

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Centre d'investigation clinique - CIC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences Biologiques et Santé (Limoges)
Secteur de recherche : Pharmacologie et sciences du médicament

Présentée par :
Romain Carrez

Implication in vivo des transporteurs pulmonaires sur la pharmacocinétique des anti-infectueux

Directeur(s) de Thèse :
Sandrine Marchand, Julien Brillault

Soutenue le 09 décembre 2019 devant le jury

Jury :

Président	Blandine Rammaert	Professeur et praticien hospitalier, Université de Poitiers
Rapporteur	Fanchon Bourasset	Maître de conférences, Université Descartes, Paris
Rapporteur	David Ternant	Maître de conférences et praticien hospitalier, Université de Tours
Membre	Sandrine Marchand	Professeur et praticien hospitalier, PHAR, Université de Poitiers
Membre	Julien Brillault	Maître de conférences, PHAR, Université de Poitiers
Membre	Michel Laurentie	Directeur de recherches, ANSES, Maisons-Alfort

Pour citer cette thèse :

Romain Carrez. *Implication in vivo des transporteurs pulmonaires sur la pharmacocinétique des anti-infectueux* [En ligne]. Thèse Pharmacologie et sciences du médicament. Poitiers : Université de Poitiers, 2019. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : Sciences Biologiques et Santé

Secteur de Recherche : Pharmacologie et Sciences du Médicament

Présentée par :

Romain CARREZ

(INTITULE DE LA THESE)

IMPLICATION *IN VIVO* DES TRANSPORTEURS D'EFFLUX PULMONAIRES SUR LA
PHARMACOCINETIQUE DES ANTI-INFECTIEUX

Directeur de Thèse :

Madame le professeur Sandrine MARCHAND
Monsieur le docteur Julien BRILLAULT

Soutenue le 09 Décembre 2019

devant la Commission d'Examen

JURY

.....

Docteur Fanchon BOURASSET	Université Paris Descartes	Rapporteur
Docteur David TERNAN	Université de Tours	Rapporteur
Docteur Michel LAURENTIE	ANSES	Examineur
Docteur Blandine RAMMAERT	Université de Poitiers	Examineur
Docteur Julien BRILLAULT	Université de Poitiers	Co-directeur de thèse
Professeur Sandrine MARCHAND	Université de Poitiers	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Sandrine Marchand, la directrice de cette thèse, pour toute son implication dans ce travail, pour ses nombreuses relectures et de m'avoir accompagné depuis ma troisième année de Pharmacie, pour m'avoir guidé pour les différents stages. Tu as été un réel moteur dans mon choix de m'orienter vers la pharmacocinétique depuis le début.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, le Docteur Julien Brillault, pour m'avoir accompagné dans toute la partie *in vitro* de ce travail et m'avoir associé à ses travaux de recherche.

Je remercie le Professeur William Couet de m'avoir accueilli dans son laboratoire INSERM U1070, de son aide précieuse pour la rédaction des publications.

Je remercie les Docteurs Fanchon Bourasset et David Ternan pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'y apporter des remarques qui amélioreront ce travail.

Je remercie les Docteurs Blandine Rammaert et Michel Laurentie pour avoir accepté d'être membres de ce jury de thèse.

Aux membres de l'unité U1070, à Isabelle pour les travaux avec les rats (professionnelle des ré-arrangements de planning), à Muriel et Agnès pour leur bonne humeur, à Julien (pour ses déménagements et ses travaux d'abattage de murs), à Patrice Christophe Julian et Hélène pour leur aide précieuse pour la partie analytique.

À mes camarades d'épopée thésarienne, Alexis (frère de cochon for ever), Vincent (frère de rugby, basket et informatique), Adélie (sœur de cochon par alliance et de PLB), Obélia (pour ses soirées au PLB), Alexia et Bruna (les pro de l'hollow fiber), à Camille pour aide au début de la thèse, même si elle a pris une tournure différente.

À mes potes de fac, Paul, Marie, Antoine, Julie, Marion, Camille, Laurent, même si on s'est un peu perdu de vue, je me souviendrai de ces folles années passées avec vous.

À mes potes de toujours du lycée, Richard, Dave, Solange, Emilie, Warren, Rachelle, que notre amitié dure pour toujours

À ma famille, mes parents, mon frère, mes grands-parents, c'est grâce à vous que je suis la personne que vous connaissez, merci pour votre soutien sans failles. Je vous aime

À Anaïs, celle avec qui je partagerai le reste de ma vie, merci d'être là au quotidien, je serai perdu sans toi. Je t'aime

À mes futurs enfants, vous n'êtes pas encore là mais Papa vous aime déjà

Liste des figures

Figure 1 : Photographie par microscopie électronique de la barrière alvéolo-capillaire. Il s'agit d'un capillaire (C) entre deux alvéoles (AV). Pour être absorbé, un composé doit suivre le chemin de diffusion indiqué par la flèche. Il doit franchir l'épithélium pulmonaire (EP), l'espace interstitiel (IN) et l'épithélium capillaire (EN). Dû à sa faible épaisseur, le surfactant alvéolaire n'est pas visible sur la photographie. On note la présence d'un globule rouge (EC) au centre du capillaire. Adapté de (1).....	19
Figure 2 : Structure des pompes d'efflux de la famille des transporteurs ABC (NBD = domaine de liaison aux nucléotides).	22
Figure 3 : Classification biopharmaceutique (BCS) d'Amidon <i>et al.</i> basée sur la perméabilité et la solubilité des composés (77).....	29
Figure 4 : Classification biopharmaceutique basée sur l'élimination des composés et leur solubilité (79)	30
Figure 5 : Perméabilité apparente de la rhodamine 123 dans la lignée cellulaire Calu-3 avec ou sans inhibiteur de la P-gp (PSC-833) dans le sens apical vers basolatéral (A-to-B) et basolatéral vers apical (B-to-A). De (91)	38
Figure 6 : Perméabilités de la rhodamine 123 sur la lignée cellulaire NCI-H441 avec ou sans inhibiteur de la P-gp (LY335979). De (93)	40
Figure 7 : Graphique représentant la surestimation des concentrations dans l'ELF de la ciprofloxacine (CIP), de la moxifloxacine (MXF) et de la grépafloracine (GRX) en fonction de la lyse des macrophages (K est le ratio entre les concentrations intracellulaire/extracellulaire de chaque antibiotique). (82).....	45
Figure 8 : Pharmacocinétique d'un composé à la suite d'une administration pulmonaire. A la suite d'une nébulisation, le composé peut se déposer au niveau des alvéoles et être métabolisé, phagocyté, absorbé ou efflué vers les bronches par la clairance mucociliaire (MC). Si le dépôt a lieu au niveau trachéobronchique, le composé peut être absorbé ou efflué vers le tractus gastro-intestinal (GIT) par la MC. De (123).....	46
Figure 9 : Schéma de la technique de poumon isolé et perfusé. Les différents éléments sont : 1 pompe de ventilation ; 2 valve à pression positive pour inspiration ; 3 valve à pression positive pour fin d'expiration ; 4 piège à bulles d'air ; 5 pompe péristaltique ; 6 manomètre de la pression de perfusion ; 7 réservoir veineux. De (125).....	47
Figure 10 : profils du pourcentage moyen de la dose absorbée au niveau du perfusât en fonction du temps après administration pulmonaire dans un poumon isolé de rat (■ : FNa (fluorescéine disodique) ; ▼ : FD-4 (dextrans FITC) ; ○ : F-PHEA (dérivé de l'aspartamide) ; ◇ : insuline ; Δ: Immunoglobuline G). De (123)	48
Figure 11 : Profils pharmacocinétiques chez le rat dans le plasma (en rouge) et l'ELF (en bleu) obtenus après administration intraveineuse (à gauche) et nébulisation (à droite) de fluoroquinolones (ciprofloxacine CIP, lévofloxacine LVX et moxifloxacine MOX) (82).....	50
Figure 12 : Profils pharmacocinétiques chez le rat sain dans le plasma (en rouge) et l'ELF (en bleu) obtenus après administration intraveineuse (à gauche) et nébulisation (à droite) de molécules à faible perméabilité cellulaire : colistine (COL), tobramycine (TOB) et aztréonam (ATM) (83, 127, 128).....	52
Figure 13 : Schéma de la conversion du CMS en colistine après administration intraveineuse ou nébulisation. En bleu la pharmacocinétique après nébulisation du CMS et en rose après administration intraveineuse du CMS. Adapté de (136).	99

Figure 14 : Distribution du TA d'agents anti-infectieux en fonction de leur logP, en vert les composés ayant un TA proche de 1 et en rouge ceux ayant un TA supérieur à 1 et donc intéressants à nébuliser.....	102
Figure 15 : perméabilité <i>in vitro</i> en fonction de la disponibilité thérapeutique (TA) mesurée <i>in vivo</i> chez le rat.....	104
Figure 16 : Profils pharmacocinétique chez le rat sain dans le plasma (en rouge) et l'ELF (en bleu) obtenus après administration intraveineuse (à gauche) et nébulisation (à droite) du thiamphénicol (en cours de publication), de l'oseltamivir carboxylate (129) et de la ciprofloxacine (82).	105
Figure 17 : Fraction de tédizolide lié aux surfactants pulmonaires. Différents % en volume de Curosurf ont été ajoutés dans les phases hexane et HBSS avant partition. Après 24hrs de décantation, la concentration de tédizolide dans la phase hexane représente la forme liée et la concentration dans la phase HBSS la forme libre (n=1).	109

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure de l'arbre bronchique humain, selon le modèle de Weibel. Adapté de (3)	13
Tableau 2 : Concentration en albumine dans l'ELF et comparaison avec les normales plasmatiques	16
Tableau 3 : Débits capillaires pulmonaires	18
Tableau 4 : Perméabilités d'absorption et de sécrétion du labétolol, élériptan et ampénavir sans et avec inhibition de la P-gp sur un modèle <i>in vitro</i> de MDCK de type II transfectées MDR1 (81)	33
Tableau 5 : Expression des transporteurs d'efflux dans la lignée Calu-3	38
Tableau 6 : Expression des transporteurs d'efflux dans la lignée NCI-H441. De (89)	39
Tableau 7 : Classification d'agents anti-infectieux en fonction de la disponibilité thérapeutique (TA)	100

Liste des abréviations

AIC	Air Interface Culture (culture air/liquide)
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
AUC	Aire sous la courbe
BCRP	Breast Cancer Related Protein
BCS	Biopharmaceutical Classification System
BDDCS	Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CM	Clairance Mucociliaire
CMS	colistimethate sodique
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
ECCS	Extented Clearance Classification System
ELF	Epithelial Lining Fluid (Liquide épithélial avéolaire)
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GSH	Glutathione
HBSS	Hank Balance Salt Solution
IPL	Poumon isolé et perfusé
IV	Intraveineux
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem
LLC	Liquid covered Culture (culture liquide/liquide)
LZD	Linézolide
MDR	Multidrug Resistance Protein
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein

NEB	Nébulisation
OC	Oseltamivir carboxylate
OMS	Organisation mondiale de la Santé
OP	Oseltamivir Phosphate
Papp	Apparent permeability
pBCS	Pulmonary Biopharmaceutical Classification System
P-gp	Glycoprotéine P
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerisation Chain Reaction
SP	Surfactant protein (Protéine du surfactant)
TA	Disponibilité thérapeutique
TEER	Résistance électrique transépithéliale
TZD	Tédizolide

Table des matières

Remerciements	2
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux	6
Liste des abréviations	7
Introduction	10
Etude bibliographique	12
I. Le poumon.....	13
A. Structure physiologique	13
B. Mécanismes du transport à travers la barrière alvéolo-capillaire.....	20
II. Les classifications biopharmaceutiques.....	28
A. La BCS.....	28
B. BDDCS	29
C. La classification biopharmaceutique pour la voie pulmonaire pBCS	32
III. Les modèles d'étude	35
A. Les modèles <i>in vitro</i>	35
B. <i>In vivo</i>	41
C. <i>Ex vivo</i>	46
IV. Problématique : divergence vitro/vivo.....	49
Articles personnels	55
Discussion	97
Conclusion.....	111
Références	113
Abstract	135
Résumé	137

Introduction

À l'horizon 2050, les infections bactériennes deviendront la première cause de décès dans le monde, devant les cancers. Cela sera dû au nombre croissant de souches résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. Cette antibiorésistance a déjà commencé, car 700 000 décès sont dû à des bactéries résistantes (rapport mai 2016 « Review on Antimicrobial Resistance ») chaque année, et ce nombre sera augmenté à 10 millions par année en 2050. En termes économiques, cela équivaut à une perte de 100 000 milliards de dollars si aucune action n'est menée pour lutter contre cette antibiorésistance, d'après ce rapport de la « Review on Antimicrobial Resistance » en mai 2016. De plus, nous sommes face à une pénurie de nouvelles molécules antibiotiques. Les laboratoires pharmaceutiques investissent peu dans ces thérapies car moins rentables que celles données au long cours, comme pour l'hypertension ou le diabète. Il est donc crucial de mieux comprendre les mécanismes de l'antibiorésistance d'une part car il est possible d'agir sur ces mécanismes pour rétablir la sensibilité aux antibiotiques. C'est le cas des β -lactames qui sont associées à des inhibiteurs de β -lactamases, des enzymes bactériennes qui dégradent les β -lactames et induisent des résistances. Il est également important de mieux utiliser les antibiotiques disponibles. Ceci s'organise déjà au niveau national par des feuilles de route interministérielles (Novembre 2016) et international par des plans d'actions de l'Union Européenne (en 2001, 2011 et le dernier en juin 2017) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) déclinés en 5 grands axes :

- Sensibiliser le public et le personnel de santé à cette problématique
- Renforcement de la surveillance et la recherche
- Prévention des infections (assainissement et hygiène)
- Optimisation de l'usage des antibiotiques

- Soutien des investissements durables pour la découverte de nouveaux traitements curatifs ou prophylactiques.

Parmi les moyens de mieux les utiliser (4^{ème} axe) : préférer une administration locale plutôt qu'une administration systémique. Dans le cas des infections pulmonaires, qui aboutissent à 800 000 décès d'enfants de moins de 5 ans rien qu'en comptant les infections à pneumocoques selon l'OMS, une administration locale par inhalation ou nébulisation apparaît comme une voie d'administration appropriée et serait préférable à une administration systémique, car cela permettrait d'avoir de fortes concentrations locales (et donc d'être potentiellement plus efficace) et de réduire l'exposition systémique (moins d'effets secondaires). Mais cela concerne-t-il tous les agents anti-infectieux ? Pour étudier cela, il est primordial de connaître la pharmacocinétique pulmonaire des antibiotiques. Celle-ci est dépendante de l'épithélium, qui peut être plus ou moins perméable à un composé, et des différents transporteurs qui sont au niveau de cet épithélium, et qui en fonction de leurs types et de leurs sens, peuvent aider à l'absorption ou la ralentir. Historiquement, la recherche sur les transporteurs a été orientée sur les organes impliqués soit dans l'absorption (intestins) ou les organes émonctoires (foie et reins). Mais dorénavant, avec l'expansion des bactéries multi résistantes, l'administration par voie pulmonaire pour traiter ces infections locales est de plus en plus étudiée, notamment par différents modèles *in vitro*. Mais existe-il des facteurs entre les modèles *in vitro* et les expérimentations *in vivo* qui pourraient amener à des divergences dans les observations ? Ces modèles *in vitro* permettent-ils de rendre compte de l'importance des transporteurs dans la pharmacocinétique pulmonaire des médicaments, et sont-ils représentatifs du comportement attendu *in vivo* ? Si un transport est décrit *in vitro*, a-t-il un réel impact sur la pharmacocinétique *in vivo* des anti-infectieux ? Ce potentiel impact sur la pharmacocinétique concerne-t-il tous les anti-infectieux ou certains, en fonction de caractéristiques physicochimiques, seront plus impactés ?

Etude

bibliographique

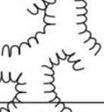
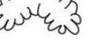
I. Le poumon

A. Structure physiologique

1. L'arbre bronchique

Le poumon est l'organe des échanges gazeux. Il est divisé en 2 grandes régions : les voies conductrices et la zone respiratoire (1, 2). Les voies conductrices sont constituées de la cavité nasale, du pharynx, du larynx, de la trachée et de l'arbre bronchique jusqu'au 16^{ème} embranchement. La zone respiratoire comprend la suite de l'arbre bronchique, c'est-à-dire les bronchioles respiratoires, les conduits alvéolaires ainsi que les sacs alvéolaires. L'arbre bronchique dans son ensemble est organisé en une série de 23 embranchements, en commençant par la trachée pour finir aux alvéoles (Tableau 1). Au fur et à mesure de la segmentation, le diamètre des conduits respiratoires diminue. Il est généralement inférieur à 2 cm pour la trachée, et de l'ordre de 0.4 mm pour le conduit alvéolaire.

Tableau 1 : Structure de l'arbre bronchique humain, selon le modèle de Weibel. Adapté de (3)

	Génération		Diamètre (cm)	Longueur (cm)	Nombre	Surface totale de la section transversale (cm ²)	
Voies conductrices	Trachée		0	1.80	12.0	1	2.54
	Bronches		1	1.22	4.8	2	2.33
			2	0.83	1.9	4	2.13
			3	0.56	0.8	8	2.00
	Bronchioles		4	0.45	1.3	16	2.48
			5	0.35	1.07	32	3.11
Bronchioles terminales		16	0.06	0.17	6.10 ⁴	180.0	
Zones transitionnelles et respiratoires	Bronchioles respiratoires		17	↓	↓	↓	↓
			18	↓	↓	↓	↓
			19	0.05	0.10	5.10 ⁴	10 ³
	Conduits alvéolaires		20	↓	↓	↓	↓
			21	↓	↓	↓	↓
			22	↓	↓	↓	↓
	Sacs alvéolaires		23	0.04	0.05	8.10 ⁶	10 ⁴

Les voies conductrices servent avant tout à amener l'air jusqu'à la zone respiratoire de l'arbre bronchique, là où les échanges gazeux se feront. Elles ont également un rôle de filtre. En effet, la segmentation de l'arbre bronchique fait que les particules inhalées s'impacteront sur les parois plus ou moins en profondeur de l'arbre en fonction de leur diamètre. Enfin, les voies conductrices servent à réchauffer et à humidifier l'air respiré. La zone respiratoire est le lieu des échanges gazeux, où l'oxygène pénètre dans le sang et le dioxyde de carbone en ressort. Les échanges gazeux se font principalement à partir de la 17^{ème} génération (1, 2).

Ainsi, les rôles différents des voies respiratoires vont être à l'origine d'un dimorphisme cellulaire : au niveau des embranchements supérieurs de l'arbre bronchique (trachée et bronches), l'épithélium est pseudostratifié et composé de cellules cylindriques dont des cellules ciliées, des cellules caliciformes et des cellules basales. L'épaisseur moyenne de cet épithélium est de 80 μm . Les cellules caliciformes produisent du mucus, un gel viscoélastique composé à 95% d'eau, 2% de mucine, 1% de sels, 1% de protéines (albumine, anticorps, enzymes) et 1% de lipides (4). Ce mucus permet en premier lieu de solubiliser les particules qui se déposent dans l'arbre bronchique. Les cellules ciliées sont responsables de la clairance muco-ciliaire. Elles permettent de faire remonter des particules dans l'arbre bronchique. À partir des petites bronches et jusqu'aux bronchioles, l'épithélium est constitué d'une monocouche de cellules cuboïdes ainsi que de cellules de Clara, cellules sécrétrices de glycoprotéines et progénitrices de cellules ciliées (5). Enfin, les alvéoles sont composées d'un épithélium de cellules squameuses (pneumocytes) de type I et de type II. Les pneumocytes de type I sont des cellules très minces (de l'ordre de 0.1 à 0.2 μm (6)) et étalées, dont la fonction est d'assurer les échanges gazeux avec les capillaires qui sont à proximité immédiate. Les pneumocytes de type II sont les cellules productrices de surfactant pulmonaire. La surface totale pulmonaire est estimée entre 70 à 140 m^2 (7, 8), dont plus de 99% correspond à la

surface alvéolaire totale (9). Plus de 93% de cette surface alvéolaire est composée de pneumocytes de type I (10).

2. L'epithelial lining fluid (ELF)

Les alvéoles sont dépourvues de mucus, mais sont recouvertes par un surfactant d'une épaisseur comprise entre 20 et 80 nm (6). Les estimations typiques du volume total de liquide de surface chez l'homme vont de 15 à 70 mL (11). Ce volume comprend donc le mucus des bronches ainsi que le surfactant pulmonaire, dont les épaisseurs sont variables le long de l'arbre bronchique.

Ce surfactant a pour rôle principal que les alvéoles ne s'effondrent pas sur elles-mêmes lors de l'expiration (1). Il est composé à 80% de phospholipides, de 5 à 10% de lipides neutres et de 8 à 10% de protéines (5). La composition en protéines de l'ELF a été évaluée par électrophorèse à deux dimensions : 50% d'albumine, 30% d'immunoglobulines (majoritairement A et G), ainsi que de la transferrine (5-6%) et de l' α 1-antitrypsine (3-5%) (12). Ainsi, on peut en déduire que la concentration en albumine dans l'ELF doit être environ égale à 5% de sa concentration plasmatique. La teneur en albumine dans l'ELF a été étudiée selon d'autres techniques, dont les résultats sont résumés dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : Concentration en albumine dans l'ELF et comparaison avec les normales plasmatiques

	Normale plasma (mg/mL)	ELF (mg/mL)	Ratio ELF/plasma	Méthode de détermination
(13)	40	0.5-0.7	1.25-1.75%	Electrophorèse sur papier
(14)			4%	Dosage urée par méthode enzymatique
(11)	40	3.7	9%	Dosage ELISA de l'albumine corrigée par l'urée (dosage enzymatique)
(15)	40	2-7	5-17.5%	ELISA
(16)	40	3.2	8%	ELISA

Dans l'ensemble, ces résultats sont en accord avec la précédente étude. En principe, à une telle concentration protéique, la liaison aux protéines dans l'ELF devrait être négligeable, en particulier pour les molécules faiblement (<50%) ou moyennement liées (entre 50 et 80%) (17). Cependant, pour les molécules fortement liées (>80%), il convient d'être prudent. Dans le cas de la dicloxacilline, qui est liée à 97% aux protéines plasmatiques, approximativement 85% restent liés à une concentration en albumine de 10 mg/mL (17, 18). Selon les sources, la concentration en albumine dans l'ELF est 1.5 à 20 fois inférieure, mais une liaison reste possible.

On retrouve également des protéines spécifiques des tensioactifs. Elles représentent jusqu'à 10% de la matière récupérée lors l'un lavage broncho-alvéolaire (LBA) (19), dont les protéines tensioactives A et D (SP-A et SP-D) en représentent la majorité. Elles font partie de la famille des collecteurs d'hydrates de carbone dépendant du calcium. Elles sont impliquées dans l'organisation des phospholipides qui agissent comme tensioactifs au sein des alvéoles. Elles ont également un rôle dans les mécanismes de défense de l'hôte. SP-A et SP-D peuvent se lier aux lipopolysaccharides de certaines bactéries et activer les macrophages alvéolaires (20).

