAT/enhancer-binding protein beta isoforms (liver activating protein and liver inhibitory protein)*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(6): p. 2088-101.

41. Jover, R., et al., *Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved*. *FASEB J*, 2002. **16**(13): p. 1799-801.
42. Zordoky, B.N. and A.O. El-Kadi, *Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes*. *Curr Drug Metab*, 2009. **10**(2): p. 164-78.
43. Zhou, C., et al., *Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(8): p. 2280-2289.
44. Pascussi, J.M., et al., *Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(1): p. 42-55.
45. Tian, Y., et al., *Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(1): p. 510-5.
46. Beigneux, A.P., et al., *The acute phase response is associated with retinoid X receptor repression in rodent liver*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(21): p. 16390-9.
47. Ghose, R., et al., *Endotoxin leads to rapid subcellular re-localization of hepatic RXRalpha: A novel mechanism for reduced hepatic gene expression in inflammation*. *Nucl Recept*, 2004. **2**(1): p. 4.
48. Kalitsky-Szirtes, J., et al., *Suppression of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters in the intestine of endotoxin-treated rats*. *Drug Metab Dispos*, 2004. **32**(1): p. 20-7.
49. Murray, M., P.H. Cui, and F. Zhou, *Roles of mitogen-activated protein kinases in the regulation of CYP genes*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(10): p. 850-8.
50. Li, D., et al., *Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 31416-22.
51. Koike, C., R. Moore, and M. Negishi, *Extracellular signal-regulated kinase is an endogenous signal retaining the nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR) in the cytoplasm of mouse primary hepatocytes*. *Mol Pharmacol*, 2007. **71**(5): p. 1217-21.
52. Shah, P., et al., *Role of Adaptor Protein Toll-Like Interleukin Domain Containing Adaptor Inducing Interferon beta in Toll-Like Receptor 3- and 4-Mediated Regulation of Hepatic Drug Metabolizing Enzyme and Transporter Genes*. *Drug Metab Dispos*, 2016. **44**(1): p. 61-7.
53. Wu, K.C. and C.J. Lin, *The regulation of drug-metabolizing enzymes and membrane transporters by inflammation: Evidences in inflammatory diseases and age-related disorders*. *J Food Drug Anal*, 2019. **27**(1): p. 48-59.
54. Rieger, J.K., et al., *Expression variability of absorption, distribution, metabolism, excretion-related microRNAs in human liver: influence of nongenetic factors and association with gene expression*. *Drug Metab Dispos*, 2013. **41**(10): p. 1752-62.
55. Rieger, J.K., et al., *Inflammation-associated microRNA-130b down-regulates cytochrome P450 activities and directly targets CYP2C9*. *Drug Metab Dispos*, 2015. **43**(6): p. 884-8.
56. Kugler, N., K. Klein, and U.M. Zanger, *MiR-155 and other microRNAs downregulate drug metabolizing cytochromes P450 in inflammation*. *Biochem Pharmacol*, 2020. **171**: p. 113725.
57. Kraemer, M.J., et al., *Altered theophylline clearance during an influenza B outbreak*. *Pediatrics*, 1982. **69**(4): p. 476-80.
58. Gray, J.D., K.W. Renton, and O.R. Hung, *Depression of theophylline elimination following BCG vaccination*. *Br J Clin Pharmacol*, 1983. **16**(6): p. 735-7.
59. Toft, P., et al., *Theophylline and ethylenediamine pharmacokinetics following administration of aminophylline to septic patients with multiorgan failure*. *Intensive Care Med*, 1991. **17**(8): p. 465-8.
60. Williams, S.J., J.A. Baird-Lambert, and G.C. Farrell, *Inhibition of theophylline metabolism by interferon*. *Lancet*, 1987. **2**(8565): p. 939-41.
61. Okuno, H., et al., *Depression of drug-metabolizing activity in the human liver by interferon-beta*. *Hepatology*, 1993. **17**(1): p. 65-9.

62. Chiou, W.L., et al., *Use of the erythromycin breath test for in vivo assessments of cytochrome P4503A activity and dosage individualization*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **70**(4): p. 305-10.
63. Rivory, L.P., K.A. Slaviero, and S.J. Clarke, *Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response*. Br J Cancer, 2002. **87**(3): p. 277-80.
64. Hayney, M.S. and D. Muller, *Effect of influenza immunization on CYP3A4 activity in vivo*. J Clin Pharmacol, 2003. **43**(12): p. 1377-81.
65. Molanaei, H., et al., *Metabolism of alprazolam (a marker of CYP3A4) in hemodialysis patients with persistent inflammation*. Eur J Clin Pharmacol, 2012. **68**(5): p. 571-7.
66. Chen, Y.L., et al., *Acute-phase response, interleukin-6, and alteration of cyclosporine pharmacokinetics*. Clin Pharmacol Ther, 1994. **55**(6): p. 649-60.
67. Frye, R.F., et al., *Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure*. J Card Fail, 2002. **8**(5): p. 315-9.
68. PEGINTRON® (*peginterferon alfa-2b*): package insert. 05/2020]; Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/103949s5311bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/103949s5311bl.pdf).
69. Vasquez, E.M. and R. Pollak, *OKT3 therapy increases cyclosporine blood levels*. Clin Transplant, 1997. **11**(1): p. 38-41.
70. Strehlau, J., et al., *Interleukin-2 receptor antibody-induced alterations of ciclosporin dose requirements in paediatric transplant recipients*. Lancet, 2000. **356**(9238): p. 1327-8.
71. Schmitt, C., et al., *Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(5): p. 735-40.
72. Lee, E.B., et al., *Disease-Drug Interaction of Sarilumab and Simvastatin in Patients with Rheumatoid Arthritis*. Clin Pharmacokinet, 2017. **56**(6): p. 607-615.
73. Wu, J.J. and K.F. Fleming, *Interaction between adalimumab with concurrent pregabalin and duloxetine administration in a psoriasis patient with diabetic peripheral neuropathy*. Cutis, 2011. **87**(5): p. 249-50.
74. Doi, T., et al., *Phase 1 pharmacokinetic study of MK-0646 (dalotuzumab), an anti-insulin-like growth factor-1 receptor monoclonal antibody, in combination with cetuximab and irinotecan in Japanese patients with advanced colorectal cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **72**(3): p. 643-52.
75. ILUMYA™ (*tildrakizumab-asmn*): package insert. 05/2020]; Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/761067s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/761067s000lbl.pdf).
76. AIMOVIG® (*secukinumab*): package insert. 05/2020]; Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2018/125504s013lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125504s013lbl.pdf).
77. ZINBRYTA (*daclizumab*): package insert. 05/2020]; Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/761029s000lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/761029s000lbl.pdf).
78. Morrissey, K.M., et al., *The UCSF-FDA TransPortal: a public drug transporter database*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **92**(5): p. 545-6.
79. Stopfer, P., et al., *Optimization of a drug transporter probe cocktail: potential screening tool for transporter-mediated drug-drug interactions*. Br J Clin Pharmacol, 2018. **84**(9): p. 1941-1949.
80. Wiebe, S.T., et al., *Validation of a Drug Transporter Probe Cocktail Using the Prototypical Inhibitors Rifampin, Probenecid, Verapamil, and Cimetidine*. Clin Pharmacokinet, 2020.
81. Kupcova, V., et al., *Changes in acute phase proteins after anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) treatment in patients with Crohn's disease*. Physiol Res, 2003. **52**(1): p. 89-93.
82. Ding, R., et al., *Predictors of response to TNF-alpha antagonist therapy in Chinese rheumatoid arthritis*. Clin Rheumatol, 2015. **34**(7): p. 1203-10.
83. Yip, J., et al., *Serum albumin as a marker for disease activity in patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2010. **37**(8): p. 1667-72.

84. Nazha, B., et al., *Hypoalbuminemia in colorectal cancer prognosis: Nutritional marker or inflammatory surrogate?* World J Gastrointest Surg, 2015. **7**(12): p. 370-7.
85. Cheeti, S., et al., *A physiologically based pharmacokinetic (PBPK) approach to evaluate pharmacokinetics in patients with cancer.* Biopharm Drug Dispos, 2013. **34**(3): p. 141-54.
86. Kulkarni, A.B., R. Reinke, and P. Feigelson, *Acute phase mediators and glucocorticoids elevate alpha 1-acid glycoprotein gene transcription.* J Biol Chem, 1985. **260**(29): p. 15386-9.