Des enzymes sont également présentes, du mucus des voies aériennes supérieures au surfactant des alvéoles. Un métabolisme précoce peut être initié dès l'administration d'un médicament, par des aldehydes déshydrogénases, des glutathiones transférases, des époxydes hydrolases et des monooxygénases cytochrome-P450-dépendantes (21).

Au sein de l'ELF sont également présentes des cellules du système immunitaire. D'après l'étude de Rennard et al.(11), après 5 lavages de 20 mL chez l'homme, la densité de cellules est de $210 \pm 30 \times 10^3$ cellules/mL de lavage. Après correction par le facteur de dilution, la densité dans l'ELF a pu être évaluée à $21 \pm 3 \times 10^6$ cellules/mL, dont $83 \pm 8 \%$ de macrophages, $17 \pm 2 \%$ de lymphocytes et $1 \pm 0.3 \%$ de neutrophiles. En multipliant cette densité cellulaire par le volume moyen des différentes cellules (2.5 à 5×10^{-6} μL pour le macrophage, 0.2 et 0.3×10^{-6} μL pour le lymphocyte et le neutrophile respectivement (22–25)), la part du volume de l'ELF constitué par des cellules peut être estimée entre 4 et 10% chez l'homme (26).

3. Le système vasculaire

L'artère pulmonaire reçoit la totalité du débit sortant du cœur droit. Puis l'artère se divise jusqu'à faire un réseau de capillaires. Le débit au niveau des capillaires pulmonaires a été estimé à 3.31 L/min/m² par étude de la disparition pulmonaire du protoxyde d'azote (N₂O) et du chloroforme (C₂H₂) après inhalation (27). D'autres équipes ont déterminé des données similaires, qui sont résumées dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Débits capillaires pulmonaires

Cournand (28)	Chapman (29)	Stead (30)	Ebert (31)
3.12 L/min/m ²	3.27 L/min/m ²	3.16 L/min/m ²	3.59 L/min/m ²

Chaque capillaire a un diamètre proche de 10 µm, ce qui est légèrement supérieur au diamètre d'un globule rouge qui est inférieur à 7 µm, comme on peut le voir dans la Figure 1. Chaque globule rouge passe 3-4 secs dans le réseau capillaire (dû à la diminution du débit de l'artère pulmonaire de 5L/min au niveau des capillaires, de l'ordre du nL/min) qui couvre une surface d'environ 70 m² (10). Ce temps est suffisant pour être au contact de 2 ou 3 alvéoles et que l'équilibre entre l'oxygène dans les alvéoles et le dioxyde de carbone lié dans les globules rouges se fasse (1) et dans le même temps pour permettre le passage de molécules comme des médicaments. Ce temps sera plus long pour des molécules plus grandes. Bien que les capillaires soient fenestrés et laissent diffuser des molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1000 kDa, les cellules alvéolaires sont reliées par des jonctions serrées, donc étanches. Pour être absorbées, ces molécules doivent obligatoirement traverser l'épithélium alvéolaire (32).

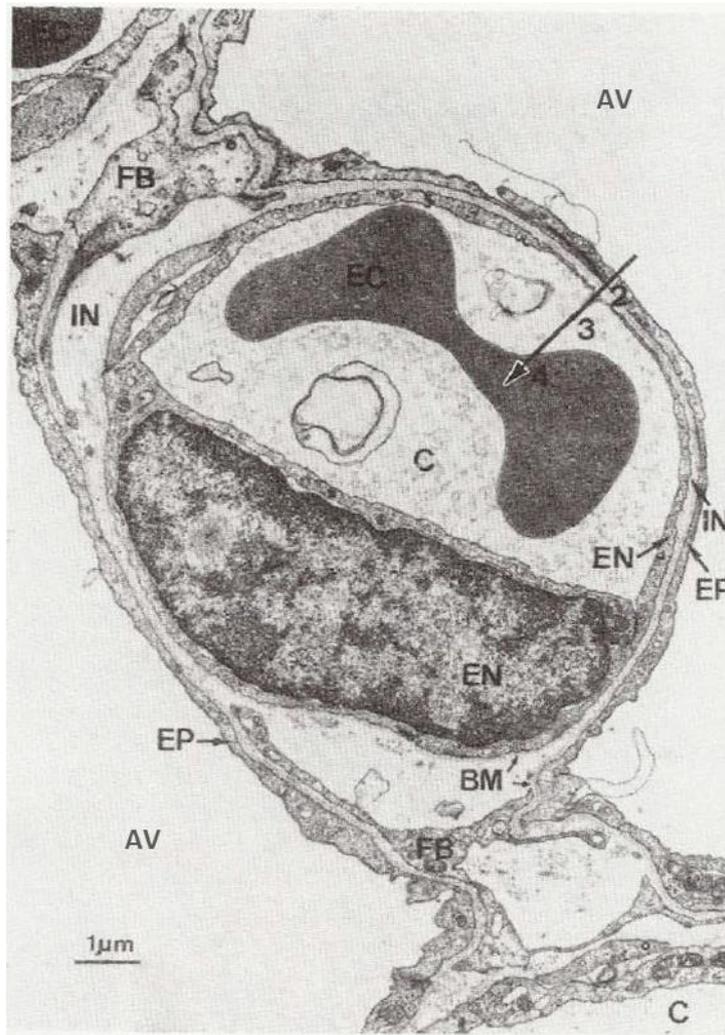


Figure 1 : Photographie par microscopie électronique de la barrière alvéolo-capillaire. Il s'agit d'un capillaire (C) entre deux alvéoles (AV). Pour être absorbé, un composé doit suivre le chemin de diffusion indiqué par la flèche. Il doit franchir l'épithélium pulmonaire (EP), l'espace interstitiel (IN) et l'épithélium capillaire (EN). Dû à sa faible épaisseur, le surfactant alvéolaire n'est pas visible sur la photographie. On note la présence d'un globule rouge (EC) au centre du capillaire. Adapté de (1).

Le poumon, par sa large surface d'absorption (la deuxième plus large surface de l'organisme après le tractus gastro-intestinal), est une voie d'administration qui présente plusieurs intérêts : le poumon est un cul-de-sac physiologique où 100% de la dose est disponible pour être absorbée et l'action peut être locale (cas des infections pulmonaires). Mais cette voie comporte quelques difficultés, notamment le contrôle de la dose administrée (dose exacte qui emprunte la trachée vs œsophage, disposition le long de l'arbre bronchique) et le suivi de la pharmacocinétique locale. Pour pouvoir évaluer cette pharmacocinétique

locale, nous allons nous intéresser aux mécanismes de la diffusion à travers la barrière alvéolo-capillaire.

B. Mécanismes du transport à travers la barrière alvéolo-capillaire

La barrière alvéolo-capillaire est composée du surfactant qui tapisse les alvéoles, de l'épithélium alvéolaire, de l'espace interstitiel ainsi que de l'épithélium capillaire. Elle est très fine (0.3 μm au minimum) et couvre une très large surface, comme précédemment mentionnée (environ 100 m²). Cette surface est étanche, car les cellules forment des jonctions serrées, limitant fortement le passage paracellulaire des molécules. Ces dernières doivent donc emprunter la voie transcellulaire pour être absorbées et il en existe deux mécanismes : la diffusion passive ou l'intervention de transporteurs actifs. Dans le cas des macromolécules, une autre possibilité est la prise en charge par des vésicules au pôle apical des cellules pour être transportées jusqu'au pôle basolatéral (endocytose par fixation à des récepteurs membranaires). C'est le cas par exemple de l'albumine et de l'insuline (33).

1. Diffusion passive

Elle intervient systématiquement, que la molécule soit lipophile ou hydrophile. Cependant, les mécanismes mis en jeu seront différents en fonction de la lipophilie/hydrophilie. Les composés lipophiles par leur capacité à traverser aisément les membranes, diffusent à travers les cellules (diffusion transcellulaire). Les molécules hydrophiles diffuseront à travers les jonctions serrées (diffusion paracellulaire), en fonction de leur taille, les plus petites diffuseront le plus facilement et les plus gros poids moléculaires diffuseront difficilement. La limite est souvent fixée à 11 Å (30).

La diffusion est décrite par la loi de Fick (Équation 1), où la vitesse de diffusion (ou le flux de matière) J est dépendante d'un coefficient de diffusion (ici la perméabilité membranaire P) et du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane ($C_0 - C_i$) :

Équation 1 : Equation de la loi de Fick

$$J = P \times (C_0 - C_i)$$

2. Les transporteurs d'efflux cellulaires

Les transporteurs d'efflux cellulaires sont des protéines intégrées aux membranes qui améliorent la fonction primaire de la membrane en effluant les composés qui la traversent. Les composés efflués peuvent être la molécule parent, son conjugué ou un métabolite. Ayant un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, les transporteurs ou les protéines liées aux transporteurs sont codés par environ 2000 gènes, ce qui représente environ 7% du nombre total de gènes (34).

Ces transporteurs sont dits actifs car l'export de substrats contre leur gradient de concentration requière de l'énergie. Des domaines de liaison aux nucléotides sont présents dans ces transporteurs afin de lier l'ATP dont l'hydrolyse fournira l'énergie nécessaire au transport, malgré des gradients de concentrations parfois considérables. Comme le premier transporteur d'efflux découvert, la glycoprotéine-P (P-gp, ABCB1 et MDR1), la plupart des transporteurs est composée de deux sous-unités à 6 domaines transmembranaires. MRP1, 2 et 3 (Multidrug Resistance-associated Protein, ABCB1, 2 et 3) possèdent en plus une autre sous-unité à 5 domaines transmembranaires, et BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2) n'a qu'une seule sous-unité à 6 domaines transmembranaires (Figure 2) (35). Tous les transporteurs possèdent des branches extracellulaires N-glycosylées, dont la fonction n'est pas

encore bien connue. Ces branches ne sont pas nécessaires à la fonction de transport d'après des études *in vitro* (36). Des hypothèses sur leurs rôles d'aide à l'insertion dans la membrane et à sa stabilisation au sein de la membrane ont été émises (35).

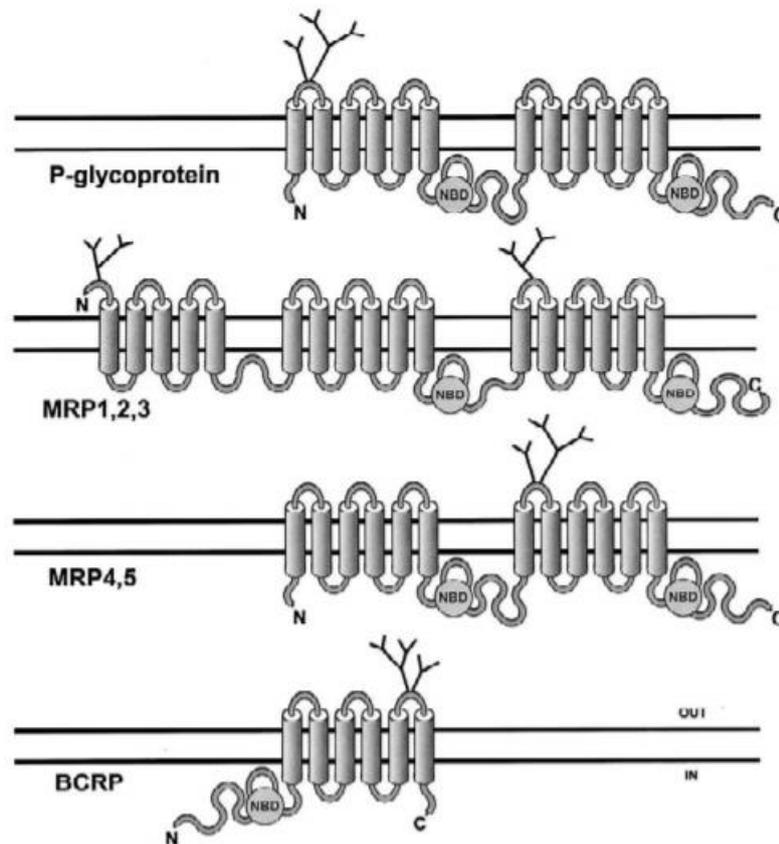


Figure 2 : Structure des pompes d'efflux de la famille des transporteurs ABC (NBD = domaine de liaison aux nucléotides).

- Pgp

La P-gp (ABCB1 dans la nomenclature des transporteurs cellulaires) a été le premier transporteur d'efflux découvert, par Juliano et Ling en 1976 dans des cellules ovariennes de hamster chinois, qui avaient été sélectionnées pour leur résistance à la colchicine (37). Cette souche cellulaire présentait également une résistance croisée à un large éventail de molécules amphiphiles. Comme cette altération de la perméabilité des composés était due à une glycoprotéine de surface, les auteurs l'ont nommée P-gp. Par la suite, ce transporteur a été abondamment étudié au cours des 50 dernières années (38). Son autre nom, MDR1 (pour

MultiDrug Resistance protein), vient du fait que de nombreux médicaments sont transportés par cette protéine. En premier lieu on retrouve des molécules anticancéreuses cytotoxiques, qui ont été les premiers substrats décrits car les cellules tumorales surexpriment la P-gp. Mais d'autres molécules sont également transportées, qui sont le plus souvent d'une taille de 200 Da à 1900 Da. La plupart contiennent un noyau aromatique, mais des composés circulaires ou linéaires non aromatiques sont également transportés. En plus de leur similarité de structure, les molécules transportées ont généralement un caractère amphiphile. Ce sont des molécules non-chargées, ou faiblement basiques, bien que certains composés acides soient également pris en charge comme le méthotrexate ou la phénytoïne. La nécessité du caractère amphiphile vient du fonctionnement de la P-gp. Le substrat de la P-gp doit s'insérer dans la bicouche lipidique de la membrane avant d'être pris en charge par le transporteur pour finalement être efflué dans le milieu extracellulaire (39). Cela a été montré avec des composés de membrane comme la phosphatidylcholine, où le substrat est « capturé » à partir du feuillet interne de la membrane (40–42). Les composés doivent pouvoir traverser la membrane pour être pris en charge par le transporteur. La diffusion passive et le transport par les transporteurs d'efflux sont deux phénomènes qui agissent en sens contraire. Si la diffusion est trop importante, elle peut saturer l'activité de la pompe d'efflux.

La P-gp a été localisée dans de nombreux tissus, principalement au pôle apical des cellules (43) : au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (44), de la barrière hémato-testiculaire (45), hémato-nerveuse (46), materno-fœtale (47, 48), des canaux biliaires (43), de l'intestin (43), des reins (48) et du poumon (48). Le rôle est de protéger l'organisme en limitant l'absorption et/ou facilitant l'excrétion des composés exogènes. Dans le cas de la BHE, sans la P-gp, le cerveau serait 10 à 100 fois plus exposé aux substrats de la P-gp, avec des conséquences pharmacologiques cliniques (49, 50). Pour évaluer l'impact de la P-gp sur la distribution et la pénétration d'un substrat dans un organe, on peut utiliser des animaux

« knock-out », c'est-à-dire dont l'expression de la P-gp a été supprimée, ou on peut utiliser des inhibiteurs de la P-gp. Plusieurs de ces inhibiteurs sont eux-mêmes des substrats, suggérant une inhibition par compétition. C'est le cas de plusieurs principes actifs de médicaments, comme le vérapamil (inhibiteur calcique) ou la cyclosporine A (immunosuppresseur). Du fait de leur action pharmacologique, ces inhibiteurs sont moins utilisés. De nouveaux inhibiteurs (deuxième ou troisième génération) ont été développés, pour leur plus forte affinité ou pour leur manque d'effet pharmacologique. Parmi eux, il y a le PSC 833 qui est un analogue de la cyclosporine A, mais sans l'effet immunosuppresseur. Il peut donc être donné aux patients (51, 52). Cependant, le PSC 833 est également un inhibiteur enzymatique du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) (53). Lors d'études cliniques, il peut donc y avoir des modifications des clairances enzymatiques des composés substrats du CYP3A4, comme c'est le cas avec l'étoposide et la doxorubicine dont l'usage concomitant avec le PSC 833 nécessite une réduction de la posologie (51). Le GF120918 a été développé pour cette absence d'interaction enzymatique (54). Le GF120918 n'est pas sélectif de la P-gp, il inhibe également le transporteur BCRP (55). Cela peut être un avantage pour une utilisation clinique mais il est plus difficile d'utilisation pour une approche d'inhibition sélective de la P-gp. Le dernier inhibiteur de la deuxième génération est le LY335979, qui a été développé pour sa forte affinité avec la P-gp (56). Cependant, comme le PSC 833, il est également inhibiteur du CYP450 mais dans une moindre mesure (56). Deux inhibiteurs de troisième génération, le OC144-093 et le XR9576 apparaissent comme des inhibiteurs de forte affinité pour la P-gp et n'altèrent pas le métabolisme du paclitaxel (57, 58).

- MRP

Le premier transporteur de cette famille, MRP1 (=ABCC1), a été découvert dans une lignée cellulaire résistante à la doxorubicine (59). De nombreux agents anticancéreux sont substrats de ce transporteur, comme des anthracyclines (doxorubicine, épirubicine), des camptothécines (topotécan), des alcaloïdes (vincristine, vinblastine), des épipodophyllotoxines (étoposide). Certains métaux lourds sont également substrats (arsenic et antimoine trivalent). Le point commun de ces substrats est leur capacité à se conjuguer à la glutathione (GSH). En effet, MRP1 fonctionne comme un co-transporteur de composés organiques amphiphiles anioniques (60–63). Les composés hydrophobes sont co-transportés avec la GSH réduite, permettant leur export en dehors de la cellule.

MRP1 est situé au niveau basolatéral des cellules, donc devrait avoir une action inverse à la P-gp en permettant l'absorption de composés. Mais cela a tout de même une importance pharmacologique : dans certains tissus (tubules testiculaires, muqueuse oropharyngienne, plexus choroïde), c'est le côté basolatéral qui fait face au sang. Ce transporteur permet donc aux cellules de ces tissus de se protéger des toxiques venant du sang. Des souris déficientes en P-gp et MRP1 ont eu une augmentation de la sensibilité à des agents anticancéreux (x128 pour la vincristine et x3.5 pour l'étoposide) en comparaison à des souris non déficientes, tandis que des souris uniquement déficientes en P-gp ont été seulement plus sensibles d'un facteur 16 et 1.75 pour la vincristine et l'étoposide respectivement (64). Les organes les plus touchés par cette augmentation de la sensibilité (et donc par une toxicité) ont été la moelle osseuse et la muqueuse gastro-intestinale, suggérant que ces tissus sont, en conditions normales, protégés à la fois par la P-gp mais aussi par MRP1.

Il existe peu d'inhibiteurs de MRP1 : le plus utilisé est MK571, un analogue d'un médiateur de l'inflammation, le leucotriène LTC₄, lui aussi pouvant se conjuguer au GSH (60). Les inhibiteurs de la P-gp comme la cyclosporine A et le PSC 833 peuvent également inhiber

MRP1. Mais leur affinité est plus faible pour MRP1 que pour la P-gp, donc leur utilisation n'est pas spécifique (60).

MRP2 (=ABCC2) est une isoforme de MRP1, mais situé au niveau apical des cellules. Comme MRP1 également, il transporte principalement des composés organiques anioniques, couplés au GSH. Une étude a montré qu'une population de cellules (MDCK : cellules canines de rein Madin-Darby) surexprimant MRP2 avait une plus grande résistance à des composés anticancéreux comme l'étoposide et la vincristine (respectivement 5 et 2.3 fois) et que l'ajout de L-buthionine sulfomixine créait une déplétion en GSH et entraînait une diminution du transport de ces composés (65). Une autre population de cellules, HEK-293 (cellules embryonnaires de rein), surexprimant elle aussi MRP2 avait une résistance accrue à l'étoposide, au cisplatine, à la doxorubicine et à l'épirubicine (respectivement 4, 10, 7.8 et 5 fois plus résistantes)(65). Ainsi, MRP2 est semblable à la P-gp, de par sa localisation et sa capacité à effluer non seulement les composés anticancéreux mais aussi d'autres substrats. Certains substrats sont communs aux deux transporteurs, comme l'étoposide, mais certains sont propres à un transporteur, comme la digoxine pour la P-gp ou le leucotriène LTC₄ pour MRP.

Pour l'instant, peu de molécules peuvent inhiber MRP2. On compte parmi elles la cyclosporine A et PSC 833, qui inhibent également la P-gp et MRP1. MK571 apparaît comme un inhibiteur assez spécifique de la famille MRP (IC_{50} = 10 μ M, 26 μ M et 50 μ M pour MRP2, P-gp et BCRP respectivement), mais aucun inhibiteur n'est vraiment spécifique d'une isoforme de MRP (66).

D'autres isoformes de MRP existent. MRP3 (=ABCC3) et 5 (=ABCC5) sont situés au pôle basolatéral comme MRP1 ; MRP4 (=ABCC4) est situé au pôle apical comme MRP2. Dans

l'ensemble, ces transporteurs ont les mêmes fonctions et les mêmes substrats que leur voisin (étoposide pour MRP3, topotecan pour MRP4, methotrexate pour MRP5)(67).

- BCRP

Bien que BCRP (Breast Cancer Related Protein, également connu comme ABCG2 dans la nomenclature des transporteurs) soit le dernier transporteur découvert parmi cette liste (68), il est de nos jours l'un des transporteurs les plus étudiés. Comme son nom l'indique, BCRP a été décrite pour la première fois dans une lignée cellulaire de cellules cancéreuses du sein hautement résistantes à la mitoxantrone avec une résistance croisée à la doxorubicine (69) ; BCRP est situé au pôle apical des cellules, comme la P-gp et MRP2. Leur distribution tissulaire se chevauche également, avec une présence confirmée dans le rein, le foie (épithélium des canalicules biliaires), les villosités de l'intestin ou le poumon. BCRP est également présent au niveau du placenta, faisant face au sang maternel et protégeant le fœtus des toxiques. En comparant leurs substrats, BCRP apparaît également proche de la P-gp, avec un efflux du mitoxantrone, doxorubicine, daunorubicine et topotécan. BCRP est moins proche de MRP2, puisque ses substrats n'ont pas besoin d'un cotransport avec la GSH (68, 70, 71).

BCRP est inhibé par GF120918, un inhibiteur commun à la P-gp et à BCRP. Il n'est pas utilisable pour cibler un transporteur spécifiquement mais peut avoir des intérêts cliniques (54, 72). La fumitremorgine C et ses analogues sont des inhibiteurs assez sélectifs de BCRP. Mais leurs effets neurotoxiques les empêchent d'être applicables en clinique, bien qu'ils puissent être utilisés dans des études *in vitro* (73, 74). Les analogues Ko (Ko132, 134 et 143) apparaissent comme les plus utilisables, car très actifs *in vitro* et peu cytotoxiques (66, 75, 76).

La distribution pulmonaire est gouvernée par de nombreux facteurs dont certains sont propres à chaque molécule : sa physicochimie (masse moléculaire, logP et logD, solubilité, état d'ionisation, surface polaire) et le fait qu'elle soit substrat d'une pompe d'efflux. Parmi ces facteurs, certains sont devenus des paramètres de classification entre molécules, afin de prédire leur absorption.

II. Les classifications biopharmaceutiques

A. La BCS

Dans un but de prédiction précoce de la PK *in vivo*, une classification biopharmaceutique a été développée en 1995 par G. Amidon (77). Elle fait la corrélation entre le profil de dissolution *in vitro* du composé et sa biodisponibilité *in vivo* en s'appuyant sur deux paramètres : la solubilité pour la partie dissolution, et la perméabilité pour caractériser le taux d'absorption. Au final, il est possible de prédire le comportement pharmacocinétique *in vivo* d'une molécule à partir de ces deux paramètres, donc seulement à partir d'études *in vitro*. Cela est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique, afin de procéder au plus tôt à un tri efficace des candidats et donc de ne garder que les molécules intéressantes.

Une molécule est considérée comme très soluble si sa plus forte dose administrée (le plus fort dosage) peut être solubilisée dans 250 mL d'eau ou moins, sur une gamme de pH allant de 1 à 7.5 et à 37°C (78).

Une molécule est considérée comme très perméable si son taux d'absorption (parent plus métabolite(s)) correspond à au moins 85% de la dose administrée (détermination par une étude de la balance massique ou par comparaison avec la voie intraveineuse (77)).

Les composés sont triés en 4 classes (Figure 3) :

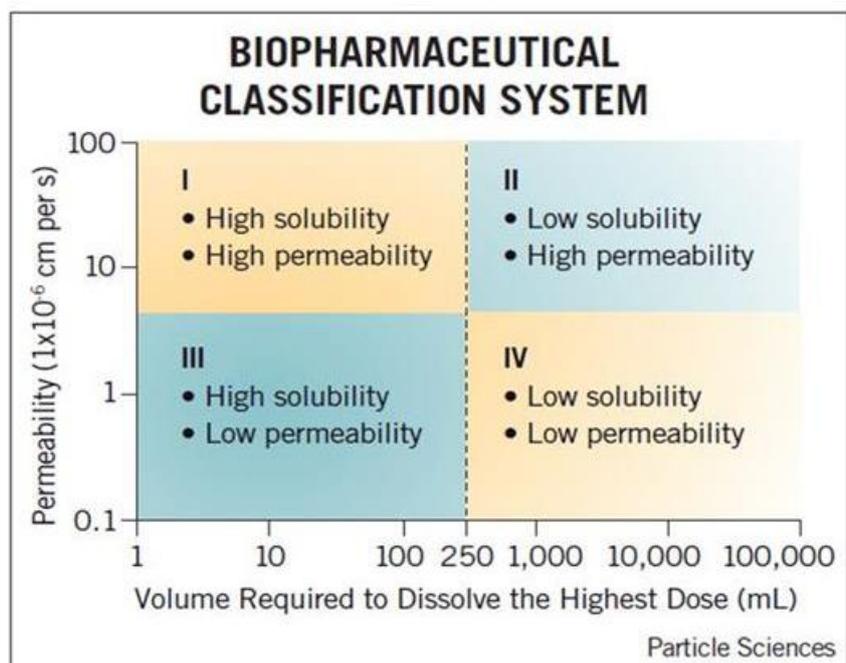


Figure 3 : Classification biopharmaceutique (BCS) d'Amidon *et al.* basée sur la perméabilité et la solubilité des composés (77)

Classe I : Très soluble et très perméable.

Classe II : Peu soluble et très perméable

Classe III : Très soluble et peu perméable

Classe IV : Peu soluble et peu perméable

B. BDDCS

La BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System = Classification basée sur l'élimination des composés) dérive de la BCS et s'appuie également sur la solubilité pour classer les composés (79). Mais pour le second paramètre (la perméabilité), il a été observé qu'une majorité de composés de la classe I et II (fortement perméables) de la BCS étaient éliminés par métabolisme, alors que les composés peu perméables (classe III et IV) étaient éliminés sous forme inchangée dans les urines et/ou la bile. En effet, les composés lipophiles sont généralement éliminés par métabolisme, afin que leurs métabolites plus hydrophiles, qui

ont une perméabilité membranaire plus faible, soient éliminés par excrétion rénale ou biliaire. Cette relation entre perméabilité et métabolisme est la base de la BDDCS. Le paramètre de perméabilité de la BCS est donc devenu la proportion du métabolisme dans l'élimination du composé (Figure 4).

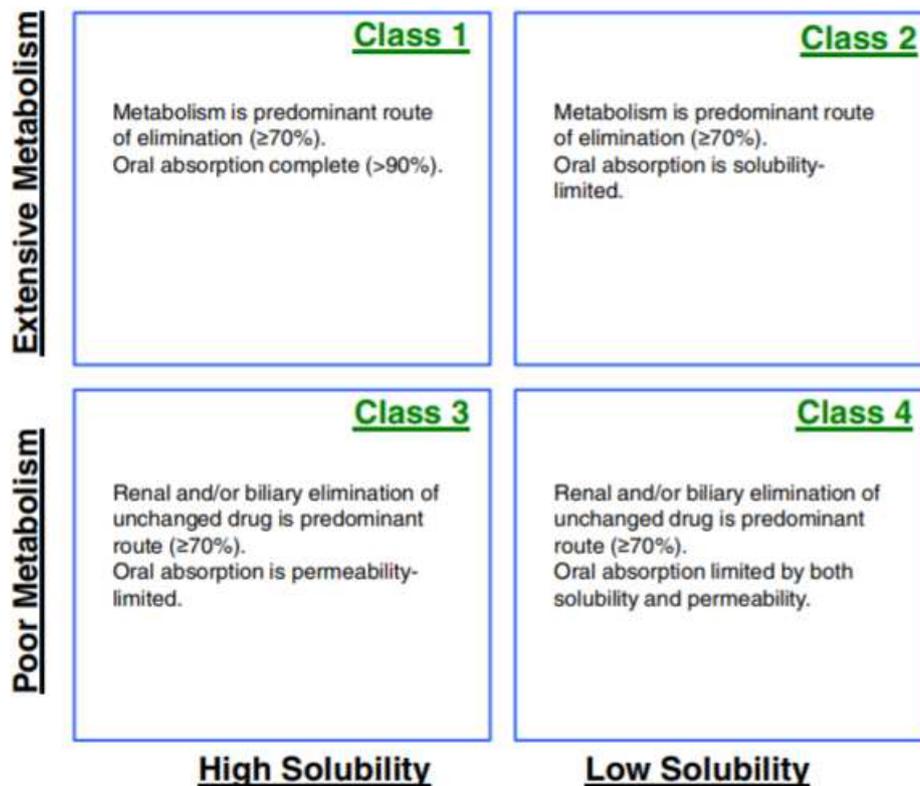


Figure 4 : Classification biopharmaceutique basée sur l'élimination des composés et leur solubilité (79)

La différence principale entre les deux classifications se situe ici, à savoir si le paramètre perméabilité de la BCS (qui est définie comme l'absorption orale) est considéré comme un débit (absorption rapide vs lente) ou une proportion (absorption complète ou incomplète). Ces deux paramètres, même s'ils semblent similaires, ne sont pas interchangeables. Dans l'exemple du sotalol, qui a une P_{app} de 1.5×10^{-6} cm/s dans la lignée cellulaire Caco-2 et qui est absorbé à 95%, deux autres composés ont une absorption différente malgré une perméabilité similaire : l'aténolol n'est absorbé qu'à 50% et l'acébutolol à 70% (67). La FDA avait considérée, dans l'implémentation de la BCS dans les guidelines, qu'une molécule très

perméable avait une absorption supérieure à 90% chez l'humain (67). Or pourquoi des molécules ayant la même perméabilité (Papp) seraient classées dans des catégories différentes ? Pour s'affranchir de cette question, dans la BDDCS, ce tri en fonction de la perméabilité est donc devenu un tri en fonction du métabolisme. Soit une molécule est éliminée majoritairement par métabolisme (>70%), soit son métabolisme est minoritaire (<30%). Peu de molécules ont un taux de métabolisme compris entre 30 et 70% (80). Une molécule qui a un fort métabolisme (> 70% de la dose administrée) a par extension une forte absorption (car pour être métabolisée, elle doit être absorbée), mais l'inverse n'est pas systématiquement vrai.

Ces classifications sont utilisées dans plusieurs contextes :

- Prédiction précoce de la biodisponibilité des produits en développement : une biodisponibilité faible entraîne une variabilité plus importante de l'absorption, donc un candidat médicament difficile à développer.
- Etude de bioéquivalence: des molécules classées BCS I sont dispensées par la FDA d'études de bioéquivalence si la formulation permet une dissolution rapide (78).

Plusieurs classifications ont été établies, afin de prédire l'absorption et l'élimination des composés. Mais ces différentes classifications sont utilisées exclusivement pour des médicaments administrés par voie orale. D'autres voies d'administration sont de plus en plus utilisées, soit pour une action locale, soit pour le confort du patient. Parmi elles, la voie pulmonaire. On se propose ici de développer une classification biopharmaceutique utilisable pour les médicaments destinés à être administrer via le poumon.

C. La classification biopharmaceutique pour la voie pulmonaire pBCS

Les classifications présentées précédemment sont faites pour la voie orale et sont donc peu adaptées à la voie pulmonaire. En effet, le but d'une classification biopharmaceutique pour l'administration pulmonaire (pBCS) serait de prédire quel composé aurait l'avantage d'être nébulisé. Pour cela, on peut toujours trier les composés en fonction de leur perméabilité. Les composés seraient départagés en deux classes : les composés fortement perméables, qui seraient fortement absorbés et donc utilisés pour une action systémique et les composés peu perméables, avec une absorption limitée et qui seraient utilisés pour une action locale. Au contraire des classifications qui s'appuient sur la fraction absorbée (seuil entre les molécules fortement et faiblement perméables fixé à 85 ou 90% de la dose absorbée), il est nécessaire d'avoir un autre paramètre pour la pBCS. Car pour la voie pulmonaire, presque toute la dose est absorbée. Une partie peut être exhalée, ou éliminée par la clairance muco-ciliaire. Mais cette partie est très minoritaire par rapport à celle absorbée. Il faut donc un autre paramètre que la fraction absorbée pour définir la perméabilité.

Comme vu lors de la description des classifications, la perméabilité des composés est un paramètre majeur. Pour l'absorption après administration par voie orale, l'important est de savoir si la totalité ou non du composé va être absorbée pendant le temps de transit dans le tractus gastro-intestinal. Pour évaluer l'absorption des composés, on peut comparer leur vitesse d'absorption, comme pour l'ECCS. Celle-ci peut être évaluée par des modèles cellulaires (*in vitro*), ou par étude de l'absorption dans un organe isolée (*ex vivo*) ou chez l'animal (*in vivo*). Ces modèles seront détaillés par la suite. Mais est ce que les transporteurs d'efflux sont pris en compte lors de ces études de diffusion ?

D'une certaine mesure oui. Dans les cas des transporteurs d'efflux situés au pôle apical des cellules pulmonaires (P-gp, MRP2 et BCRP), leur action permet de limiter l'absorption des composés. Avec l'ajout d'un inhibiteur du transporteur impliqué, la perméabilité d'absorption

augmente. Cela a été montré dans l'étude de Mahar Doan *et al.* (81) où le passage de la BHE était testé pour plusieurs composés sur un modèle *in vitro* de MDCK (canine kidney cells, cellules canines de rein) de type II transfectées MDR1. Certains composés comme le labétolol, l'élétriptan et l'ampénavir montraient un ratio supérieur à 1 entre la perméabilité d'absorption (du sang vers le cerveau) et la perméabilité sécrétoire (du cerveau vers le sang). Cela témoignait d'un efflux par un transporteur. Après ajout d'un inhibiteur, dans ce cas du GF120918, le ratio s'est normalisé et ils ont observé une augmentation de la perméabilité d'absorption (Tableau 4).

Tableau 4 : Perméabilités d'absorption et de sécrétion du labétolol, élétriptan et ampénavir sans et avec inhibition de la P-gp sur un modèle *in vitro* de MDCK de type II transfectées MDR1 (81).

En nm/s	Perméabilité d'absorption	Perméabilité de sécrétion	Ratio	Perméabilité d'absorption avec inhibition	Ratio avec inhibition
Labétolol	40.9	362	8.85	73.7	1.05
Elétriptan	14.8	663	44.7	429	1.09
Ampénavir	28.8	834	29	401	1.28

Si le composé est administré par voie pulmonaire pour une action locale, comme un antibiotique pour une infection pulmonaire, cette propriété de diminution de la perméabilité est intéressante. Si l'absorption est limitée, les concentrations locales sont augmentées et donc l'efficacité est accrue. Mais la seule information de la perméabilité d'absorption ne permet pas de savoir si le composé est substrat d'efflux. Cela est dicté par le ratio entre la perméabilité d'absorption et la perméabilité de sécrétion. Si ce ratio est supérieur à 2 (*in vitro* metabolism and transport mediated drug-drug interaction studies, guidance for industry, 2017, FDA), on

considère que le composé est substrat d'un composé d'efflux. Les transporteurs d'efflux diminuent donc la vitesse d'absorption des composés substrats.

Mais ces transporteurs d'efflux aident aussi à la distribution vers le poumon après administration systémique. Dans le cas de la moxifloxacin chez le rat, après administration par voie IV, l'AUC dans l'ELF est supérieure à l'AUC dans le plasma (82). Cela témoigne d'un transporteur d'efflux pulmonaire. Mais après nébulisation, on observe le même ratio AUC ELF/plasma qu'après administration systémique. La nébulisation n'a donc apporté aucun avantage. Cela vient du fait que la moxifloxacin est une molécule assez lipophile ($\log P = -0.5$), et qui a par conséquent une bonne diffusion dans l'organisme. L'équilibre entre le plasma et le poumon est si rapide que la voie d'administration n'a aucun impact sur les concentrations pulmonaires.

Dans le cas d'une molécule peu perméable, comme la tobramycine ($\log P = -6.5$), après administration systémique, le ratio des AUC ELF/plasma est égal à 1 (83). La tobramycine diffuse donc vers le poumon uniquement passivement, sans intervention d'un transporteur d'efflux. Mais après nébulisation, ce ratio devient très important, supérieur à 100. La voie d'administration a donc un véritable impact sur les concentrations pulmonaires des molécules peu perméables.

Les transporteurs d'efflux permettent donc de diminuer la perméabilité d'absorption des composés substrats, mais leur intervention n'est pas forcément suffisante pour permettre un avantage à la nébulisation. Il y aurait donc un seuil entre les composés fortement et faiblement perméables. Nous allons maintenant voir les modèles qui permettent d'étudier cette perméabilité.

III. Les modèles d'étude

A. Les modèles *in vitro*

Le modèle cellulaire le plus intuitif pour étudier le passage à travers l'épithélium pulmonaire est la culture de cellules primaires. Des protocoles pour l'isolation et la culture des cellules épithéliales trachéo-bronchiques existent depuis plus de 40 ans, pour de nombreuses espèces. Ces protocoles utilisent des cellules de phénotypes différents et généralement, ces cultures sont de bons modèles pour l'étude du transport des molécules. Cependant, au fur et à mesure des passages, les cellules perdent la capacité à former des jonctions serrées et il en résulte une forte augmentation de la perméabilité paracellulaire. L'utilisation de ce modèle est donc limitée dans le temps. Il existe des modèles commercialisés prêt à l'emploi (comme EpiAirway™ system) mais sont peu utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour des raisons de coût, car il est nécessaire de les renouveler fréquemment. Des modèles issus de lignées cellulaires leur sont généralement préférés.

Pour étudier le passage à travers l'épithélium pulmonaire, on cultive ces lignées cellulaires sur des inserts constitués d'une membrane microporeuse de 0.4µm. La culture peut se faire en condition LLC (Liquid covered culture), c'est-à-dire que les pôles apical et basolatéral de la monocouche de cellules sont en contact avec le milieu de culture ; ou en condition AIC (Air interface culture), où seul le pôle basolatéral est en contact avec le milieu de culture et le pôle apical fait face à l'air. Cette dernière condition est donc plus proche physiologiquement que la condition LLC. Quand les cellules sont confluentes, il est possible de faire une étude de transport. Pour cela, en fonction du sens du transport étudié, l'un des deux pôles de la monocouche est mis en contact avec une solution contenant la molécule. A des temps réguliers, des prélèvements sont effectués dans ce compartiment accepteur pour suivre la cinétique du transport à travers la membrane cellulaire. De cette cinétique on pourra calculer la perméabilité de la couche cellulaire à la molécule selon l'équation suivante (Équation 2) :

Équation 2 : Calcul de la perméabilité apparente

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{S \times C}$$

Où P_{app} est la perméabilité apparente de la couche cellulaire au composé étudié, dQ/dt est la quantité du composé qui est absorbée par unité de temps, S est la surface de la membrane microporeuse et C est la concentration initiale du composé dans le compartiment donneur. La perméabilité apparente est donc pondérée par la concentration initiale (une forte concentration mettra en jeu un gradient de concentration plus important et donc le flux à travers la membrane cellulaire sera également plus important) et indépendante du sens étudié. Si une molécule diffuse uniquement passivement à travers la couche cellulaire, la perméabilité apparente sera la même quel que soit le sens étudié. Il faudra également porter attention aux phénomènes de saturation si la molécule étudiée est substrat de transporteurs ; Dans ce cas, la perméabilité sera différente en fonction de la concentration initiale. L'intégrité de la membrane cellulaire est vérifiée dans les expériences de transport *in vitro* par deux techniques :

- La mesure de la résistance électrique trans-épithéliale (TEER), avant et après l'expérience de transport : elle permet de s'assurer que les jonctions serrées sont étanches et qu'il n'y a eu de phénomène de toxicité
- Le calcul de la perméabilité apparente d'une molécule test, comme la fluorescéine. Cette molécule est utilisée car très facilement dosable car fluorescente et on peut étudier son transport après l'expérience. En comparant sa valeur de perméabilité avec des valeurs références, on peut s'assurer de l'intégrité de la membrane cellulaire, mais *a posteriori* de l'expérience. La valeur de la perméabilité est généralement inférieure à 0.7×10^{-6} cm/s dans le modèle *in vitro* Calu-3 (84).

1. Calu-3

Il s'agit d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines, dérivées d'un adénocarcinome du poumon d'un homme caucasien de 25 ans (85). Elles ont pour origine précise les bronches proximales, entre la 3^{ème} et la 6^{ème} génération. Ces cellules forment une monocouche confluyente lorsqu'elles sont cultivées sur une membrane microporeuse. Elles ont également la propriété de sécréter du mucus car ce modèle intègre à la fois des cellules ciliées et des cellules sécrétrices. Les cellules forment des jonctions serrées, mises en évidence par une forte TEER, supérieure à 1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ dans le cas d'une culture en interface liquide/liquide (LLC) (86); ou entre 300 et 600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ dans le cas d'une culture en interface air/liquide (AIC) (3, 87). La mesure de la TEER est soumise à des nombreux facteurs influents, dont le type de culture, le nombre de passage, la surface de la membrane de support, la composition du milieu de culture et le temps de culture. Il en résulte une grande variabilité entre laboratoires (87). Des études ont montré que la culture en interface air/liquide génère une structure morphologique plus représentative de l'épithélium *in vivo* que les cellules cultivées en interface liquide/liquide car (i) les cellules sont recouvertes au pôle apical d'une fine épaisseur de mucus en AIC alors que les cellules en LLC ne présentent que des vésicules de sécrétion (ii) les cellules cultivées en LLC présentent une TEER plus élevée, qui témoigne de jonctions serrées plus restrictives. La présence de ces jonctions serrées fait des cellules Calu-3 un modèle utile pour l'étude du transport de molécules.

La lignée cellulaire Calu-3 exprime de nombreux transporteurs, qui ont été mis en évidence par 3 méthodes : la détection de leur ARNm (par Reverse Transcriptase-PCR : RT-PCR), par la détection de leurs protéines (western blot ou LC-MSMS) (Tableau 5) ou par détection indirecte (efflux de substrat comme la rhodamine 123 qui est substrat de la P-gp).

Tableau 5 : Expression des transporteurs d'efflux dans la lignée Calu-3

	Calu-3 jour 15 (RT-PCR) (88)	Calu-3 LC/MSMS (fmol/ μ g de protéines de la membrane plasmatique) (89)
MDR1 (P-gp)	++	<0.0780
MRP1	+++	2.69 \pm 0.58
MRP2	++	1.32 \pm 0.19
BCRP	+	2.99 \pm 0.47

+ = faible expression, ++ = expression modérée, +++ = expression élevée

La méthode de détection par LC/MSMS conclut à une absence de P-gp dans les Calu-3, or de l'ARNm a été découvert dans ces mêmes cellules par RT-PCR. De plus, l'efflux de la rhodamine 123 est présent, avec un ratio allant de 2.4 (90) à 11.5 (3). Cet efflux a également été mis en évidence au sein de notre laboratoire, avec une modification de la perméabilité en présence d'un inhibiteur de la P-gp (Figure 5). On peut donc en conclure que la P-gp est présente dans cette lignée cellulaire, malgré l'absence de détection de ses protéines par LC/MSMS bien que présentes en Western Blot (84) et par différentes études de mesures d'activités.

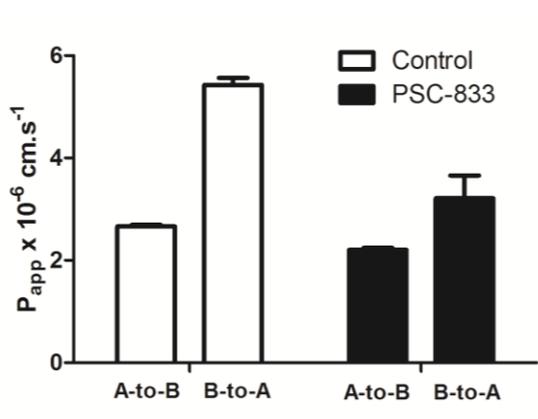


Figure 5 : Perméabilité apparente de la rhodamine 123 dans la lignée cellulaire Calu-3 avec ou sans inhibiteur de la P-gp (PSC-833) dans le sens apical vers basolatéral (A-to-B) et basolatéral vers apical (B-to-A). De (91)

2. NCI-H441

La lignée cellulaire NCI-H441 provient d'un adénocarcinome pulmonaire humain, mais d'origine plus distale que la lignée cellulaire Calu-3. Ces cellules présentent des caractéristiques de l'épithélium pulmonaire bronchique (cellules de Clara) mais également des marqueurs typiques des pneumocytes de type II comme les protéines de surfactant SP-A, SP-B, SP-C et SP-D (92). Tout comme les Calu-3, les cellules NCI-H441 forment des jonctions serrées et génèrent une TEER proche de celles des Calu-3 ($\approx 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ après 13 jours de culture en LLC et $\approx 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ en AIC). Cependant, cette lignée cellulaire nécessite l'utilisation de corticostéroïdes pour développer les jonctions serrées (TEER $< 100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ en l'absence de corticostéroïdes) (93).