87. Fournier, T., N.N. Medjoubi, and D. Porquet, *Alpha-1-acid glycoprotein.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 157-71.
88. Soeters, P.B., R.R. Wolfe, and A. Shenkin, *Hypoalbuminemia: Pathogenesis and Clinical Significance.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2019. **43**(2): p. 181-193.
89. Chaudhury, C., et al., *The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan.* J Exp Med, 2003. **197**(3): p. 315-22.
90. Liu, X., et al., *NF-kappaB signaling regulates functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG via intronic binding sequences.* J Immunol, 2007. **179**(5): p. 2999-3011.
91. Smith, S.A. and N.J. Waters, *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein.* Pharm Res, 2018. **36**(2): p. 30.
92. Yang, F., Y. Zhang, and H. Liang, *Interactive association of drugs binding to human serum albumin.* Int J Mol Sci, 2014. **15**(3): p. 3580-95.
93. Matsumoto, K., et al., *Characterization of ligand binding sites on the alpha1-acid glycoprotein in humans, bovines and dogs.* Drug Metab Pharmacokinet, 2002. **17**(4): p. 300-6.
94. Rowland, M.T., T., *Clinical Pharmacokinetics : Concepts and applications.* 1995.
95. Nix, D.E., et al., *Antibiotic tissue penetration and its relevance: models of tissue penetration and their meaning.* Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(10): p. 1947-52.
96. Burkhardt, O., et al., *Ertapenem in critically ill patients with early-onset ventilator-associated pneumonia: pharmacokinetics with special consideration of free-drug concentration.* J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(2): p. 277-84.
97. Rodriguez, M., et al., *Alpha-1-acid glycoprotein directly affects the pharmacokinetics and the analgesic effect of methadone in the rat beyond protein binding.* J Pharm Sci, 2004. **93**(11): p. 2836-50.
98. Yoo, S.D., et al., *Altered disposition and antidepressant activity of imipramine in transgenic mice with elevated alpha-1-acid glycoprotein.* J Pharmacol Exp Ther, 1996. **276**(3): p. 918-22.
99. Yasuhara, M., et al., *Effect of altered plasma protein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol in rats after surgery: role of alpha-1-acid glycoprotein.* J Pharmacol Exp Ther, 1985. **235**(2): p. 513-20.
100. Bounakta, S., et al., *Predictions of bisphenol A hepatic clearance in the isolated perfused rat liver (IPRL): impact of albumin binding and of co-administration with naproxen.* Xenobiotica, 2018. **48**(2): p. 135-147.
101. Baker, M. and T. Parton, *Kinetic determinants of hepatic clearance: plasma protein binding and hepatic uptake.* Xenobiotica, 2007. **37**(10-11): p. 1110-34.
102. Groschwitz, K.R. and S.P. Hogan, *Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis.* J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(1): p. 3-20; quiz 21-2.
103. Garcia, M.A., W.J. Nelson, and N. Chavez, *Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(4).
104. Bruewer, M., et al., *Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process.* FASEB J, 2005. **19**(8): p. 923-33.
105. Xu, P., et al., *Modulation of Intestinal Epithelial Permeability by Plasma from Patients with Crohn's Disease in a Three-dimensional Cell Culture Model.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 2030.
106. Suzuki, T., N. Yoshinaga, and S. Tanabe, *Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium.* J Biol Chem, 2011. **286**(36): p. 31263-71.

107. Al-Sadi, R.M. and T.Y. Ma, *IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4641-9.
108. Sun, X., et al., *Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(1): p. G139-47.
109. Howe, K.L., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of epithelial tight junction proteins enhances barrier function and blocks enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced increased permeability*. Am J Pathol, 2005. **167**(6): p. 1587-97.
110. Landy, J., et al., *Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(11): p. 3117-26.
111. de Vries, H.E., et al., *Inflammatory events at blood-brain barrier in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders: implications for clinical disease*. Epilepsia, 2012. **53 Suppl 6**: p. 45-52.
112. Couto, M., et al., *The interplay between glioblastoma and microglia cells leads to endothelial cell monolayer dysfunction via the interleukin-6-induced JAK2/STAT3 pathway*. J Cell Physiol, 2019. **234**(11): p. 19750-19760.
113. Voirin, A.C., N. Perek, and F. Roche, *Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF-alpha) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells in vitro BBB model*. Brain Res, 2020. **1730**: p. 146647.
114. Blecharz-Lang, K.G., et al., *Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells*. Transl Stroke Res, 2018. **9**(6): p. 631-642.
115. Cheng, S., et al., *Methylprednisolone sodium succinate reduces BBB disruption and inflammation in a model mouse of intracranial haemorrhage*. Brain Res Bull, 2016. **127**: p. 226-233.
116. Schreibelt, G., et al., *Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling*. FASEB J, 2007. **21**(13): p. 3666-76.
117. Riazi, K., et al., *Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 17151-6.
118. Natah, S.S., et al., *Disruption of the blood-brain barrier during TNBS colitis*. Neurogastroenterol Motil, 2005. **17**(3): p. 433-46.
119. Sand, K.M., et al., *Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 682.
120. Ryman, J.T. and B. Meibohm, *Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2017. **6**(9): p. 576-588.
121. Waldmann, T.A. and W. Strober, *Metabolism of immunoglobulins*. Prog Allergy, 1969. **13**: p. 1-110.
122. Roopenian, D.C. and V.Z. Sun, *Clinical ramifications of the MHC family Fc receptor FcRn*. J Clin Immunol, 2010. **30**(6): p. 790-7.
123. Mould, D.R. and B. Green, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development*. BioDrugs, 2010. **24**(1): p. 23-39.
124. Struemper, H., C. Chen, and W. Cai, *Population pharmacokinetics of belimumab following intravenous administration in patients with systemic lupus erythematosus*. J Clin Pharmacol, 2013. **53**(7): p. 711-20.
125. Fearon, K.C., et al., *Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer*. Cancer Res, 1988. **48**(9): p. 2590-5.
126. Cosson, V.F., et al., *Population pharmacokinetics and exposure-response analyses of trastuzumab in patients with advanced gastric or gastroesophageal junction cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **73**(4): p. 737-47.

127. Dirks, N.L. and B. Meibohm, *Population pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies*. Clin Pharmacokinet, 2010. **49**(10): p. 633-59.
128. Bajaj, G., et al., *Model-Based Population Pharmacokinetic Analysis of Nivolumab in Patients With Solid Tumors*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2017. **6**(1): p. 58-66.
129. Jarnum, S., *Turnover of plasma proteins*. J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol), 1975. **6**: p. 13-21.
130. Tojo, A. and S. Kinugasa, *Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption*. Int J Nephrol, 2012. **2012**: p. 481520.
131. Akilesh, S., et al., *Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 967-72.
132. Sarav, M., et al., *Renal FcRn reclaims albumin but facilitates elimination of IgG*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(9): p. 1941-52.
133. Zhou, H.M., D., *Quantitative Pharmacology and Individualized Therapy Strategies in Development of Therapeutic Proteins for Immune-Mediated Inflammatory Diseases*. 2019.
134. Feagan, B.G., et al., *The challenge of indication extrapolation for infliximab biosimilars*. Biologicals, 2014. **42**(4): p. 177-83.
135. Beeken, W.L., H.J. Busch, and D.L. Sylwester, *Intestinal protein loss in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1972. **62**(2): p. 207-15.
136. Kapel, N., et al., *Evaluation of intestinal clearance and faecal excretion of alpha 1-antitrypsin and immunoglobulins during Crohn's disease and ulcerative colitis*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1992. **30**(4): p. 197-202.
137. Liu, X., et al., *Activation of the JAK/STAT-1 signaling pathway by IFN-gamma can down-regulate functional expression of the MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 449-63.
138. Butler, W.T. and R.D. Rossen, *Effects of corticosteroids on immunity in man. I. Decreased serum IgG concentration caused by 3 or 5 days of high doses of methylprednisolone*. J Clin Invest, 1973. **52**(10): p. 2629-40.
139. Kim, K.J., et al., *Net absorption of IgG via FcRn-mediated transcytosis across rat alveolar epithelial cell monolayers*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(3): p. L616-22.