La lignée cellulaire NCI-H441 exprime les principaux transporteurs d'efflux, comme la lignée Calu-3 (Tableau). Tout comme dans les Calu-3, la LC/MSMS n'a pas permis de mettre en évidence la P-gp (Tableau 6).

Tableau 6 : Expression des transporteurs d'efflux dans la lignée NCI-H441. De (89)

	NCI-H441 LC/MSMS (fmol/ μg de protéines de la membrane plasmique)
MDR1 (P-gp)	< 0.0780
MRP1	1.97 ± 0.25
MRP2	2.44 ± 0.25
BCRP	4.07 ± 0.94

Mais ce transporteur a été détecté par Western blot et immunofluorescence, ainsi que par des études indirectes en mesurant la perméabilité de substrats en l'absence ou en présence d'inhibiteur de ce transporteur (Figure 6) (93). Ici, la P-gp a été inhibée avec LY335979 (10

μM). À la suite de cette inhibition, le ratio entre les perméabilités A-B et B-A s'est normalisé, preuve de la présence d'un efflux par la P-gp.

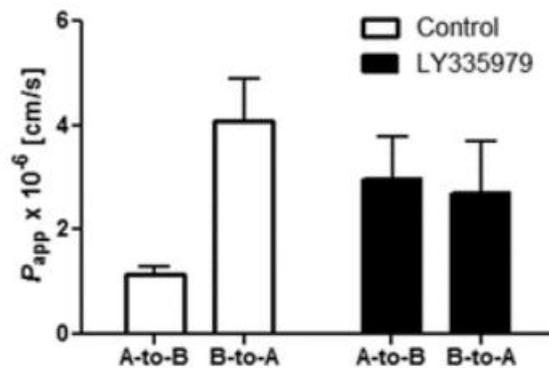


Figure 6 : Perméabilités de la rhodamine 123 sur la lignée cellulaire NCI-H441 avec ou sans inhibiteur de la P-gp (LY335979). De (93)

Tout comme les Calu-3, la lignée NCI-H441 possède des jonctions serrées et expriment tous les principaux transporteurs d'efflux qui sont retrouvés *in vivo*. Il s'agit également d'un bon modèle d'étude *in vitro* de la pharmacocinétique pulmonaire.

3. 16HBE14o-

Il s'agit d'une lignée cellulaire dérivée d'un épithélium pulmonaire non-cancéreux qui a été immortalisée par transfection virale (94). Ces cellules forment des couches polarisées, avec présence de microvillosités et de cils. La lignée 16HBE14o- forme des jonctions serrées, avec une TEER proche de $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ en LCC mais inférieure à $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ dans le cas de l'AIC (95). Cette lignée cellulaire ne se cultive donc qu'en condition LCC.

4. A549

Il s'agit de cellules alvéolaires, isolées elles aussi d'un adénocarcinome humain. Elles ont un phénotype proche des pneumocytes de type II et produisent des protéines de surfactant (96,

97). Cependant, ces cellules ne forment pas de jonctions serrées suffisamment étanches pour permettre des études de transport (98, 99).

B. *In vivo*

Schanker et al. ont été les pionniers dans les années 70 de l'étude *in vivo* du dépôt suivant une administration pulmonaire et de l'absorption qui s'en suit (100). Ils ont listé un large éventail de paramètres et de sources de variabilité qui existent et qui peuvent conduire à des différences entre laboratoires :

- Anesthésique utilisé (Pentobarbital, Isoflurane, Kétamine/xylazine ...)
- Accès à la trachée (trachéostomie, administration orotrachéale)
- Appareil utilisé pour l'administration (Seringue avec ou sans aiguille, microsprayer, insufflateur, inhalateur)
- Site de l'administration (en amont de la bifurcation trachéale)
- Position de l'animal (de 0 à 90° par rapport à l'horizontal)
- Volume/quantité administrés (de 10 à 500 µL)

La plupart des études ont été réalisées avec comme modèle un rat ou un cochon d'Inde. Des études avec de petits animaux ne requéraient que de petites quantités à administrer pour que les concentrations recueillies soient quantifiables. De plus, des animaux de cette taille pouvaient supporter de multiples prélèvements sanguins pour une cinétique, ce qui n'est pas le cas des souris par exemple. De plus gros animaux augmentaient les coûts.

Pour l'administration pulmonaire, plusieurs méthodes ont été développées :

- L'instillation intratrachéale directe avec hémisection de la trachée et insertion d'une canule jusqu'à la bifurcation trachéale

- L'instillation orotrachéale, avec utilisation d'un appareil de type microsprayer
- Intubation des animaux avec ventilation à pression positive d'un aérosol
- Exposition de l'animal vigile à un aérosol par utilisation d'un système « nose-only » où l'animal est enfermé dans un tube et où son museau est au contact d'un aérosol.

Il est possible d'évaluer les régions pulmonaires où ont eu lieu les dépôts à la suite d'une nébulisation grâce à la scintigraphie (101). Pour cela, un composé comme le technétium 99 est administré par nébulisation et après scintigraphie, il est possible de déterminer si la zone de dépôt est majoritairement trachéale, bronchique ou alvéolaire. Cependant, cette méthode ne permet pas de déterminer les concentrations d'un composé non radioactif.

Après administration, on peut suivre l'absorption du composé en effectuant une cinétique plasmatique sur animal cathétérisé. Mais si on souhaite connaître l'exposition du poumon, il faut pratiquer un prélèvement pulmonaire sur l'animal. Pour étudier cette pharmacocinétique au niveau du poumon, il existe plusieurs méthodes d'études :

- Homogénéat de tissus pulmonaires : c'est une technique simple mais destructive. Le poumon est prélevé, puis broyé pour faire un homogénéat. La concentration du composé étudié est donc déterminée dans cet homogénéat. Cette technique permet d'avoir une concentration moyenne ponctuelle de tous les compartiments pulmonaires : mucus, tissu, ELF, liquide interstitiel et sang. Et le plus souvent, cette méthode donne des résultats erronés (102). Dans le cas des molécules qui se distribuent dans le liquide interstitiel comme les β -lactames ou les aminosides, l'homogénéisation du tissu provoque le rassemblement du liquide interstitiel et du liquide intracellulaire, conduisant à une dilution des concentrations réelles, A l'inverse, les molécules à diffusion cellulaire prédominante auront lors de l'homogénéisation une hausse de leurs concentrations extracellulaires.

- Microdialyse : elle consiste en l'introduction d'une sonde semi-perméable dans un tissu (103–105). La sonde est perfusée avec une solution saline, qui s'équilibre au niveau de la membrane avec le milieu extracellulaire. Il est donc possible d'avoir un suivi des concentrations libres (seule la fraction libre peut diffuser à travers la membrane semi-perméable). Cependant, il s'agit d'une technique invasive (implémentation des sondes) et n'est que peu efficace pour le suivi des molécules lipophiles (faible rendement des sondes) et des molécules à diffusion intra-cellulaire (milieu inaccessible à la sonde) (106). Cette technique est utilisée en préclinique pour étudier la diffusion d'antibiotiques sur des rats sains ou infectés (105, 107–110). La mise en place de cette technique au niveau pulmonaire chez l'homme est compliquée car elle nécessite de travailler avec des patients qui doivent avoir recours à une chirurgie cardiothoracique (111–115). Chez ces patients, l'accès aux poumons est direct lors de la chirurgie et l'implémentation des sondes dans le parenchyme est possible. Dernièrement il a été possible de suivre la pharmacocinétique d'anticorps monoclonaux sur plusieurs jours chez le primate (116).

- Lavages bronchoalvéolaires (LBA) : il s'agit d'une technique semi-invasive chez l'homme et invasive chez le petit animal. Elle consiste en l'introduction d'une canule dans les bronches et réaliser des lavages du poumon par l'instillation d'un liquide et de son ré-aspiration après quelques secondes (117). Chez l'homme, l'introduction de la canule se fait par la cavité nasale ou par intubation chez le patient en réanimation, mais chez les petits animaux, l'introduction se fait obligatoirement au niveau de la trachée, après hémisection de celle-ci. Par conséquent, seul un prélèvement peut être réalisé par animal. Lors de la technique, mucus et surfactants sont récupérés mais dilués par le processus. Afin d'estimer les concentrations initiales, il est possible de déterminer ce facteur de dilution en utilisant les concentrations d'un marqueur de dilution. De nombreux marqueurs ont été étudiés : albumine, sphingomyéline,

immunoglobuline A, urée (118). Les deux premiers n'ont pas été validés en tant que marqueurs fiables. L'immunoglobuline A ne peut pas être utilisée dans le cas d'une étude avec une infection. L'urée est une petite molécule endogène non liée aux protéines et non polaire, qui diffuse dans l'ensemble de l'organisme. Ainsi, sa concentration dans l'ELF doit être égale à sa concentration plasmatique. En corrigeant les concentrations dans le LBA par le facteur de dilution de l'urée (Équation 3), il est possible d'estimer les concentrations initiales dans l'ELF (119) (Équation 3).

Équation 3 : Equation pour l'estimation des concentrations dans l'ELF ($C_{ELF \text{ estimé}}$) à partir de la concentration dans le lavage bronchoalvéolaire (C_{LBA}) et des concentrations uriques plasmatiques ($C_{\text{plasma urée}}$) et dans le LBA ($C_{LBA \text{ urée}}$).

$$C_{ELF \text{ estimée}} = C_{LBA} \times \left(\frac{C_{\text{plasma urée}}}{C_{LBA \text{ urée}}} \right)$$

Cette technique requière donc un prélèvement sanguin afin de déterminer la concentration plasmatique de l'urée au moment où le LBA est fait.

Il s'agit toutefois d'une estimation de la concentration dans l'ELF et plusieurs sources d'erreur peuvent être identifiées. Si le liquide de lavage séjourne trop longtemps dans le poumon lors du LBA, l'urée diluée aura le temps de s'équilibrer avec l'urée du milieu interstitiel et plasmatique, menant à un facteur correctif plus faible. Un séjour de plus d'une minute peut entraîner jusqu'à 200% d'erreur d'estimation (11, 89, 90). Une deuxième source d'erreur peut être la contamination par du sang lors de la mise en place de la canule. Le lavage pourra être contaminé par un apport d'urée et/ou de la molécule à étudier. Enfin, les cellules présentent dans l'ELF, particulièrement les macrophages, peuvent être lysés durant le processus de lavage (26, 122). Dans le cas des molécules ayant une affinité intracellulaire, la lyse des cellules, même partielle, peut augmenter artificiellement les concentrations dans le lavage, comme le montre la Figure 7. Dans cet exemple, la grépaflaxacine a un ratio intracellulaire/extracellulaire proche de 25. Si lors d'un lavage bronchoalvéolaire, le volume

des cellules lysées atteint 10% du volume de l'ELF, une surestimation de 300% des concentrations dans l'ELF est estimée.

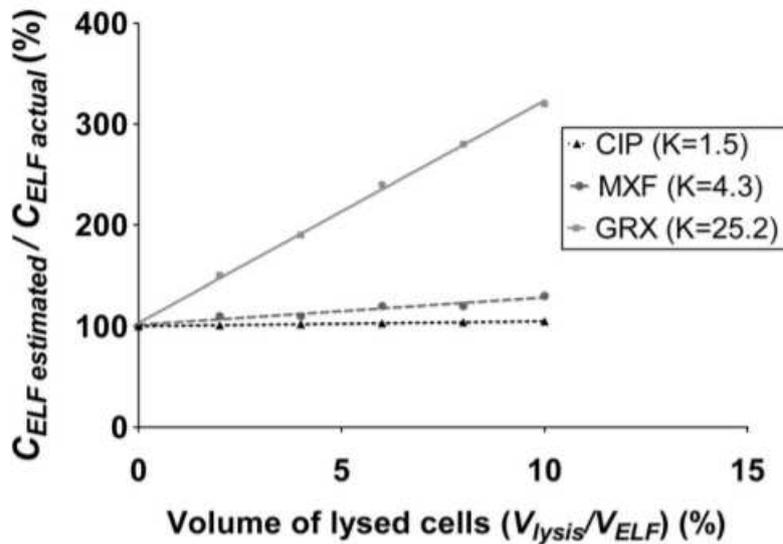


Figure 7 : Graphique représentant la surestimation des concentrations dans l'ELF de la ciprofloxacine (CIP), de la moxifloxacine (MXF) et de la gréapfloxacine (GRX) en fonction de la lyse des macrophages (K est le ratio entre les concentrations intracellulaire/extracellulaire de chaque antibiotique). (82)

Cette dernière source de confusion peut difficilement être quantifiable, car elle dépend de l'affinité intracellulaire, du nombre de cellules présentes dans l'ELF ainsi que du pourcentage de lyse des cellules durant le processus.

En connaissant les concentrations dans l'ELF, la détermination de la pharmacocinétique entre le poumon et le sang est possible car il est possible de négliger la clairance mucociliaire (MC)

(Figure 8) :

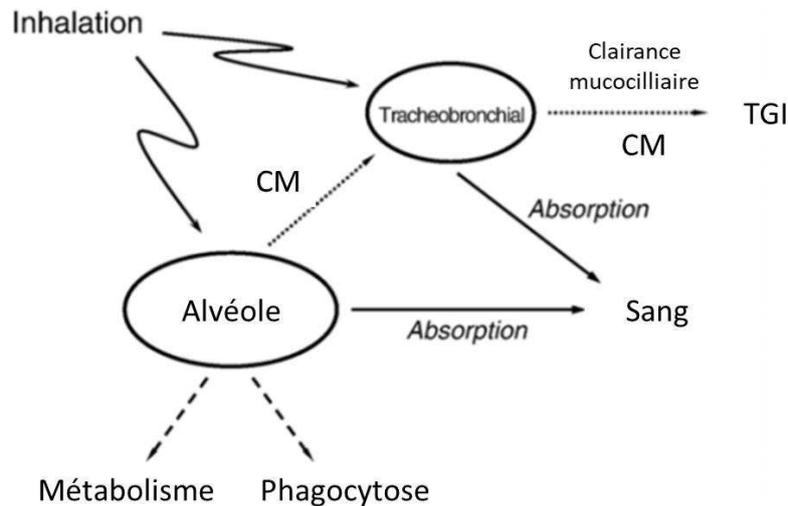


Figure 8 : Pharmacocinétique d'un composé à la suite d'une administration pulmonaire. A la suite d'une nébulisation, le composé peut se déposer au niveau des alvéoles et être métabolisé, phagocyté, absorbé ou efflué vers les bronches par la clairance mucociliaire (CM). Si le dépôt a lieu au niveau trachéobronchique, le composé peut être absorbé ou efflué vers le tractus gastro-intestinal (TGI) par la CM. De (123)

C. *Ex vivo*

Les études *ex vivo* sont un compromis entre les études *in vivo* et *in vitro*. Elles offrent plus de possibilités et plus de souplesse dans les protocoles que les études *in vivo*, et sont plus proches de la physiologie que les modèles *in vitro* (124). La technique la plus utilisée est le poumon isolé et perfusé (IPL : isolated perfused lung), illustré dans la Figure 9.

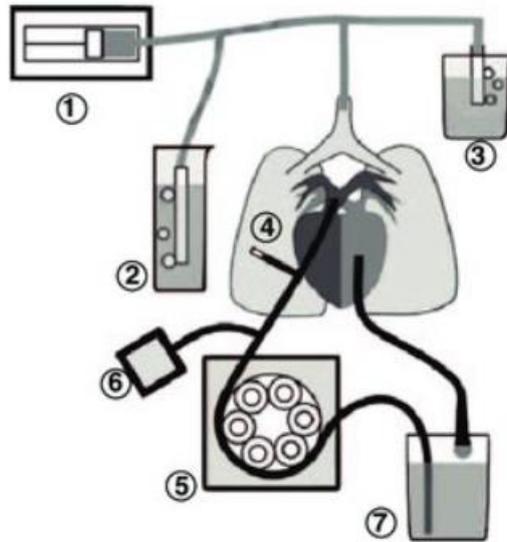


Figure 9 : Schéma de la technique de poumon isolé et perfusé. Les différents éléments sont : 1 pompe de ventilation ; 2 valve à pression positive pour inspiration ; 3 valve à pression positive pour fin d'expiration ; 4 piège à bulles d'air ; 5 pompe péristaltique ; 6 manomètre de la pression de perfusion ; 7 réservoir veineux. De (125)

Dans cette technique, les poumons d'un animal sont prélevés et installés dans un système artificiel sous des conditions expérimentales spécifiques. Pour être au plus proche des conditions physiologiques, les poumons extraits sont perfusés et la respiration est maintenue mécaniquement avec insufflation d'air dans la trachée. La perfusion peut être faite avec du sang autologue ou un milieu artificiel suppléé en albumine et glucose. Ce perfusât est équilibré avec un mélange d'oxygène et de dioxyde de carbone. Dans ces conditions, les poumons peuvent être maintenus viables pendant 2 à 3 heures à 37 °C (123). Il est donc possible de procéder à une cinétique d'absorption et là est le principal intérêt des expérimentations *ex vivo*. Comme vu lors de la description des études *in vivo*, chaque prélèvement d'ELF est destructif, donc un animal ne peut correspondre qu'à un temps de la cinétique. Mais dans les conditions *ex vivo*, une dose est administrée dans les poumons à l'instant $t=0$, et une cinétique d'absorption peut être effectuée dans le perfusât « sanguin » durant le temps où les poumons sont viables, comme montré dans l'exemple ci-dessous

(Figure 10) où il est possible de déterminer une constante d'absorption pour chaque molécule étudiée, ainsi que d'évaluer le pourcentage absorbé.

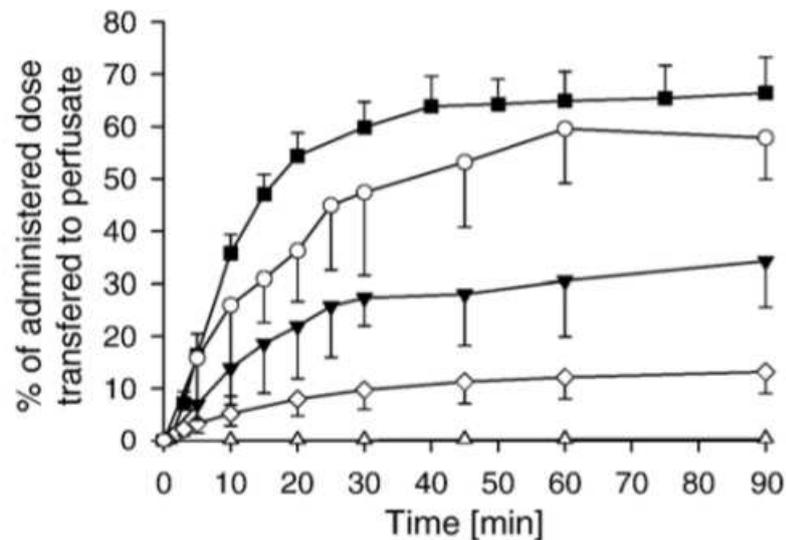


Figure 10 : profils du pourcentage moyen de la dose absorbée au niveau du perfusât en fonction du temps après administration pulmonaire dans un poumon isolé de rat (■ : FNa (fluorescéine disodique ; ▼ : FD-4 (dextrans FITC) ; ○ : F-PHEA (dérivé de l'aspartamide) ; ◇ : insuline ; △: Immunoglobuline G). De (123)

Cette méthode a cependant quelques limites :

- La principale est le maintien en conditions viables des poumons, tout le long de l'expérimentation
- La mise en place de l'expérimentation, qui nécessite une grande technicité de l'opérateur.
- Les poumons ne peuvent être maintenus viables que 3h au maximum. Pour des molécules faiblement absorbées, ce temps peut être insuffisant pour quantifier l'absorption.

Nous avons donc vu différentes méthodes d'exploration de la distribution pulmonaire, chacune avec des avantages et ses inconvénients. Mais comme ces méthodes sont utilisées

dans des conditions différentes, cela peut occasionner des divergences dans les résultats, suivant la méthode employée.

IV. Problématique : divergence *vitro/vivo*

Les différentes classifications étudiées ont toutes pour objectif de prédire le comportement *in vivo* de médicaments à partir de données *in vitro*. Dans la BCS, les molécules sont catégorisées en 4 classes, en fonction de leurs paramètres physicochimiques, sans avoir d'ordre particulier au sein d'une classe. Mais une amélioration serait d'établir une corrélation entre ces paramètres obtenus *in vitro* et des paramètres *in vivo* caractérisant leur comportement biopharmaceutique. Un paramètre *in vitro* possible serait la perméabilité apparente du composé. Celui-ci, comme vu précédemment, est obtenu par des études de transport dans des lignées cellulaires. Ce paramètre permet la distinction entre des molécules qui traversent difficilement les épithéliums et les molécules qui les traversent facilement et rapidement. La question du seuil entre les deux catégories de molécules reste en suspens pour le moment, puisqu'il faut faire le lien avec le comportement *in vivo*.