140. Chaudhury, C., et al., *Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction*. Biochemistry, 2006. **45**(15): p. 4983-90.
141. Kim, J., et al., *Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in human: pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model*. Clin Immunol, 2007. **122**(2): p. 146-55.
142. Wolbink, G.J., et al., *Relationship between serum trough infliximab levels, pretreatment C reactive protein levels, and clinical response to infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(5): p. 704-7.
143. Aarons, L., *Population pharmacokinetics: theory and practice*. Br J Clin Pharmacol, 1991. **32**(6): p. 669-70.
144. *Guidance for industry on Population Pharmacokinetics; availability*. Food and Drug Administration, HHS. Notice. Fed Regist, 1999. **64**(27): p. 6663-4.
145. Teorell, T., *Studies on the Diffusion Effect Upon Ionic Distribution : II. Experiments on Ionic Accumulation*. J Gen Physiol, 1937. **21**(1): p. 107-22.
146. Bischoff, K.B., et al., *Methotrexate pharmacokinetics*. J Pharm Sci, 1971. **60**(8): p. 1128-33.
147. Chasseloup, E., *Évaluation de logiciels de PBPK : revue des options de modélisation et évaluation des prédictions PBPK pour PK-Sim<sup>®</sup>, SimCYP<sup>®</sup> et GastroPlus*, in AMU PHARM - Aix-Marseille Université - Faculté de pharmacie. 2017.
148. Jones, H. and K. Rowland-Yeo, *Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2013. **2**: p. e63.

149. Grimstein, M., et al., *Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Regulatory Science: An Update From the U.S. Food and Drug Administration's Office of Clinical Pharmacology*. J Pharm Sci, 2019. **108**(1): p. 21-25.
150. Sinha, V.K., et al., *From preclinical to human--prediction of oral absorption and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach in an industrial setting: a workflow by using case example*. Biopharm Drug Dispos, 2012. **33**(2): p. 111-21.
151. Maharaj, A.R. and A.N. Edginton, *Physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation in pediatric drug development*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2014. **3**: p. e150.
152. Edginton, A.N. and S. Willmann, *Physiology-based simulations of a pathological condition: prediction of pharmacokinetics in patients with liver cirrhosis*. Clin Pharmacokinet, 2008. **47**(11): p. 743-52.
153. Willmann, S., et al., *Mechanism-based prediction of particle size-dependent dissolution and absorption: cilostazol pharmacokinetics in dogs*. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **76**(1): p. 83-94.
154. Thiel, C., et al., *A systematic evaluation of the use of physiologically based pharmacokinetic modeling for cross-species extrapolation*. J Pharm Sci, 2015. **104**(1): p. 191-206.
155. Kuepfer, L., et al., *Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Build a PBPK/PD Model*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2016. **5**(10): p. 516-531.
156. Peters, S.A., *Evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for lineshape analysis*. Clin Pharmacokinet, 2008. **47**(4): p. 261-75.
157. (FDA), F.a.D.A., *Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses — Format and Content Guidance for Industry*. 2018.
158. (CHMP), C.f.M.P.f.H.U., *Guideline on the qualification and reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation*. 2016.
159. Machavaram, K.K., et al., *A physiologically based pharmacokinetic modeling approach to predict disease-drug interactions: suppression of CYP3A by IL-6*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **94**(2): p. 260-8.
160. Jiang, X., et al., *Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Predict Disease-Mediated Therapeutic Protein-Drug Interactions: Modulation of Multiple Cytochrome P450 Enzymes by Interleukin-6*. AAPS J, 2016. **18**(3): p. 767-76.
161. Xu, Y., et al., *Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Assess the Influence of Blinatumomab-Mediated Cytokine Elevations on Cytochrome P450 Enzyme Activity*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2015. **4**(9): p. 507-15.
162. Jacqueroux, E., *Rôles des transporteurs ABC dans la variabilité pharmacocinétique des anticoagulants oraux directs : approche in vitro*. 2019.
163. Hatherell, K., et al., *Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models*. J Neurosci Methods, 2011. **199**(2): p. 223-9.