Pour le paramètre *in vivo* qui pourrait faire l'objet d'une classification, notre laboratoire propose le « therapeutic availability » (TA ; disponibilité thérapeutique). Ce paramètre permet d'évaluer l'intérêt d'administrer un composé par la voie pulmonaire par rapport à la voie intraveineuse. Il est calculé selon l'équation suivante (Équation 4) :

Équation 4 : Calcul du « Therapeutic availability TA »

$$TA = \frac{AUC_{ELF,NEB} / DOSE_{NEB}}{AUC_{ELF,IV} / DOSE_{IV}}$$

Où $AUC_{ELF,NEB}$ est l'AUC dans l'ELF après administration pulmonaire, $DOSE_{NEB}$ est la dose administrée par nébulisation (NEB), $AUC_{ELF,IV}$ est l'AUC dans l'ELF après administration intraveineuse et $DOSE_{IV}$ est la dose administrée par IV. Ce paramètre a été décrit pour la

première fois par Yapa et al (126), pour évaluer l'exposition des expectorations en CMS (Colistin Methanesulfonate ; promédicament antibiotique) chez des patients atteints de mucoviscidose. Si ce ratio est proche de 1, alors il n'y a pas d'intérêt à administrer par la voie pulmonaire un médicament, car l'exposition dans l'ELF est la même quelle que soit la voie d'administration. C'est le cas par exemple des fluoroquinolones. Notre laboratoire a étudié la pharmacocinétique systémique et pulmonaire de plusieurs fluoroquinolones chez le rat, après administration iv ou nébulisation. Les résultats sont présentés dans la Figure 11 :

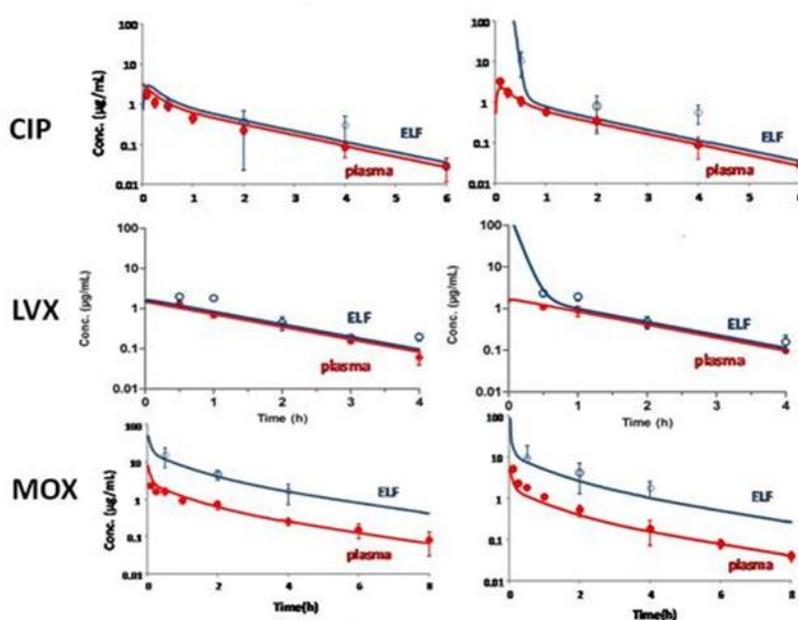


Figure 11 : Profils pharmacocinétiques chez le rat dans le plasma (en rouge) et l'ELF (en bleu) obtenus après administration intraveineuse (à gauche) et nébulisation (à droite) de fluoroquinolones (ciprofloxacine CIP, lévofloxacine LVX et moxifloxacine MOX) (82)

Quelle que soit la voie d'administration, le même profil pharmacocinétique est présent chez les 3 fluoroquinolones étudiées (ciprofloxacine, lévofloxacine, moxifloxacine) (82). Le profil est légèrement différent lors de la première demi-heure, car l'équilibre n'est pas encore atteint. Leur TA est respectivement de 1.2, 1.0 et 0.95. Pour cette catégorie de molécules, ce sont généralement des molécules lipophiles (logP de 0.28, 2.1 et 2.9 respectivement) qui devraient donc diffuser vite. C'est le cas pour ces trois fluoroquinolones qui ont des Papp dans la lignée

Calu-3 de 0.7, 2.4 et 5.0 $\times 10^{-6}$ cm/s respectivement. Ces différents paramètres sont cohérents car on est en présence de molécules lipophiles, qui diffusent rapidement : la voie d'administration n'a aucun impact sur la pharmacocinétique de ces composés.

Mais dans le cas où l'exposition de l'ELF est plus importante après administration pulmonaire vs administration intraveineuse, le TA sera supérieur à 1. C'est le cas typique des aminoglycosides, comme la tobramycine, gentamycine et amikacine, et d'autres antibiotiques comme la colistine ou l'aztréonam. Ces molécules sont très hydrophiles, avec des logP de -6.5, -3.1, -3.2 pour les aminosides respectivement, et -2.4 et -3.1 pour la colistine et l'aztréonam. On retrouve ces résultats dans les études de transport *in vitro*, où les Papp dans la lignée cellulaire Calu-3 sont inférieures à 0.05×10^{-6} cm/s pour quatre des cinq molécules citées, et légèrement supérieur pour l'aztréonam (0.07×10^{-6} cm/s). Ces résultats sont également cohérents avec les résultats *in vivo*, puisque des TA chez le rat ont été calculés à 172, 108 et 1137 pour la tobramycine (83), gentamycine et amikacine (127) respectivement, et 636 et 2761 pour la colistine (128) et l'aztréonam (129). On retrouve ces résultats dans les profils pharmacocinétiques de la colistine, tobramycine et aztréonam présentés dans la Figure 12:

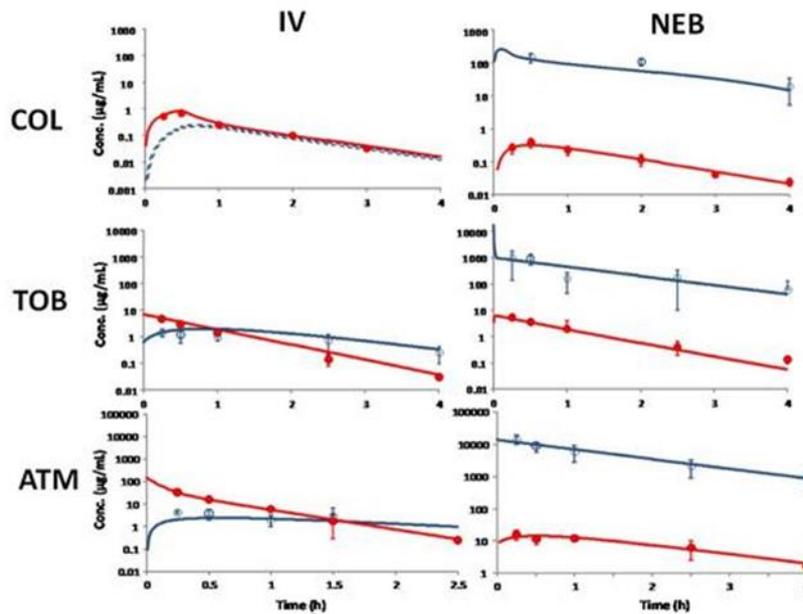


Figure 12 : Profils pharmacocinétiques chez le rat sain dans le plasma (en rouge) et l'ELF (en bleu) obtenus après administration intraveineuse (à gauche) et nébulisation (à droite) de molécules à faible perméabilité cellulaire : colistine (COL), tobramycine (TOB) et aztréonam (ATM) (83, 128, 129)

D'après ces résultats, il est intéressant d'opter pour la voie pulmonaire pour administrer ces médicaments, car ceci permettra d'avoir de fortes concentrations locales en médicaments tout en limitant l'exposition systémique, parfois synonyme d'effets secondaires. En clinique, ces trois médicaments sont en effet disponibles sous une forme galénique pour inhalation (Tobi® qui contient de la tobramycine sulfate, Arikace® qui contient de l'amikacine et qui fait l'objet d'une autorisation d'utilisation temporaire, et la gentamycine est en cours d'étude lors d'essais cliniques de phase 2 chez le patient).

Le paramètre TA semble donc être un bon marqueur pour servir de base à une classification. Mais comme exprimé précédemment, le seuil entre molécules intéressantes ou non à nébuliser est difficile à mettre en place, car certaines molécules se situent dans une zone intermédiaire et pourront faire l'objet d'une divergence *in vitro/in vivo*.

Dans cette thèse, plusieurs molécules seront étudiées, pour déterminer l'impact des transporteurs d'efflux sur la pharmacocinétique pulmonaire.

- Oseltamivir phosphate et carboxylate

L'oseltamivir phosphate (OP) est le promédicament de l'oseltamivir carboxylate (OC) utilisé pour traiter la grippe, qui a déjà montré son intérêt à être nébulisé chez le rat (130). L'OC a un TA proche de 500. C'est une molécule qui est faiblement absorbée (<5%), donc qui a *a priori* une faible perméabilité. C'est pour cela qu'elle est administrée oralement sous la forme d'un promédicament, qui augmente sa perméabilité et permet son absorption. Mais cette utilisation d'un promédicament, utile pour l'absorption orale, risque de desservir lors d'une administration pulmonaire, où l'on recherche des molécules qui sont peu absorbées. Or on sait que l'OP est substrat de pompes d'efflux (P-gp) (131). Est-ce que cet efflux, qui permet d'avoir de plus fortes concentrations dans l'ELF vs plasma, sera suffisant pour maintenir des concentrations plus élevées dans le poumon et permettre une conversion efficace en composé actif ou l'administration directe du composé actif est préférable ? C'est ce qu'il sera étudié dans le premier article présenté dans cette thèse où les perméabilités de chaque composé seront également étudiées dans la lignée cellulaire Calu-3 afin de comparer les résultats *in vitro* et *in vivo* chez le rat. Cet article pourra répondre à la question : est-ce qu'un promédicament substrat d'efflux est intéressant à nébuliser si on veut de fortes concentrations pulmonaires de son principe actif ?

- Oxazolidinones :

On retrouve dans cette famille le linézolide (LZD) et le tédizolide (TZD). Ces molécules sont utilisées pour le traitement des infections à Gram positifs (staphylocoques résistants à la methicilline et à la vancomycine) (132, 133). Le TZD a aussi montré *in vitro* une efficacité

contre la tuberculose (134). Concernant le TZD, des données chez l'homme sont disponibles et montrent une plus forte AUC dans l'ELF que dans le plasma après administration orale (135). Ceci serait le signe d'un transport actif vers le poumon. On se propose dans ce second article de comparer les AUC dans le plasma et l'ELF après administration intraveineuse et nébulisation pour pouvoir déterminer le TA de ce composé chez le rat et déterminer si le TZD est intéressant à nébuliser. Cela sera également réalisé avec le LZD et les perméabilités des deux composés seront étudiées dans deux lignées cellulaires différentes (Calu-3 et NCI-H441), puisqu'on ne sait pas si ces composés sont substrats ou non de pompes d'efflux *in vitro*.

Avec ces deux articles, nous nous proposons de comparer les observations *in vitro* sur culture cellulaire et celles *in vivo* sur des animaux sains afin de mieux comprendre l'implication des transporteurs d'efflux sur la pharmacocinétique pulmonaires de ces agents anti-infectieux.

Articles personnels

Article 1

Pulmonary Pharmacokinetics of Oseltamivir Carboxylate in Rats after Nebulization or Intravenous Administration of its Prodrug Oseltamivir Phosphate

Romain Carrez^{a,b}, Julien Brillault^{a,b}, Nicolas Grégoire^{a,b}, Isabelle Lamarche^{a,b}, Julian Laroche^{a,b}, William Couet^{a,b,c}, Sandrine Marchand^{a,b,c} #.

INSERM, U1070, UFR de Médecine Pharmacie, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France^a; Université de Poitiers, UFR Médecine-Pharmacie, Poitiers, France^b; Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, CHU of Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86000 Poitiers, France^c

Running title: Pulmonary disposition of oseltamivir in rats

Address Correspondence to Sandrine Marchand email: sandrine.marchand@univ-poitiers.fr

* Present address: INSERM U1070, Pôle Biologie Santé 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

Antimicrob Agents Chemother. 2019 May 24;63(6). pii: e00074-19. doi: 10.1128/AAC.00074-19

Introduction :

La nébulisation d'agents anti-infectieux permet théoriquement d'obtenir de fortes concentrations au niveau du poumon afin d'être efficace contre les infections pulmonaires, en particulier pour les molécules de faible perméabilité. L'oseltamivir carboxylate (OC) est administré oralement sous la forme d'un promédicament (oseltamivir phosphate, OP) qui présente une perméabilité membranaire supérieure à l'OC afin d'augmenter sa biodisponibilité orale. Pour les médicaments administrés en tant que précurseurs de médicaments inactifs, la question du comportement biopharmaceutique pulmonaire de la molécule active est une question complexe.

Objectif :

Le but de cette étude est donc d'étudier la pharmacocinétique plasmatique et pulmonaire de l'OP (promédicament) et de son métabolite actif (OC) après administration intraveineuse et par nébulisation de l'OP chez le rat.

Matériel et Méthodes :

L'oseltamivir phosphate a été administré (6mg/kg) à des rats mâles (Sprague-Dawley, 300g) soit par voie intraveineuse (n=20), soit par nébulisation intratrachéale (n=20). Des échantillons de plasma et des lavages broncho-alvéolaires (BAL) ont été recueillis 0,5, 2, 4 et 6 h après l'administration. Les concentrations de l'OP et de l'OC dans le plasma et le BAL, permettant d'estimer les concentrations dans le fluide épithélial pulmonaire (ELF), ont été déterminées par spectrométrie de masse en tandem et modélisées par approche compartimentale. Une étude de perméabilité apparente membranaire *in vitro* a également été réalisée sur un modèle cellulaire Calu-3 d'évaluer l'absorption des 2 molécules (sens apical vers basolatéral) et la diffusion du plasma vers le poumon (sens basolatéral vers apical).

Principaux résultats :

Deux observations majeures ont pu être réalisées. Premièrement après nébulisation du promédicament, seulement 2% de la dose a été convertie de manière pré-systémique en composé actif, ce qui témoigne d'un faible avantage de la nébulisation de l'OP. Deuxièmement, après l'administration intraveineuse d'OP, la surface sous courbe (AUC) dans l'ELF a été estimée 90 fois plus grande que l'AUC plasmatique, ce qui suggère un important transport d'efflux du plasma au poumon. Cet efflux a été confirmé *in vitro* où l'OP a montré une perméabilité moyenne basale-apicale significativement supérieure à la perméabilité apical-basale (respectivement $4.69 \pm 0.28 \times 10^{-6}$ cm/s et $1.07 \pm 0.11 \times 10^{-6}$ cm/s)

Conclusion :

L'oseltamivir phosphate, bien que substrat de pompes d'efflux au niveau pulmonaire, n'est pas un bon candidat à la nébulisation car la conversion locale est trop faible et ne permet pas une exposition convenable du composé actif au site d'infection.

Abstract

The aim of this study was to investigate the pharmacokinetics of oseltamivir phosphate, a prodrug, and its active moiety in plasma and lung after its nebulization and intravenous administration, in rats. Only 2% of prodrug was converted into active moiety pre-systematically, attesting to a low advantage of oseltamivir phosphate nebulization suggesting that oseltamivir phosphate nebulization is not a good option to obtain a high exposure of the active moiety at the infection site within lung.

Article

A recent series of studies conducted in our laboratory (1-6) has shown that membrane permeability is a key parameter to support drug nebulization (NEB) for local efficacy enhancement. From a biopharmaceutical standpoint, antimicrobial agents for parenteral administration due to their limited membrane permeability such as aminoglycosides are much better candidates for NEB (4) than those with high membrane permeability allowing oral administration, such as fluoroquinolones (2). We have also shown that, the anti-influenza drug oseltamivir carboxylate (OC) could be a good candidate for nebulization (1), and we hypothesize now that its orally administered prodrug, oseltamivir phosphate (OP), should not. The aim of this study was to confirm this hypothesis.

In vitro permeability experiments were performed in Calu-3 cell line with determination of apparent permeability (Papp) (7). Briefly, OP and OC (Sigma and AlsaChim®, Saint Quentin Fallavier and Illkirch-Graffenstaden, France) solutions were respectively used at 0.250 and 1 µg/mL for both apical-basolateral (AP/BL) and basolateral-apical (BL/AP) studies. Samples (150 µL) were taken at various times in each compartment in function of the studied direction. The *in vivo* study was authorized by the ethic committee COMETHEA and registered by the French Ministry of Higher Education and Research (n°2015070211159865). Fourty male

Sprague Dawley rats (300-330 g, Charles River, l'Arbresle, France) were divided in two groups (n=20) (i.v. or intratracheal (IT)). OP solution was administered at a dose of 6mg/kg by i.v. bolus (1 mL) through the tail vein or by IT administration (100 μ L) using nebulizer (Microsprayer 1A-1B, PennCentury Inc., Wyndmoor, PA, USA) (8). BAL (bronchoalveolar lavages) and blood samples were collected until 6 h post administration (5 rats per sampling time). Dichlorvos (4 mg/mL in saline solution 0.9 %, 5% vol/vol, Sigma®) was added to samples. BAL and plasma samples were frozen at -80°C until analysis. OP and OC concentrations were determined by LC-MS/MS according to Gupta et al. (9), on a system included a Shimadzu HPLC module (Shimadzu Nexera XR, Marne-la-Vallée, France) coupled with a API 3000 mass spectrometer (Sciex Life Sciences, Les Ulis, France). Standard curves between 0.25-200 ng/mL for OP and 0.625-500 ng/mL for OC were performed in plasma and saline solution 0.9 %. Quality controls were performed at 0.5/25/150 ng/mL and 1.25/62.5/375 ng/mL for OP and OC respectively. To an aliquot of 150 μ L of spiked sample (plasma or saline solution), 750 μ L of formic acid 1 % in water, 40 μ L of mixed internal standard in methanol/water (50: 50 vol/vol) and 5 % (vol/vol) of dichlorvos (4 mg/mL in saline solution 0.9 %) were added and vortexed for 30 seconds. Samples and calibration points were loaded on SPE IST Evolute® ABN 25 mg cartridges (Biotage, Hengoed, UK), washed with 1mL of formic acid 1% in water and eluted with 1 mL of methanol. Eluates were evaporated under nitrogen at 45 °C and dissolved with 150 μ L of a mixture of mobile phase/water (50: 50 vol/vol) for injection (5 μ L). Intra-day and inter-day variabilities were evaluated, and precision and accuracy were lower than 15% for each level of control concentrations. Urea concentrations in plasma and BAL was determined and concentrations in ELF were estimated using the urea dilution method (8). Plasma and ELF log-transformed data obtained after OP administration were simultaneously analyzed using non-linear mixed effect modeling approach with S-ADAPT (v1.57) (10). To these data were added plasma and ELF

concentrations previously obtained by our group after direct OC NEB and i.v. administrations (1). Only unbound drugs were assumed to exchange between plasma and ELF. Protein binding in plasma was fixed at 42% for OP and was considered negligible for OC (11). Protein binding was supposed to be negligible within ELF (12). In accordance with previous observations using Penn-Century microsyringe (2,5), systemic bioavailability after NEB was fixed at 100 %. The final model (Figure S1) corresponds to a systemic pharmacokinetics of both compounds was characterized by a bi-compartmental model with central (VcOP and VcOC) and peripheral compartments (VpOP and VpOC) linked together by two-way passive diffusion clearances (Q1 and Q2). OP was assumed to be renally excreted (CLROP) and converted into OC (CLconvpl) and OC was only excreted in urines (CLROC). Pharmacokinetics in ELF was characterized by one compartment for OP (Velf1,OP) and by two compartments for OC (Velf1OC, Velf2OC) connected by a bi-directional clearance (Q3). The distribution between plasma and ELF compartments was described by a passive two-way diffusion clearance for both molecules (Qelf OP and Qelf OC) to which an efflux clearance from plasma to ELF was added only for OP (CLoutOP). Enzymatic conversion of OP into OC within ELF was characterized by a conversion clearance (CLconvelf). Other details of modeling are presented in supplemental material. Unbound plasma AUC (AUC_{u,plasma}, OP and AUC_{u,plasma}, OC) and ELF AUC (AUC_{ELF}, OP and AUC_{ELF}, OC) from 0.5 h to ∞ after either i.v. or NEB administration of OP and OC were calculated using the final model (Berkeley Madonna, version 8.3.18, University of California, USA). All extrapolated AUC from t to ∞ were below 10 % of AUC 0.5-∞).

Average absorptive (AP/BL) and secretory (BL/AP) Papp values for OP and OC were presented Figure 1. Ratios between mean secretory Papp (BL/AP) and corresponding mean absorptive Papp (AP/BL) were estimated to 4.4 and 0.9 for OP and OC.

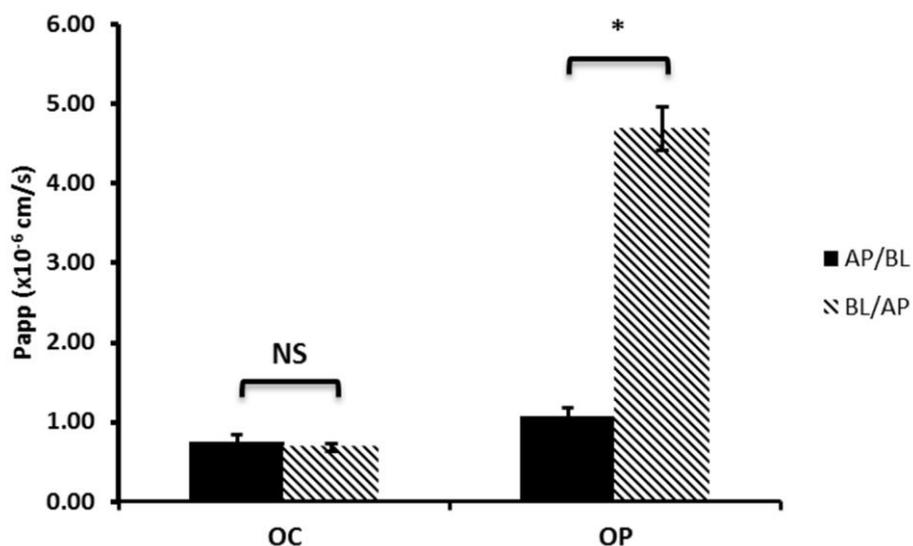


Figure 1: Absorptive (apical to basolateral: AP/BL) and secretory (basal to apical: BL/AP) permeability (Papp) of OC (1 $\mu\text{g/mL}$) and OP (0.250 $\mu\text{g/mL}$) through Calu-3 cells (mean \pm SD, n=3, * $p < 0.05$, t-test, GraphPad Prism 5.02, La Jolla, CA).

PK profiles and parameters estimates of OC and OP after administration of the prodrug OP are respectively presented in Figure 2 and Table S1.