164. MatTek, C., *Epilntestinal and EpilntestinalFT*. 2017.
165. Ayehunie, S., et al., *Human Primary Cell-Based Organotypic Microtissues for Modeling Small Intestinal Drug Absorption*. Pharm Res, 2018. **35**(4): p. 72.
166. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 736-49.
167. Murakami, H. and H. Masui, *Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(6): p. 3464-8.
168. Poller, B., et al., *The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies*. Journal of Neurochemistry, 2008. **107**(5): p. 1358-1368.

169. Stins, M.F., J. Badger, and K. Sik Kim, *Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells*. *Microb Pathog*, 2001. **30**(1): p. 19-28.
170. Prudhomme, J.G., et al., *Studies of Plasmodium falciparum cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cells*. *Int J Parasitol*, 1996. **26**(6): p. 647-55.
171. Ohtsuki, S., et al., *Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model*. *Mol Pharm*, 2013. **10**(1): p. 289-96.
172. Lopez-Maestre, H., *Analyses et méthodes pour les données transcriptomiques issues d'espèces non modèles : variation de l'expression des éléments transposables (et des gènes) et variants nucléotidiques*. 2017, Université de Lyon I.
173. Chang, C.M., et al., *Nucleic acid amplification using microfluidic systems*. *Lab Chip*, 2013. **13**(7): p. 1225-42.
174. Arya, M., et al., *Basic principles of real-time quantitative PCR*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005. **5**(2): p. 209-19.
175. IRIC, I.f.R.i.l.a.C. *genomique*. 16/11/2020]; Available from: <https://www.genomique.irc.ca/>.
176. Gravel, S., *Influence du diabète de type 2 sur l'activité et l'expression des cytochromes P450*. 2019, Université de Montréal.
177. FDA, *Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers*. 2018.
178. Guillouzo, A., et al., *The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics*. *Chem Biol Interact*, 2007. **168**(1): p. 66-73.
179. Goutelle, S., et al., *In vivo quantitative prediction of the effect of gene polymorphisms and drug interactions on drug exposure for CYP2C19 substrates*. *AAPS J*, 2013. **15**(2): p. 415-26.
180. Stanke-Labesque, F., et al., *Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: Consequences for the personalization of drug treatment*. *Pharmacol Ther*, 2020: p. 107627.
181. Klein, M., *Role of inflammatory cytokine signaling in the regulation of detoxifying functions in human hepatocytes and liver*, in *Dr Margarete Fisher-Bosch Institut*. 2014, Stuttgart University. p. 143.
182. Martin, F., et al., *Cytokine levels (IL-6 and IFN-gamma), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer*. *Cytokine*, 1999. **11**(1): p. 80-6.
183. Robak, T., et al., *Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis*. *Mediators Inflamm*, 1998. **7**(5): p. 347-53.
184. Simon, F., et al., *Impact of Interleukin-6 on Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Intestinal Cells*. *AAPS J*, 2019. **22**(1): p. 16.
185. van Wanrooy, M.J., et al., *Inflammation is associated with voriconazole trough concentrations*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(12): p. 7098-101.
186. Gautier-Veyret, E., et al., *Pharmacogenetics may influence the impact of inflammation on voriconazole trough concentrations*. *Pharmacogenomics*, 2017. **18**(12): p. 1119-1123.
187. Kraynov, E., et al., *How current understanding of clearance mechanisms and pharmacodynamics of therapeutic proteins can be applied for evaluation of their drug-drug interaction potential*. *Drug Metab Dispos*, 2011. **39**(10): p. 1779-83.
188. Vet, N.J., et al., *Inflammation and Organ Failure Severely Affect Midazolam Clearance in Critically Ill Children*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016. **194**(1): p. 58-66.
189. Zhuang, Y., et al., *Evaluation of disease-mediated therapeutic protein-drug interactions between an anti-interleukin-6 monoclonal antibody (sirukumab) and cytochrome P450 activities in a phase 1 study in patients with rheumatoid arthritis using a cocktail approach*. *J Clin Pharmacol*, 2015. **55**(12): p. 1386-94.

190. Gautier-Veyret, E., et al., *Inflammation is a potential risk factor of voriconazole overdose in hematological patients*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2019. **33**(2): p. 232-238.
191. Michael, C., et al., *Voriconazole pharmacokinetics and safety in immunocompromised children compared to adult patients*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(8): p. 3225-32.