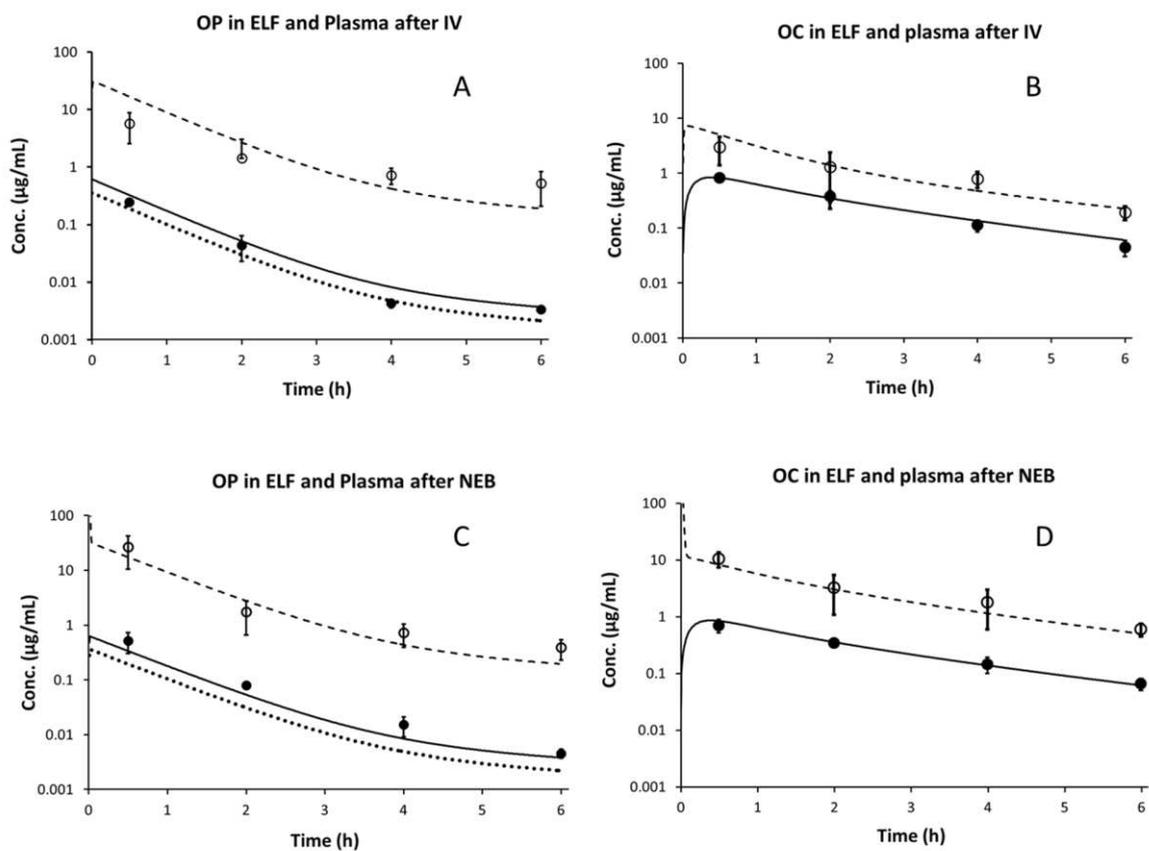


Figure 2: Experimental (mean \pm SD) and predicted concentration-time profiles of OP (left panel A and C) and OC (right panel B and D) after OP i.v administration (top panel A and B) or NEB (bottom panel C and D). Closed and open symbols represent respectively measured concentrations in plasma and ELF. Solid lines represent predicted total plasma concentrations, dotted lines represent unbound plasma concentrations and dashed lines represent predicted ELF concentrations.

Table 1. OP and OC AUC in plasma and ELF after NEB or i.v. administration of OP or OC

	$AUC_{u,plasma,OP}^a$	$AUC_{ELF,OP}$	$AUC_{u,plasma,OC}$	$AUC_{ELF,OC}$
	($\mu\text{g/mL/h}$)	($\mu\text{g/mL/h}$)	($\mu\text{g/mL/h}$)	($\mu\text{g/mL/h}$)
i.v. OP	198	17316	1551	8275
NEB OP	200	17532	1639	16747
<hr/>				
i.v. OC ^b			2810	5626
NEB OC ^b			2842	3.77×10^6

a $AUC_{u,plasma,OP}$ were calculated by multiplying the experimental data by the unbound fraction of OP ($=0.58$) (14).

b AUCs were calculated using the final model and data from Bedor et al. (1).

After OP i.v. bolus (Figure 2A), OP plasma concentrations decline rapidly, due to both renal excretion of prodrug and a fast systemic conversion into OC, with rapid apparition of OC in plasma at first sampling time ($t=0.5$ h) (Figure 2B). OP ELF and plasma concentrations decline in parallel with a maximal concentration in ELF obtained at early time ($t=0.5$ h) after i.v. administration, attesting for rapid diffusion of OP from plasma to ELF (Figure 2A). Moreover, OP ELF concentrations were much higher than unbound plasma concentrations (Figure 2A) with a ratio $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ close to 90 (Table 1). After i.v. administration of OP, OC concentrations in ELF and plasma decrease in parallel (Figure 2B) with an $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ ratio close to 5 (Table 1). The route of administration had no major effect on OP and OC ELF and plasma concentrations versus time profiles (Figure 2) attesting for fast equilibrium after NEB. $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ ratios for OP and OC after

NEB were respectively equal to 90 and 10 (Table 1). Interestingly OC ELF concentrations are higher than plasma concentrations after OP administration whatever the route of administration (AUC_{ELF}/AUC_{plasma} of 5 after OP i.v. administration and 10 after OP NEB). After i.v. administration, OP AUC_{ELF}/AUC_{plasma} ratio equal to 90 suggests that OP is a substrate of efflux transporters at the broncho-alveolar barrier, which is consistent with its 4.4 times higher secretory Papp (BL/AP) than its absorptive Papp (AP/BL) through Calu-3 cells (Figure 1) and in agreement with previous studies presenting OP as a P-glycoprotein substrate (11, 12). Antimicrobial agents with low membrane permeability are much better candidates for NEB (4) but OP presents a relatively high absorptive permeability (Papp = $1.07 \pm 0.11 \times 10^{-6}$ cm/s) through the Calu-3 cells line, intermediate between those of norfloxacin (Papp = $0.6 \pm 0.05 \times 10^{-6}$ cm/s) and pefloxacin (Papp = $7.1 \pm 0.28 \times 10^{-6}$ cm/s) in the same model (13). Consequently, OP does not appear to be a good candidate for NEB, as confirmed by the results of the *in vivo* experiments showing that the route of administration for OP has no effect on both plasma and ELF concentrations versus time profiles (Figures 2A and 2C). However, OP is a prodrug and ELF exposure of the active moiety, OC, is actually of greater interest but also more complex to assess. OC ELF exposure after OP NEB should be as high as possible, which depends upon two major parameters, first the relative rates of OP conversion and absorption and second the relative rates of OC formation and absorption (8). In the present study, OP AUC_{plasma}, was similar after NEB and i.v. administration (Table 1), indicating that virtually 100% of the OP nebulized dose was directly absorbed and therefore that the fraction converted pre-systemically into the active OC was extremely limited. This is due to the fact that OP systemic absorption is 45 times faster than its conversion into OC (Q_{elf,OP} = 0.018 L/h/kg vs CL_{convelf} = 0.00044 L/h/kg, Table S1), meaning that roughly only 2% of the OP nebulized dose is converted pre-systemically into OC. On the top of that, OC appeared in ELF rapidly disappears since its pre-systemic formation is 3 times slower than its

absorption ($CL_{convelf} = 0.00042 \text{ L/h/kg}$ vs $Q_{elfOC} = 0.0011 \text{ L/h/kg}$, Table S1). In a previous study with direct administrations of OC, ELF concentrations after NEB were 840 times higher than after i.v. administration (1) and OC exposure within ELF is 200 times higher after direct OC NEB than after OP NEB (Figure S2).

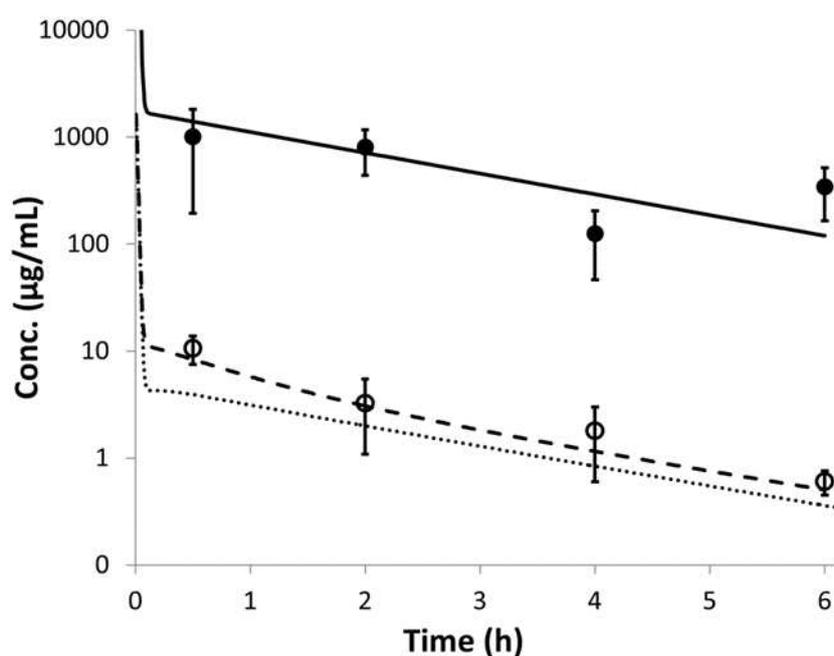


Figure S2: ELF concentrations versus time of OC after direct OC NEB (closed symbols) (from Bedor et al. (1)) or OP NEB (open symbols). Solid and dashed lines represent predicted ELF concentrations versus times with the model respectively after OC and OP NEB. Dotted line characterizes simulation of OC ELF concentrations with the model when efflux transport Cl_{outOP} was set at zero. This simulation presented a decrease of how only 20% of OC AUC_{ELF} after OP NEB, due to the relative impact of efflux clearance ($CL_{outOP} = 1.58 \text{ L/h/kg}$) compared to the combination of OP systemic conversion ($CL_{convpl} = 5.22 \text{ L/h/kg}$) and its renal elimination ($CL_{ROP} = 6.40 \text{ L/h/kg}$).

Noticeably the relatively high contribution of OP efflux transport Cl_{outOP} (1.58 L/h/kg) compared with its passive diffusion Q_{elfOP} (0.018 L/h/kg) 90 times higher leads to much higher OP ELF than plasma concentrations (Figure 1A) but has limited consequences on OC ELF concentrations (Figure S2). Impacts of OP efflux transport and $Cl_{convelf}$ on OC ELF concentrations are presented in supplemental material.

In conclusion, this study suggests that OP NEB instead of i.v. administration is not a good option to increase exposure of the active OC at the infection site within lung, but that direct NEB of OC would remain the best strategy to reach this objective.

Acknowledgments.

This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers).

1. Galindo Bedor DC, Marchand S, Lamarche I, Laroche J, Pereira de Santana D, Couet W. 2016. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 5. Oseltamivir Carboxylate. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5085-7.
2. Gontijo AV, Brillault J, Gregoire N, Lamarche I, Gobin P, Couet W, Marchand S. 2014. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats. 1. Ciprofloxacin, Moxifloxacin and Grepafloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* doi:10.1128/aac.02818-14.
3. Gontijo AV, Gregoire N, Lamarche I, Gobin P, Couet W, Marchand S. 2014. Biopharmaceutical characterization of nebulized antimicrobial agents in rats: 2. Colistin. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3950-6.
4. Marchand S, Boisson M, Mehta S, Adier C, Mimoz O, Gregoire N, Couet W. 2018. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 6. Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
5. Marchand S, Gregoire N, Brillault J, Lamarche I, Gobin P, Couet W. 2015. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 3. Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6646-7.
6. Marchand S, Gregoire N, Brillault J, Lamarche I, Gobin P, Couet W. 2016. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats. 4. Aztreonam. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3196-8.
7. Brillault J, De Castro WV, Harnois T, Kitzis A, Olivier J-C, Couet W. 2009. P-glycoprotein-mediated transport of moxifloxacin in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:1457-1462.

8. Marchand S, Gobin P, Brillault J, Baptista S, Adier C, Olivier J-C, Mimoz O, Couet W. 2010. Aerosol therapy with colistin methanesulfonate: a biopharmaceutical issue illustrated in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:3702-3707.
9. Gupta A, Guttikar S, Shrivastav PS, Sanyal M. 2013. Simultaneous quantification of prodrug oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate in human plasma by LC–MS/MS to support a bioequivalence study. *Journal of pharmaceutical analysis* 3:149-160.
10. Bulitta JB, Bingölbali A, Shin BS, Landersdorfer CB. 2011. Development of a new pre-and post-processing tool (SADAPT-TRAN) for nonlinear mixed-effects modeling in S-ADAPT. *The AAPS journal* 13:201-211.
11. Morimoto K, Nakakariya M, Shirasaka Y, Kakinuma C, Fujita T, Tamai I, Ogihara T. 2008. Oseltamivir (Tamiflu) efflux transport at the blood-brain barrier via P-glycoprotein. *Drug Metabolism and Disposition* 36:6-9.
12. Hoffmann G, Funk C, Fowler S, Otteneder MB, Breidenbach A, Rayner CR, Chu T, Prinssen EP. 2009. Nonclinical pharmacokinetics of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in the central nervous system. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:4753-4761.
13. Brillault J, De Castro WV, Couet W. 2010. Relative contributions of active mediated transport and passive diffusion of fluoroquinolones with various lipophilicities in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrob Agents Chemother* 54:543-5.
14. He G, Massarella J, Ward P. 1999. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clinical pharmacokinetics* 37:471-484.

Supplemental material

Materials and Methods

Pharmacokinetics modeling

Plasma and ELF log-transformed data obtained after OP administration were simultaneously analyzed using non-linear mixed effect modeling approach with S-ADAPT (v1.57) (1). To these data were added plasma and ELF concentrations previously obtained by our group after direct OC NEB and i.v. administrations (2). Modeling was inspired by the OC model previously described (2) but during the analysis, several model structures were tested and evaluated: one or two compartments were assessed to describe OP pharmacokinetics (PK) in plasma and ELF, a deposit compartment for the administration of OP NEB, a passive diffusion clearance of OP between plasma and ELF with or without active efflux clearance which can be linear or not, the presence of local conversion of OP into OC in ELF, the conservation of OC efflux clearance between plasma and ELF compartments. Two options were then tested: The first one was a global strategy where OC and OP parameters were all determined. The second approach was sequential, where OC parameters were fixed according to their value in the model previously published (2) and only OP parameters were determined. Akaike criterion and likelihood ratio ($p < 0.05$) were used to discriminate the models. The estimation of OC parameters did not improve statistically the objective function, OC parameters were then fixed as values previously obtained by Bedor et al. (2). The interindividual variability of the PK parameters was assumed to be log-normal. Model are presented in Figure S1.

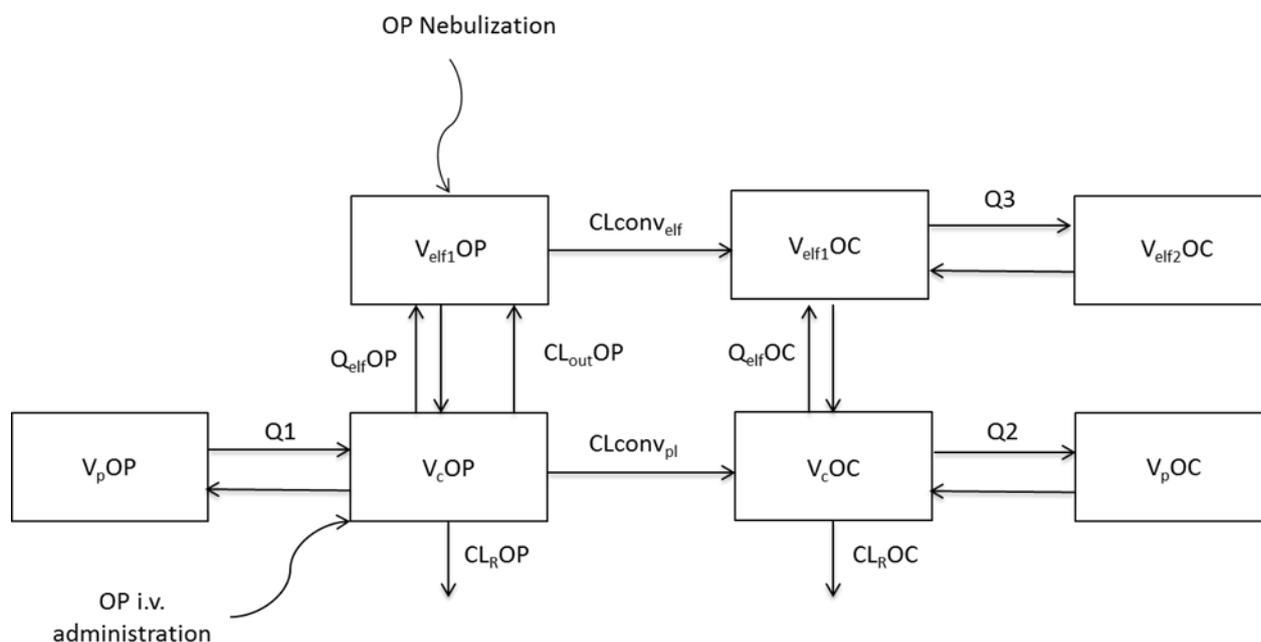


Figure S1: Final structural model used to describe simultaneously the PK of OP and OC in plasma and ELF after i.v. or NEB of OP (6 mg/kg).

Discussion on how OP efflux transport and CLconvelf affects OC ELF concentrations

OC ELF concentrations are higher than plasma concentrations after OP administration whatever the route of administration (AUC_{ELF}/AUC_{plasma} of 5 after OP i.v. administration and 10 after OP NEB). This observation is not consistent with *in vitro* permeability results, showing a difference between absorptive and secretory Papp values for OP but not for OC (Figure 1). It is also in contradiction with our previous *in vivo* results showing no difference between ELF and unbound plasma AUCs after direct OC i.v. administration. Active efflux transport is therefore unlikely to explain the AUC_{ELF}/AUC_{plasma} at 5 after OP i.v. administration, which could be explained by pre-systemic conversion of OP into OC (CL_{convelf}) due to pulmonary carboxyesterases. Indeed simulations with CL_{convelf} set at

zero lead to superimposed ELF and unbound plasma concentration profiles with AUC_{ELF}/AUC_{plasma} ratio equal to 1 after OP i.v. or NEB (data non shown).

Table S1. Parameter estimates in the final model expressed as typical value (CV%)

	OP Typical value (CV%)	% interindividual variability (CV%)	OC Typical value ^a	% interindividual variability ^a
V _c (L/kg)	8.31 (22)	1 (fixed)	0.245	4
V _{elf1} (μL/kg)	92.40 (113)	13 (105)	2.03	1
Q _{elf} (L/h/kg)	0.018 (29)	53 (79)	0.0011	1
Cl _R (L/h/kg)	6.40 (13)	5 (78)	1.54	1
CL _{out} (L/h/kg)	1.58 (29)	27 (179)		
V _{pOP} (L/kg)	25.65 (20)	1 (fixed)		
Q1 (L/h/kg)	1.68 (17)	1 (fixed)		
V _{pOC} (L/kg)			1.15	32
Q2 (L/h/kg)			0.97	1
V _{plung} (μL/kg)			201	1
Q3 (μL/h/kg)			0.00011	64
CL _{conv_{pl}} (L/h/kg)	5.22 (13)	6 (72)		
CL _{conv_{elf}} (L/h/kg)	0.00042 (12)	15 (69)		
Residual error plasma	0.32 (37)		0.13 (89)	
Residual error ELF	0.37(42)		0.10 (124)	

^a values from Bedor et al.

1. Bulitta JB, Bingolbali A, Shin BS, Landersdorfer CB. 2011. Development of a new pre- and post-processing tool (SADAPT-TRAN) for nonlinear mixed-effects modeling in S-ADAPT. *Aaps J* 13:201-11.
2. Galindo Bedor DC, Marchand S, Lamarche I, Laroche J, Pereira de Santana D, Couet W. 2016. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 5. Oseltamivir Carboxylate. *Antimicrob Agents Chemother* 60:5085-7.

Article 2

Study of Pulmonary Disposition of Linezolid and Tedizolid *in vitro* using NCI-H441 cell line and *in vivo* in rats

Romain Carrez^{a,b}, Mohammed Ali Selo^{c,d}, Nicolas Grégoire^{a,b}, Julien Brillault^{a,b}, Isabelle Lamarche^{a,b}, Julian Laroche^{a,b}, William Couet^{a,b,e}, Carsten Ehrhardt^c, Sandrine Marchand^{†a,b,e,#}.

INSERM, U1070, UFR de Médecine Pharmacie, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France^a ; Université de Poitiers, UFR Médecine-Pharmacie, Poitiers, France^b ; School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences and Trinity Biomedical Sciences Institute, Trinity College Dublin, Dublin, Ireland^c ; Faculty of Pharmacy, University of Kufa, Al-Najaf, Iraq^d ; Laboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, CHU of Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86000 Poitiers, France^e

Running title: Pulmonary disposition of linezolid and tedizolid in rats

#Address Correspondence to Sandrine Marchand. sandrine.marchand@univ-poitiers.fr

* Present address:INSERM U1070, Pôle Biologie Santé 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France

Article en cours de rédaction

Introduction :

Le tedizolide, un antibiotique de la famille des oxazolidinones, a déjà montré chez le volontaire sain après administration par voie orale, une exposition pulmonaire beaucoup plus importante que l'exposition systémique. Cette exposition plus importante du poumon pourrait être due à un transport d'efflux pulmonaire.

Objectifs :

L'objectif de cette publication est de caractériser chez le rat la pharmacocinétique pulmonaire du tédizolide et du linézolide, deux antibiotiques de la famille des oxazolidinones, après administration intraveineuse et nébulisation intra-trachéale coupler avec des études de transport *in vitro* de perméabilité pour évaluer l'impact des transporteurs d'efflux.

Matériel et Méthodes :

Le tédizolide phosphate, le promédicament du tédizolide (équivalent à 10 mg/kg en intraveineux et 1mg/kg en nébulisation de tédizolide) et le linézolide (7.5 mg/kg) ont été administrés à des rats mâles Sprague-Dawley. Des échantillons de plasma et des lavages broncho-alvéolaires (BAL) ont été recueillis 0.5, 2, 4 et 6h après l'administration. Les concentrations plasmatiques et pulmonaires après lavage bronchoalvéolaire (BAL), permettant d'estimer les concentrations dans le fluide épithélial pulmonaire (ELF) ont été déterminées par spectrométrie de masse en tandem et modélisées selon une approche compartimentale. Des études *in vitro* ont également été réalisées dans un premier temps afin d'évaluer le transport à travers un épithélium pulmonaire (modèle de culture cellulaire NCI-H441) avec ou sans inhibiteurs de pompes d'efflux (P-gp, MRP1 et BCRP) et dans un second temps d'étudier la diffusion intra-macrophages des deux molécules.

Principaux résultats :

Même si les études *in vivo* chez le rat montrent une exposition pulmonaire plus importante que l'exposition systémique avec des ratios de surface sous courbe (AUC) $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ de 2.15 pour le linezolide et de 225 pour le tedizolide après administration i.v., les études *in vitro* ne permettent pas de mettre en évidence un transport actif impliqué dans la distribution de ces molécules. Certaines autres hypothèses ont été testées comme l'impact de la lyse des macrophages lors du BAL. La pénétration au niveau des macrophages, caractérisée par des rapports de diffusion intracellulaire/extracellulaire dans les macrophages respectivement égaux à 295 ± 95 et 3 ± 1.5 , est donc 100 fois plus importante pour le tédzolide que pour le linézolide, expliquant en partie les fortes concentrations de TZD dans l'ELF.

Conclusion :

Les molécules de la famille des oxazolidinones se distribuent très bien vers le poumon, et les transporteurs d'efflux ne semblent pas être responsables des fortes concentrations observées dans l'ELF pour le TZD. Toutefois, la potentielle lyse des macrophages lors du BAL doit nous conduire à interpréter les concentrations de TZD dans l'ELF avec prudence. D'autres hypothèses comme une affinité potentielle des oxazolidinones pour les composés du surfactant, menant à une séquestration de ces antibiotiques au niveau de l'ELF doit être explorée.

Abstract

Tedizolid and linezolid have already exhibited an important pulmonary distribution in human but the mechanisms of this distribution are not clear. Tedizolid phosphate and linezolid were administered to rats intravenously and by nebulization. Plasma and bronchoalveolar lavages (BAL) were collected at 0.5, 1, 2, 4, 6h after administration. Drug concentrations were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and BAL concentrations were corrected by urea to estimate the epithelial lining fluid (ELF) concentration. Pharmacokinetic parameters were determined by compartmental analysis. *In vitro* macrophage uptake was performed to evaluate the intracellular disposition of the two compounds. *In vitro* transport experiments were also performed in NCI-H441 cell line to determine the potential efflux transporter involved in their pulmonary distribution.

After intravenous administration of linezolid and tedizolid, lung exposition of rats was respectively 2.15 and 225 times greater than unbound plasma exposition. Macrophage uptake of linezolid and tedizolid were characterized by an intracellular/extracellular ratio of 3 and 295 respectively. *In vitro* transport studies did not exhibit an efflux transport, in presence or absence of specific efflux pump inhibitors.

Macrophage lysis could occur during the BAL, leading to an artificially increase of tedizolid ELF concentration. However, this lysis is not enough to explain the whole pulmonary exposition.

Introduction

Effective antimicrobial therapy requires adequate drug concentrations at the site of infection. Nebulized antibiotic therapy directly targets airways and lung parenchyma, resulting potentially in high local concentrations compared to IV administration, improving efficacy and limiting toxicity (1). In a series of standardized experiments in rats, antibiotics with low

apparent membrane permeability such as aminoglycosides offer a real targeting advantage of nebulisation (NEB) compared to i.v. administration (ref 2, 3). By contrast, no targeting advantage of NEB was observed for high permeability drugs such as fluoroquinolones (ref 4). But, interestingly, some of these fluoroquinolones such as moxifloxacin present lung epithelial lining fluid (ELF) concentrations higher than corresponding unbound plasma concentrations after i.v. administration (2) which could be explained by the presence of efflux transporters at the alveolar barrier level (3). Same observations were performed for oxazolidinone antibiotics. Oxazolidinones were used to treat Gram-positive infections including less susceptible pathogens such as vancomycin resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (4, 5). Concerning their lung distribution, LZD lung penetration is variable between studies. Boselli et al., found a mean ELF percentage of penetration at steady state close to 105% in critically ill patients with ventilator associated pneumonia after 600mg 1h-i.v. infusion twice a day (ref Boselli, 2005). The same group, in the same population of patients, but after continuous infusion (600 mg loading dose followed by 12mg/day) and considering a protein binding of 31% (ref protein binding), found a mean $AUC_{ELF,0-24h}$ over $fAUC_{plasma, 0-24h}$ ratio equal to 1.4 (ref Boselli, 2012). However, a LZD $AUC_{ELF,0-24h} / fAUC_{plasma, 0-24h}$ ratio equal to 4.7 was observed in healthy volunteers after oral administration (600 mg every 12h) (Conte et al.). Finally, a mean ELF/serum concentration ratio equal to 8.35 was found in patients undergoing bronchoscopy after oral administration of 600mg twice a day (Honeybourne et al). For TZD, a single previous clinical study in healthy volunteers after oral administration of the prodrug: tedizolid phosphate leads to ELF concentrations 40 times higher on average than unbound plasma (characterized by a ratio $AUC_{ELF,0-24h}$ over $fAUC_{plasma,0-24h}$) (6).

Based on these observations, the aim of this study was to evaluate the *in vivo* lung distribution of oxazolidinones after i.v. administration and nebulization using a standardized protocol in

rats and to evaluate the implication of some efflux transporters by performing apparent membrane permeability of both molecules in NCI-H441 cell line.

Materials and Methods

Chemicals. LZD and TZD-PHO were purchased from Ark Pharm (Montluçon, France) and Matrix Scientific (Columbia, USA) respectively. TZD, 2H8LZD and 13C2H3TZD were from Alsachim (Illkirch-Graffenstaden, France). LY335979, MK571 and Ko143 were from Sigma-Aldrich (Arklow, Ireland). All solvents and chemicals used were of analytical grade.

In vitro permeability studies in NCI-H441 cells.

NCI-H441 (LGC Promochem, Teddington, UK) cells were cultured according to the protocol explained in the study of Nickel et al. (7) with slight modifications. Cells were seeded at the density of 50000/cm² in 1.12 cm² Transwell® inserts. Cells were cultured with RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS (Foetal Bovine Serum), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. After 24h, culture medium was supplemented with 1µM dexamethasone (Sigma Aldrich, Arklow, Ireland) and 1% of insulin-transferrin-selenium (ITS, Sigma Aldrich, Arklow, Ireland). Cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ in liquid-covered culture (LCC) conditions until TEER were above 500 Ω/cm². TEER was measured before and after the transport study, in order to check the integrity of the cell monolayer. Transport studies were performed as previously described (REF OP/OC), with slight modifications. KRB (Krebs Ringer Buffer) was used instead of HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) for the experiment. For the inhibition study, cells were incubated with the inhibitor for 1 h before the experiment. The study was performed using a solution containing a mix ATB/inhibitor and a solution with only the inhibitor was used to replace the sampled volume (100 µL) at t=1, 2 and 3h when the sampling was performed. In

these conditions, cells were in contact with a constant concentration in inhibitor all experiment long (LY335979 10 μ M; MK571 10 μ M and Ko143 0.5 μ M for P-gp, MRP and BCRP inhibition respectively) and the dilution factor of ATBs was considered in the calculation of permeability. Concentration of each inhibitor was chosen to inhibit specifically the transporter of interest (8, 9). Apparent membrane permeabilities (P_{app}) were calculated as previously described (10).

In vitro uptake in rat alveolar macrophages.

Two males Sprague-Dawley rats (300 g) were anesthetized with a mix ketamine 50 mg/mL / xylazine 2% (2/1 v/v and 0.1 mL/100 g of bodyweight). Thoracic cavity has been opened to allow expansion of lungs during bronchoalveolar lavages (BAL). A small incision was made at the midsection of the trachea and a canula was introduced into the trachea. Ten lavages with 10 mL of saline solution (0.9 %) were performed and pooled. The lavage fluid was centrifuged (200 g for 5 min). Macrophages were counted, seeded in 24 wells plate at a density of 250 000 cells/well and incubated for 30 min in HBSS to let them stick to the bottom of the well (n=4 for each ATB). Medium was aspirated and replaced by 0.5 mL of antibiotic solution (5000 ng/mL for both LZD and TZD in HBSS) and cells were incubated for 90 min. Then medium was aspirated and macrophages were rinsed with ice-cold PBS (Phosphate Buffer Saline, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) three times. Macrophages were then lysed with 100 μ L of water/acetonitrile 50/50 solution (v/v). Control wells were used for the count of macrophages at the end of the experiment and other wells without macrophages in order to evaluate the binding of antibiotics to the wells. The amount of antibiotic in the lysis solution (A_{well}) was then evaluated by LC-MSMS. Antibiotic intra-macrophages concentrations (C_{macro}) were obtained by dividing the amount of the antibiotic in the well (A_{well}) by the volume of macrophages (V_{macro}), according to equation 1:

$$C_{\text{macro}} = A_{\text{well}} / V_{\text{macro}}$$

Equation 1

Where V_{macro} corresponds to the count of macrophages in the well multiplied by the average volume of a macrophage. The average volume of a macrophage was estimated according to 3 studies: 989 μm^3 for Sebring et al. (11), 1166 μm^3 for Krombach et al. (12) and 1520 μm^3 for Strom et al. (13), giving a mean volume of 1225 μm^3 .

Impact of alveolar macrophage lysis.

A correction for the lysis effect on alveolar macrophages was determined by using equation 2, according to the method described by Kiem and Schentag (14) and already published by our group for fluoroquinolones (2).

$$C_{\text{ELF}}(\text{estimated}) / C_{\text{ELF}}(\text{actual}) = [1 + (K \times V_{\text{lysis}} / V_{\text{ELF}})] / [1 + (V_{\text{lysis}} / V_{\text{ELF}})]$$

Equation 2

where $C_{\text{ELF}}(\text{estimated})$ are the estimated (experimental) LZD or TZD concentrations in ELF, V_{lysis} is the volume of lysed cells (macrophages), V_{ELF} is the volume of ELF, K is the ratio intramacrophage/extramacrophage determined *in vitro*, $C_{\text{ELF}}(\text{actual})$ is the actual concentration in ELF that would be measured in the absence of cell lysis.

In vivo pharmacokinetics.

Male Sprague-Dawley rats (n=84) (Charles River, l'Arbresle, France) weighting on average 329±18g were used for *in vivo* experiments. Studies were authorized by the local ethic committee COMETHEA and registered by the French Ministry of Higher Education and Research (license n°2015070211159865). All animals were acclimatized for few days before experiments and had free access to water and food during the pharmacokinetic study.

All *in vivo* experiments were performed as previously described (2). LZD was administered intravenously to rats (n=26) as a hydrochloride at the dose of 8.5 mg/kg (eq. base) in saline solution (0.9%). A volume of 100 µL of LZD hydrochloride was administered to rats (n=24) by NEB at the same dose used for i.v. administration study (8.5 mg/kg eq. base). Blood and BAL samples were collected at 0.5, 1, 2, 4, 6h after administration. TZD-PHO was administered as a salt at 10 mg/kg (eq. base, n=12) in a mix of 88 % of saline solution (0.9%), 10% of phosphate buffer (pH 7.2) and 2% of NaOH 1mM. TZD-PHO solution used for i.v. study was at its limit of solubility. Then, the same solution was used for NEB study (n=20) for both molecules, leading to a 10 times lower dose (1 mg/kg). Blood and BAL samples were collected at 0.5, 2, 4 and 6h after administration. BAL and blood samples were centrifuged at 500 g for 5 min and 1000 g for 10 min respectively. As TZD is highly bound to plasma proteins (around 90 % in humans (6)), plasma and BAL samples were ultrafiltrated for the determination of the unbound concentration (1250 g, 30 min, Centrifree, Merck Milipore Ltd., Ireland). Samples were frozen at -20 °C until analysis.

In vitro recovery of ultrafiltration for TZD in BAL. Recovery of ultrafiltration was determined with spiked solutions of TZD in phosphate buffer in the range 100 µg/mL-0.1 µg/mL. Tedizolid in samples was determined before (C_{before}) and after ultrafiltration (C_{after}) (1250 g, 30 min, Centrifree, Merck Milipore Ltd., Ireland) to estimate the recovery of the process. Recovery will be estimated using equation 3.

$$\text{Recovery} = (C_{\text{before}} - C_{\text{after}}) / C_{\text{before}}$$

Equation 3

Analytical assay:

TZD determination were derived from (6) with modifications and adapted to LZD. Samples were treated as following for both compounds: plasma samples (25 µL) were mixed with their

corresponding internal standards 2H8LZD and 13C2H3TZD (100 μ L at 100 ng/mL in acetonitrile) and then centrifuged (11000 g for 10 min). The supernatant (100 μ L) was mixed with 100 μ L of ammonium formate 10 mM in water and 10 μ L were injected into the LC-MSMS system. For BAL, ultrafiltrates (UF) and *in vitro* samples, a surrogate matrix of saline solution (0.9 %) was used. Samples (20 μ L) were mixed with 200 μ L of corresponding internal standard (50 ng/mL), centrifuged at 500 g for 5 min and 10 μ L were injected into the LC-MSMS system. Analytical assays were performed on a LC-MS/MS system, which included a Shimadzu HPLC module (Shimadzu Nexera XR, Marne-la-Vallée, France) coupled with an API 3000 mass spectrometer (Sciex, Life Sciences, Les Ulis, France). A column C18 XBRIDGE BEH300 (150 mm x 2.1 mm, 5 μ m, Waters, Saint Quentin en Yvelines, France) and a security guard cartridge Gemini C18 4 x 2 mm were used for the concentration determination of both LZD and TZD. The mobile phase was ammonium formate 10 mM in water / acetonitrile (50:50 v/v). The mobile phase was infused at 0.2 mL/min. All compounds were studied in positive mode. The m/z transitions used were 338/296; 346/304; 371.06/343.1 and 375/347 for LZD, 2H8LZD, TZD and 13C2H3TZD. Standard curves (10-10000 ng/mL and 5-5000 ng/mL) and quality controls (20-1000-7500 ng/mL and 10-500-3750 ng/mL) for LZD and TZD respectively were performed in plasma and saline solution (0.9 %). Intra-day and inter-day variabilities were studied: accuracy and precision were below 15% for each level of concentration tested for both compounds. Urea concentrations in plasma and BAL were determined according to the protocol previously described (15) and were used to estimate the concentration of each compound in ELF.

Pharmacokinetics modeling.

Total plasma and ELF concentrations of each compound were estimated simultaneously using a non-linear mixed effect modeling approach (NONMEM v7.4, ICON plc, Ireland). Unbound

plasma concentrations were also used for TZD modeling. Data were log-transformed with an additive residual error. For LZD, systemic PK and ELF were each characterized by a single compartment, linked by a two-way diffusion clearance. An additional efflux clearance from plasma to ELF compartment and a systemic renal excretion clearance from central compartment were added (Figure S1). For TZD, both plasma and ELF were characterized by a single compartment and linked by 2 clearances, one from plasma to ELF and one from ELF to plasma. A systemic renal clearance was also added to characterize excretion from plasma compartment., Considering that TZD is a prodrug, plasma and ELF compartments were respectively linked, for each route of administration, to deposit compartments by one-order constants of absorption. An elimination constant was set on the i.v. deposit compartment to mimic the systemic elimination of the prodrug. Modeling of TZD was performed using ELF, total plasma and unbound plasma concentration. Unbound fraction was estimated. For both models, in accordance with previous studies (ref), bioavailability of NEB was set to 100% and ELF volume was set to 10 μL (eq. to 30 $\mu\text{L}/\text{kg}$) (2).

No interindividual variability was estimated for both compounds. Area under the time-unbound drug plasma concentration curve ($\text{AUC}_{\text{plasma}}$) and time-ELF concentrations (AUC_{ELF}) from 0 to ∞ after either IV or NEB administration were calculated using Berkeley Madonna (version 8.3.18, University of California, USA). All extrapolated AUC from t to ∞ were below 10 % of $\text{AUC}_{0-\infty}$.

Statistical analysis.

Data are presented as mean \pm standard deviation. AP/BL and BL/AP permeabilities of the inhibition study were compared to the permeability control and were analysed with t-test ($p < 0.05$) (GraphPad Prism 5.02, La Jolla, CA, USA).

Results

In vitro experiments.

In vitro permeability results. LZD secretory (BL/AP) and absorptive (AP/BL) Papps in NCI-H441 lines were respectively equal to 2.78 ± 0.20 and $2.12 \pm 0.20 \times 10^{-6}$ cm/s corresponding to a ratio of BL/AP over AP/BL permeability of 1.31. Papp of TZD were respectively equal to 8.59 ± 0.65 and $7.16 \pm 0.76 \times 10^{-6}$ cm/s in BL/AP and AP/BL directions corresponding to a ratio of 1.20.

Apparent permeability of TZD and LZD in presence of inhibitors are not statistically different compared to control at the exception of BL/AP permeability in presence of BCRP inhibitor (Table 1).

Table 1: Apparent permeabilities (mean \pm SD, $\times 10^{-6}$ cm/s) with inhibition of LZD and TZD transport in NCI-H441 cell line (n=3)

		Control	P-gp inhibitor (LY335979)	MRP inhibitor (MK571)	BCRP inhibitor (Ko143)
LZD 5 000 ng/mL	AP/BL	2.12 ± 0.20	2.00 ± 0.43	2.23 ± 0.24	2.46 ± 0.17
	BL/AP	2.78 ± 0.20	2.52 ± 0.30	2.55 ± 0.25	2.29 ± 0.16
	ratio	1.31	1.26	1.14	0.93
<hr/>					
TZD 500 ng/mL	AP/BL	7.16 ± 0.76	6.34 ± 0.58	7.97 ± 0.76	7.33 ± 0.88
	BL/AP	8.59 ± 0.65	8.07 ± 0.68	8.43 ± 0.23	$6.78 \pm 0.32^*$
	ratio	1.20	1.27	1.06	0.92

*Significantly different from control ($p < 0.05$, t-test)

Macrophage uptake. Ratios of intracellular/extracellular concentrations (K) of 3 ± 1.5 and 295 ± 95 were respectively observed for LZD and TZD (n=4 for each antibiotic). In the control wells, the quantity bound to the walls was less than 0.5%. No contamination by residuals bound to the walls was observed.

Impact of alveolar macrophage lysis.

For LZD, which presents the smaller intracellular penetration ratio ($K= 3 \pm 1.5$), the estimated ELF concentration overestimated the actual ELF value by 18% for a maximum lysis ($V_{\text{lysis}}/V_{\text{ELF}}$, 10%) (Figure 1). In contrast, the greater intracellular penetration of TZD ($K = 295 \pm 95$) induced an overestimation of the actual ELF concentration by almost 3000% for a maximum lysis (Figure 1).

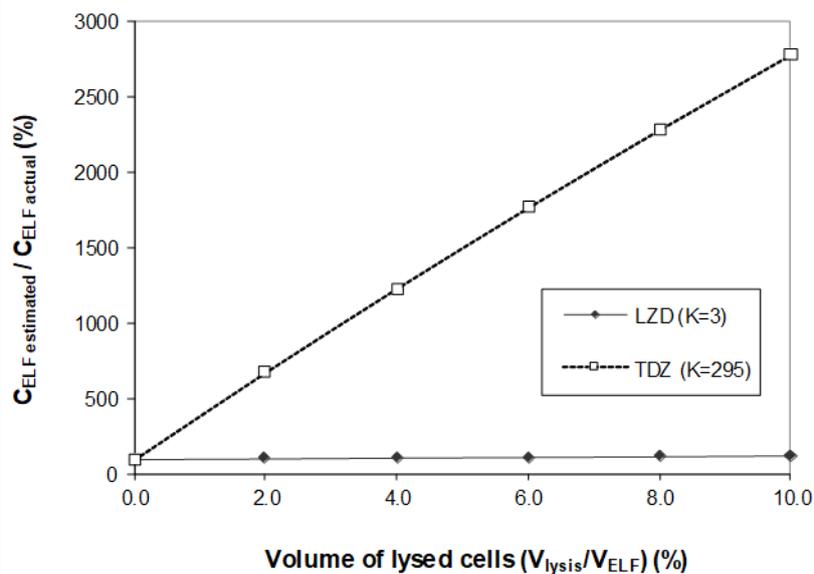


Figure 1: CELF (estimated) /CELf (actual) ratio predicted from Gontijo et al (2), as a function of volume of lysed cells during BAL and K values determined for LZD and TZD

In vitro recovery of ultrafiltration of TZD in BAL.

Recovery of ultrafiltration was of 87% and constant over the range studied. After ultrafiltration, TZD concentrations in BAL were only 15% lower than before ultrafiltration. Consequently, considering non-specific binding to membrane, TZD was assumed to be unbound in BAL.

In vivo experiments.

PK parameters estimates of LZD and TZD are presented in Table S1. After LZD i.v. bolus (Figure 2A). LZD plasma concentrations declined rapidly with time and ELF concentrations declined in parallel with plasma concentrations, with a maximal concentration in ELF obtained at early time ($t=0.5$ h) after i.v. administration, attesting for rapid diffusion of LNZ from plasma to ELF (Figure 2A). Moreover, LNZ ELF concentrations were twice higher than unbound plasma concentrations (Figure 2A) with a ratio $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ equal to 2.15. Concerning TZD, unbound fraction was estimated with the model to be 0.362% (Table S1). After i.v. administration, ELF and plasma concentrations decreased also in parallel (Figure 2C) but ELF concentrations were much higher than corresponding unbound plasma concentrations with an $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ ratio equal to 225. The route of administration (i.v. vs NEB) had no effect on ELF and unbound plasma concentrations of LZD (Figures 2A and B), but for TZD, $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ ratio after NEB was equal to 8416 which is much higher than after i.v (225) (Figures 2C and 2D), corresponding to an AUC_{ELF} ratio NEB over i.v. equal to 54 after correction by the doses.

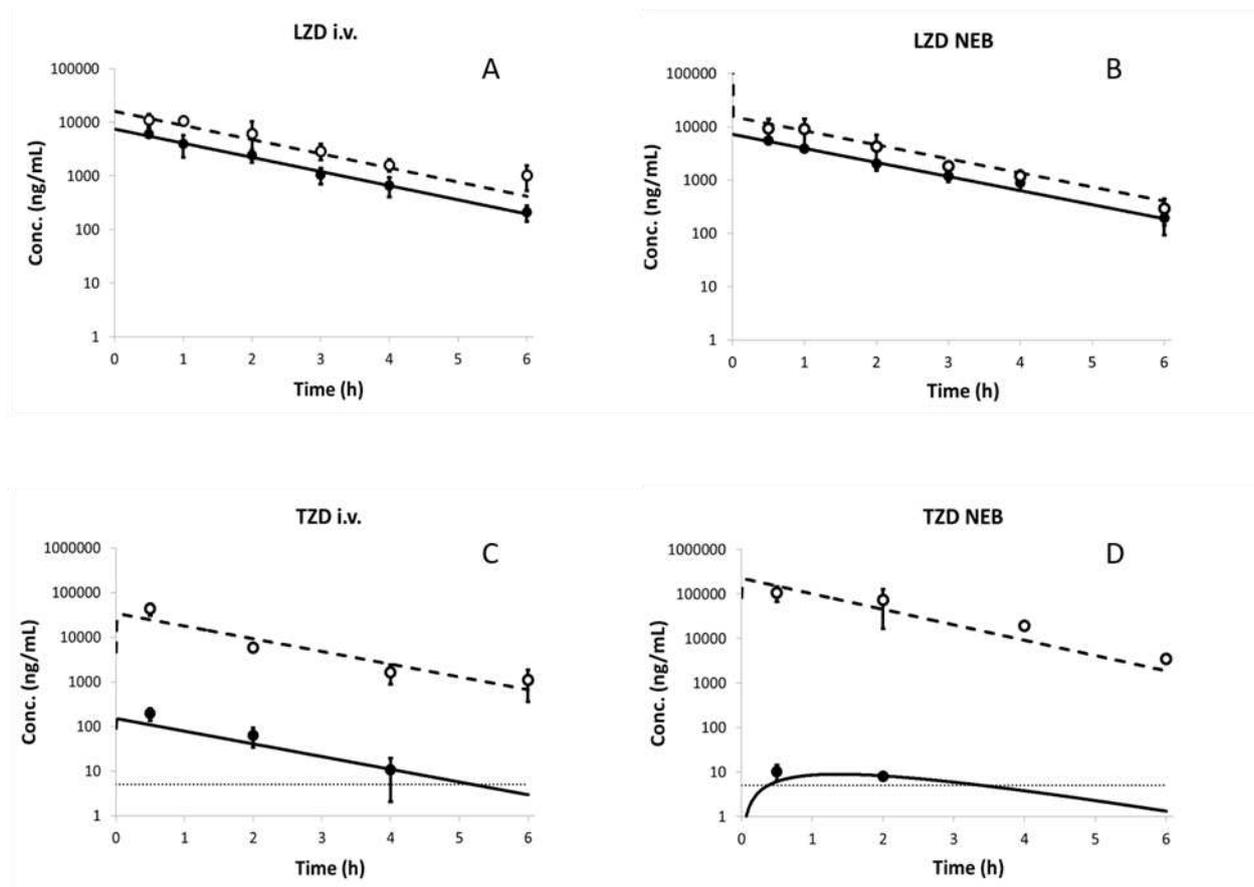


Figure 2: Unbound plasma and ELF concentration-time profiles of LZD (A and B both 8.5 mg/kg) and TZD (C eq. 10 mg/kg and D eq. 1 mg/kg) after either i.v. administration (A and C) or NEB (B and D). Solid lines represent unbound plasma concentrations. Dashed lines represent the ELF concentrations. Close and open symbols represent respectively unbound plasma and ELF concentrations (calculated for LZD by multiplying the total plasma concentration by a theoretical unbound fraction (0.69 from (16)); for TZD obtained by ultrafiltration), expressed as mean \pm SD. Pointed line represents the limit of quantification of TZD.