192. Hohmann, N., et al., *Dose-Dependent Bioavailability and CYP3A Inhibition Contribute to Non-Linear Pharmacokinetics of Voriconazole*. *Clin Pharmacokinet*, 2016. **55**(12): p. 1535-1545.
193. Veringa, A., et al., *Voriconazole metabolism is influenced by severe inflammation: a prospective study*. *J Antimicrob Chemother*, 2017. **72**(1): p. 261-267.
194. Ankit Rohatgi, *WebPlotDigitizer*. 2019.
195. Hanke, N., et al., *PBPK Models for CYP3A4 and P-gp DDI Prediction: A Modeling Network of Rifampicin, Itraconazole, Clarithromycin, Midazolam, Alfentanil, and Digoxin*. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2018. **7**(10): p. 647-659.
196. Dolton, M.J., et al., *Understanding variability with voriconazole using a population pharmacokinetic approach: implications for optimal dosing*. *J Antimicrob Chemother*, 2014. **69**(6): p. 1633-41.
197. GENOPHAR II WORKING GROUP. *DDI-predictor*. [cited 2020 5 Jan]; Available from: <https://www.ddi-predictor.org/>.
198. Damle, B., M.V. Varma, and N. Wood, *Pharmacokinetics of voriconazole administered concomitantly with fluconazole and population-based simulation for sequential use*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(11): p. 5172-7.
199. Strom, C.M., et al., *Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory*. *Genet Med*, 2012. **14**(1): p. 95-100.
200. Martis, S., et al., *Multi-ethnic distribution of clinically relevant CYP2C genotypes and haplotypes*. *Pharmacogenomics J*, 2013. **13**(4): p. 369-77.
201. Li, X., et al., *A Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Voriconazole Integrating Time-Dependent Inhibition of CYP3A4, Genetic Polymorphisms of CYP2C19 and Predictions of Drug-Drug Interactions*. *Clin Pharmacokinet*, 2019.
202. Qi, F., et al., *Influence of different proton pump inhibitors on the pharmacokinetics of voriconazole*. *Int J Antimicrob Agents*, 2017. **49**(4): p. 403-409.
203. McArdle, P.A., et al., *The relationship between interleukin-6 and C-reactive protein in patients with benign and malignant prostate disease*. *Br J Cancer*, 2004. **91**(10): p. 1755-7.
204. Leser, H.G., et al., *Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, 1991. **101**(3): p. 782-5.
205. Machavaram, K.K., et al., *Simulating the Impact of Elevated Levels of Interleukin-6 on the Pharmacokinetics of Various CYP450 Substrates in Patients with Neuromyelitis Optica or Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders in Different Ethnic Populations*. *AAPS J*, 2019. **21**(3): p. 42.
206. Don, B.R. and G. Kaysen, *Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition*. *Semin Dial*, 2004. **17**(6): p. 432-7.
207. Shebley, M., et al., *Physiologically Based Pharmacokinetic Model Qualification and Reporting Procedures for Regulatory Submissions: A Consortium Perspective*. *Clin Pharmacol Ther*, 2018. **104**(1): p. 88-110.
208. Kenny, J.R., et al., *Therapeutic protein drug-drug interactions: navigating the knowledge gaps-highlights from the 2012 AAPS NBC Roundtable and IQ Consortium/FDA workshop*. *AAPS J*, 2013. **15**(4): p. 933-40.
209. Slatter, J.G., L.C. Wienkers, and L.J. Dickmann, *Drug interactions of cytokines and anticytokine therapeutic proteins.*, in *Drug interactions of therapeutic proteins*, Wiley, Editor. 2013. p. 215-238.
210. Rhodes, B., B.G. Furnrohr, and T.J. Vyse, *C-reactive protein in rheumatology: biology and genetics*. *Nat Rev Rheumatol*, 2011. **7**(5): p. 282-9.

211. Bodeman, C.E., et al., *Differential regulation of hepatic organic cation transporter 1, organic anion-transporting polypeptide 1a4, bile-salt export pump, and multidrug resistance-associated protein 2 transporter expression in lymphocyte-deficient mice associates with interleukin-6 production*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013. **347**(1): p. 136-44.