Discussion

These ELF/unbound plasma AUC ratios greater than one after oral administrations of TZD in healthy volunteers (6) suggest that efflux transporters could be involved in its lung

distribution. In order to better understand the role of transporters in the distribution of TDZ in the lung, the *in vitro* apparent membrane permeability of both oxazolidinones was estimated in NCI-H441 cell lines in presence of efflux transporters selective inhibitors (LY335979, MK571, Ko143) and compared to *in vivo* lung distribution of TZD and LZD, performed using a simple standardized experimental setting previously developed (17, 18), and allowing determination of ELF and unbound plasma exposure both after iv administration and intratracheal nebulization.

After i.v. administration, ELF LZD and TZD concentrations were always higher than unbound plasma concentrations (Figures 2A et C), but the $AUC_{ELF}/AUC_{u,plasma}$ ratio for TZD was 100 times higher (225) than that of LZD (2.15), suggesting that efflux transporters could be involved in lung distribution at least for TZD. *In vitro* results showed that the absorptive permeability for TZD was 3 times higher ($7.16 \pm 0.76 \times 10^{-6}$ cm/s) than that of LZD ($2.12 \pm 0.20 \times 10^{-6}$ cm/s) in accordance to their respective lipophilicity (logP 2.12 and 0.62 for TZD and LZD, from www.Drugbank.ca with the ChemAxon predictor). However, no significant differences between secretory (from basolateral to apical) and absorptive (from apical to basolateral) Papp were observed with ratios close to 1 (BL/AP over AP/BL permeability ratios respectively equal to 1.31 and 1.20 for LZD and TZD) (Table 1). Moreover, no effect of different efflux pumps inhibitors (LY335979 for P-gp; MK571 for MRP and Ko143 for BCRP) on both permeabilities was observed for the two compounds, suggesting that these efflux transporters are not involved in lung distribution of LZD and TZD. The choice of *in vitro* model could be a part of this *in-vitro/in-vivo* discrepancy, but by exhibiting features of both alveolar (i.e. type II cell) and bronchiolar (i.e. club cell) epithelial phenotype; NCI-H441 cell line appears to be an adequate *in vitro* model for transport studies at the level of lung epithelial barrier (19). Moreover, drug transporter expression and activity are consistent with what has been reported for human alveolar epithelial cells in primary cultures (19). *In vitro*

apparent membrane Papp experimentations in NCI-H441 cell line were also reproduced in Calu-3 epithelial cell model (20, 21) and not surprisingly, no difference between secretory and absorptive Papp were observed in this model too (data not shown).

Some factors can enter in a misinterpretation of ELF concentrations based on BAL sampling (14) and could explain these discrepancies between *in vitro* and *in vivo* results. First, the concentration of protein in ELF needs to be known for assessment of the unbound free-drug concentrations in ELF. Traditionally, protein binding of drugs is assumed negligible in ELF (14), but TZD presents an extensive plasma protein binding, estimated in the study to 99.6% (Table S1). However, when measuring unbound TZD in BAL after ultrafiltration and unspecific binding of TZD on filtration membranes, it was confirmed in the present study that TZD was unbound in BAL samples. Second, the “dwelling time” of fluid during the BAL can be also a source of error in the urea method (14). When times of BAL are prolonged (1 min), urea can over diffuse from the interstitium and other tissue and ELF volume can be overestimated. As in our previous studies (17, 18), the volume was limited to 1 ml in the present study in order to preserve the integrity of the pulmonary barrier. Moreover, saline aspiration was performed only once and for no longer than 15 to 20 s to limit a significant “dwelling time. Third, ELF is a mixture of components and especially alveolar macrophages are present in ELF. These cells may be lysed during the measurement of drugs concentration in BAL. Therefore, when drug intracellular concentrations are greater than in surrounding fluid, lysis of some or all cells could artificially increase the measured ELF concentration of the antibiotic (14). This methodology and the impact of macrophages lysis was already investigated by our group for fluoroquinolones (2) and TZD presents an intracellular penetration (295 ± 95) respectively 10 and 100 times higher than that previously described for grepafloxacin (25.2 ± 0.9) (2) and that of LZD in the present study. In accordance with grepafloxacin results, for which a difference of more than 300% was observed between the

estimated and actual ELF drug concentrations when lysis was maximum, an increase of TZD ELF concentrations by a factor 30 was observed for the same lysis corresponding to a difference of more than 3000% (Figure 2). Consequently, in the absence of efflux transporters involved in lung distribution of TZD (Table 2), the macrophages lysis could partially explain the much higher reported ELF (225 times) than unbound plasma concentrations after i.v. administration. Due to the fact that TZD is a lipophilic molecule ($\log P = 2.12$), its high exposure in lungs could be also explained by its binding to pulmonary surfactant and/or phospholipids, leading to a sequestration within the ELF as it was recently described for lascufloxacin (22). This hypothesis needs to be further investigated. On opposition to TZD, and as it was previously estimated by Kiem and Schentag (23), a potential macrophages lysis does not affect the estimation of LZD ELF concentrations (Figure 2).

Finally, for nebulization of oxazolidinones, considering that LZD is a lipophilic molecule and that its lung distribution is only governed by passive diffusion (Table 2), nebulization is not an interesting way of administration for this molecule (Figures 2 A and B). However, for TZD, results are different. Indeed, even if ELF concentrations are polluted by macrophages lysis, ELF AUC after nebulization is 54 times higher than the corresponding AUC after i.v. administration suggesting an interest to administer this drug by nebulization, even if further investigations will be difficult to perform due to methodological issues.

In conclusion, this study showed that efflux transporters as P-gp, MRP and BCRP were not involved in lung distribution of oxazolidinones. But, the interpretation of studies with estimated TZD concentrations in ELF obtained from BAL sampling should be performed with caution due to macrophages lysis and significant pollution related to the release of drug from macrophages.

Acknowledgments.

This work has benefited from the facilities and expertise of PREBIOS platform (University of Poitiers).

1. Hagerman JK, Hancock KE, Klepser ME. 2006. Aerosolised antibiotics: a critical appraisal of their use. *Expert opinion on drug delivery* 3:71–86.
2. Gontijo AVL, Brillault J, Grégoire N, Lamarche I, Gobin P, Couet W, Marchand S. 2014. Biopharmaceutical characterization of nebulized antimicrobial agents in rats: 1. Ciprofloxacin, moxifloxacin, and grepafloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58:3942–3949.
3. Bosquillon C. 2010. Drug transporters in the lung—do they play a role in the biopharmaceutics of inhaled drugs? *Journal of pharmaceutical sciences* 99:2240–2255.
4. Jones RN, Moet GJ, Sader HS, Mendes RE, Castanheira M. 2009. TR-700 in vitro activity against and resistance mutation frequencies among Gram-positive pathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 63:716–720.
5. Roger C, Roberts JA, Muller L. 2018. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxazolidinones. *Clinical pharmacokinetics* 57:559–575.
6. Housman ST, Pope JS, Russomanno J, Salerno E, Shore E, Kuti JL, Nicolau DP. 2012. Pulmonary disposition of tedizolid following administration of once-daily oral 200-milligram tedizolid phosphate in healthy adult volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56:2627–2634.
7. Nickel S, Selo MA, Fallack J, Clerkin CG, Huwer H, Schneider-Daum N, Lehr C-M, Ehrhardt C. 2017. Expression and Activity of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Human Distal Lung Epithelial Cells In Vitro. *Pharmaceutical research* 34:2477–2487.
8. Matsson P, Pedersen JM, Norinder U, Bergström CA, Artursson P. 2009. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharmaceutical research* 26:1816–1831.

9. Shepard RL, Cao J, Starling JJ, Dantzig AH. 2003. Modulation of P-glycoprotein but not MRP1-or BCRP-mediated drug resistance by LY335979. *International journal of cancer* 103:121–125.
10. Brillault J, De Castro WV, Harnois T, Kitzis A, Olivier J-C, Couet W. 2009. P-glycoprotein-mediated transport of moxifloxacin in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:1457–1462.
11. Sebring R, Lehnert B. 1992. Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages, and blood monocytes. *Experimental lung research* 18:479–496.
12. Krombach F, Münzing S, Allmeling A-M, Gerlach JT, Behr J, Dörger M. 1997. Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environmental health perspectives* 105:1261.
13. Strom KA. 1984. Response of pulmonary cellular defenses to the inhalation of high concentrations of diesel exhaust. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues* 13:919–944.
14. Kiem S, Schentag JJ. 2008. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52:24–36.
15. Marchand S, Gobin P, Brillault J, Baptista S, Adier C, Olivier J-C, Mimoz O, Couet W. 2010. Aerosol therapy with colistin methanesulfonate: a biopharmaceutical issue illustrated in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:3702–3707.
16. c Moellering Jr R. 2003. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Annals of internal medicine* 138:135.
17. Marchand S, Boisson M, Mehta S, Adier C, Mimoz O, Gregoire N, Couet W. 2018. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats. 6. Aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.

18. Carrez R, Brillault J, Grégoire N, Lamarche I, Laroche J, Couet W, Marchand S. 2019. Pulmonary Pharmacokinetics of Oseltamivir Carboxylate in Rats after Nebulization or Intravenous Administration of Its Prodrug, Oseltamivir Phosphate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63:e00074-19.
19. Salomon JJ, Muchitsch VE, Gausterer JC, Schwagerus E, Huwer H, Daum N, Lehr C-M, Ehrhardt C. 2014. The cell line NCI-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier. *Molecular pharmaceutics* 11:995–1006.
20. Foster KA, Avery ML, Yazdanian M, Audus KL. 2000. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 208:1–11.
21. Brillault J, De Castro WV, Couet W. 2010. Relative contributions of active mediated transport and passive diffusion of fluoroquinolones with various lipophilicities in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:543–545.
22. Ohya K, Takano J, Manita S. 2019. In Vitro Mechanistic Study of the Distribution of Lascufloxacin into Epithelial Lining Fluid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63:e02208-18.
23. Kiem S, Schentag JJ. 2014. Interpretation of epithelial lining fluid concentrations of antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection & chemotherapy* 46:219–225.

Supplemental materials

Table S1: Value of parameters of linezolid (LZD) and tedizolid (TZD) estimated with the model.

Typical value (CV %)	LZD	TZD
V_{plasma} (mL)	813 (5.7%)	11400 (14.8%)
CLR (mL/h)	494 (3.4%)	7480 (13.4%)
CL plasma-ELF (mL/h)	2.34 (36.6%)	205 m (23.3%)
CL ELF-plasma (mL/h)	1.09 (37.8%)	0.91 (17.0%)
VELF (μL)	10 (fixed)	10 (fixed)
K_a plasma (h⁻¹)	/	100 (fixed)
K_a ELF (h⁻¹)	/	0.827 (8.9%)
K_e prodrug (h⁻¹)	/	86.7 (20%)
fu (%)	/	0.362
Residual plasma	0.0596 (20.1%)	0.0659 (24.1%)
Residual unbound plasma	/	0.303 (27.6%)
Residual ELF	0.217 (23.6%)	0.585 (21.9%)

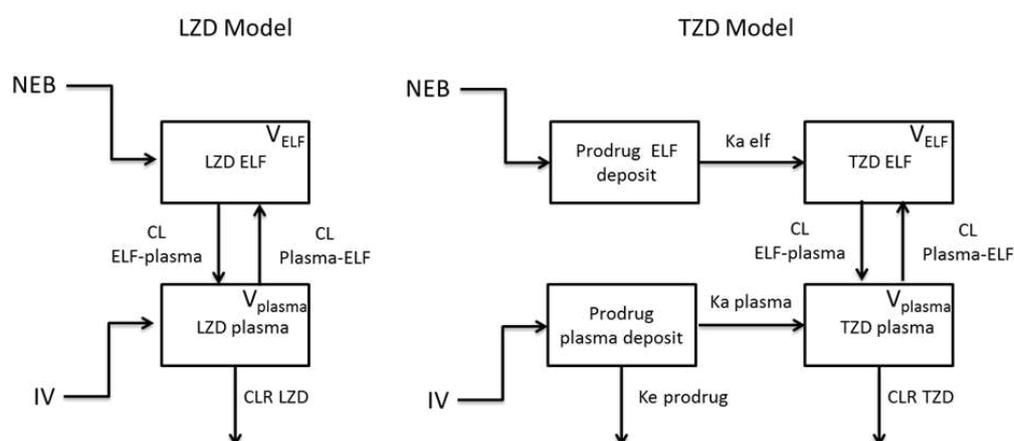


Figure S1: Compartmental models of linezolid (LZD) and tedizolid (TZD)

Discussion

Après nébulisation, les transporteurs d'efflux apicaux auraient l'avantage de maintenir de fortes concentrations pulmonaires de leur substrat. Le potentiel avantage des transporteurs d'efflux a été étudié entre autres avec l'oseltamivir phosphate (OP). Toutefois, cette molécule est un promédicament de l'oseltamivir carboxylate (OC), ce qui complexifie l'étude de la distribution pulmonaire du métabolite actif. L'OC après administration IV et NEB d'OC a montré une disponibilité thérapeutique (TA) proche de 500 chez le rat, dû à sa faible perméabilité (130). Son promédicament (OP) a une perméabilité plus élevée, ce qui diminue son intérêt à l'administrer au niveau du poumon. Mais des données de perméabilité *in vitro* sur Calu-3 dans le présent travail ainsi que des données préliminaires suggèrent que l'OP est substrat de pompes d'efflux et notamment de la P-gp (136), ce qui permet d'obtenir de fortes concentrations locales après voies IV et nébulisée. Mais est-ce que la conversion locale en OC est suffisante pour qu'il y ait un intérêt à le nébuliser sous forme de promédicament ? D'après notre étude, la vitesse de conversion de l'OP en OC est 42 fois plus lente que la vitesse d'absorption de l'OP ($CL_{convOP} = 0.00042 \text{ L/h/kg}$ vs $Q_{effOP} = 0.018 \text{ L/h/kg}$). En conséquence, la majorité de l'OP est absorbée avant d'être converti en OC, cette conversion pré-systémique n'étant que de 2%. La nébulisation de l'OP est donc une voie d'administration qui ne semble pas adaptée si l'on souhaite obtenir de fortes concentrations pulmonaires d'OC. Bien que les transporteurs d'efflux (Pgp, MRP1 et BCRP), orientés du plasma vers le poumon, permettent d'avoir une exposition plus importante du poumon par rapport au plasma (ce qui est intéressant pour une molécule à action locale), ces transporteurs n'offrent aucun avantage à l'administration par voie nébulisée d'un promédicament (ici l'OP) si son absorption est plus rapide que sa conversion. Dans le cas d'une absorption plus lente (cad d'un médicament à plus faible perméabilité), cette voie d'administration semble offrir un

intérêt. Cela a été montré avec la nébulisation de colistimethate sodique (CMS), le promédicament de la colistine chez le rat (137) et confirmé chez l'homme (126). Contrairement à l'OP, qui a été mis sur le marché pour son absorption améliorée comparativement à l'OC, le CMS est conçu pour être moins toxique que son métabolite actif (138). Les deux composés étant des grosses molécules, ionisées, ils ont une faible perméabilité (la Papp de la colistine est de 0.04 ± 0.02 sur un modèle Calu-3, celle du CMS n'a pas été investiguée). La faible absorption du promédicament laisse le temps à un métabolisme local. En conséquence, après administration du promédicament par nébulisation, il a été montré qu'approximativement un tiers de la dose était convertie pré-systémiquement (137), comme schématisé dans la Figure 13, conduisant à une exposition plus importante en colistine après NEB du CMS qu'après administration iv de son promédicament. Cela n'a pas été observé chez l'OP bien que celui-ci soit substrat de la Pgp, ce qui aurait dû diminuer son absorption.

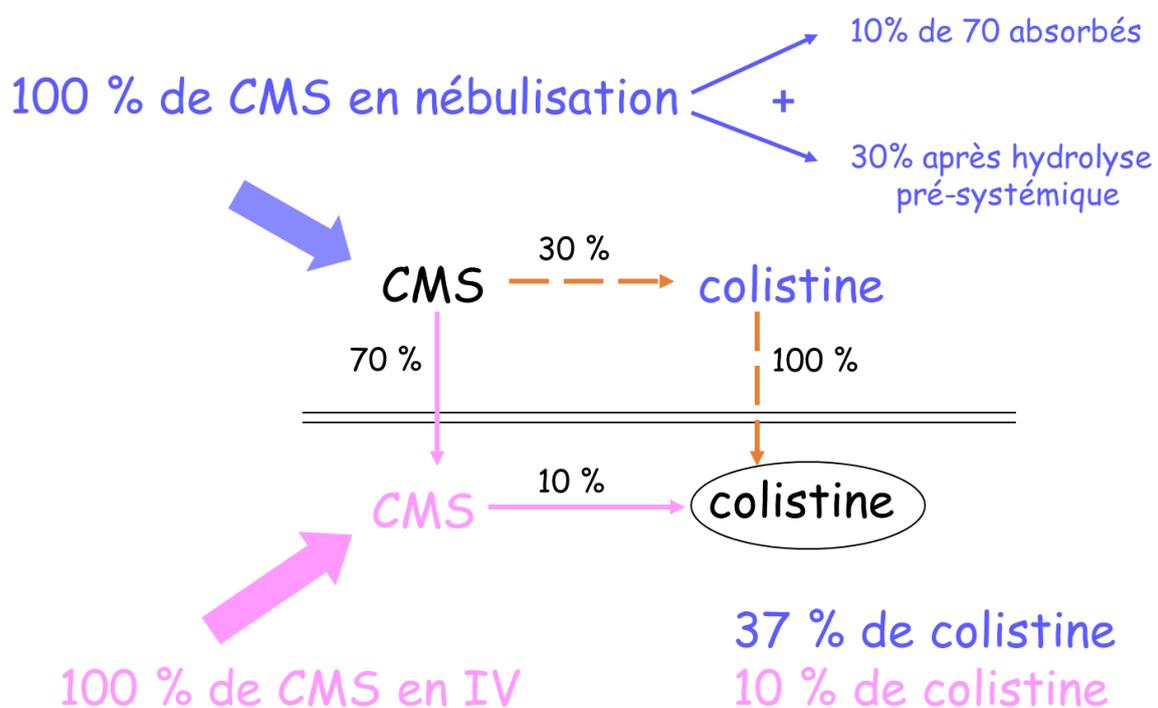


Figure 13 : Schéma de la conversion du CMS en colistine après administration intraveineuse ou nébulisation. En bleu la pharmacocinétique après nébulisation du CMS et en rose après administration intraveineuse du CMS. Adapté de (137).

L'intervention des transporteurs d'efflux n'est donc pas un gage d'avantage significatif après une nébulisation. La nébulisation de promédicament est un processus complexe qui nécessite une évaluation au cas par cas.

Comme nous l'avons vu, la pharmacocinétique pulmonaire d'un composé est très dépendante de sa perméabilité. Est-il possible de corréler une perméabilité déterminée *in vitro* à un profil pharmacocinétique *in vivo* ? Notre laboratoire a évalué le comportement pharmacocinétique de plusieurs molécules anti-infectieuses dans l'objectif d'élaborer une classification biopharmaceutique pulmonaire permettant de prédire la capacité d'une molécule à être nébulisée. Ces travaux se basent sur des études de perméabilité des molécules sur un modèle de cellules Calu-3 (84) associés à des mesures d'exposition dans l'ELF pulmonaire de ces mêmes molécules après administration IV et nébulisée (82, 83, 127–130, 139). Les principaux résultats ont été résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 7) :

Tableau 7 : Classification d'agents anti-infectieux en fonction de la disponibilité thérapeutique (TA)

Molécules	LogP (de www.drugbank.ca)	Perméabilité ($\times 10^{-6}$ cm/s) sur la lignée Calu-3	TA obtenue après administration chez le rat sain
Linézolide (LNZ)	0.9	7.31 \pm 0.5	0.8
Moxifloxacin (MXF)	2.9	5 \pm 0.2	0.95
Chloramphénicol (CHA)	1.14	4.1 \pm 0.2	1
Lévoﬂoxacin (LVX)	2.1	2.4 \pm 0.10	1
Oseltamivir phosphate (OP)	1	1.37 \pm 0.17	1.0

Ciprofloxacine (CIP)	0.28	0.70±0.02	1.2
Thiamphénicol (THA)	-0.22*	0.91±0.10	7
Tédizolide (TDZ)	2.12*	9.44 ± 0.71	54 ²
Gentamicine (GTM)	-3.1	<0.05 ¹	108
Tobramycine (TOB)	-6.5	<0.05 ¹	172
Oseltamivir carboxylate (OC)	-1.8*	0.80±0.20	576
Colistine (COL)	-2.4	0.04±0.02	636
Amikacine (AMK)	-3.2*	<0.05 ¹	1137
Aztréonam (AZT)	-3.1*	0.07±0.02	2761

* Valeurs prédites du logiciel de prédiction ChemAxon

¹Les valeurs de Papp n'ont pas pu être déterminées plus précisément à cause d'une limite analytique et de toxicité cellulaire

²Le TA du tédizolide a été déterminé par administration de son promédicament, le tédizolide phosphate.

Plusieurs commentaires peuvent être apportés sur ce tableau qui peut servir de base à une classification biopharmaceutique pulmonaire :

- Le logP semble pouvoir discriminer les composés intéressants à nébuliser. En effet, les composés ayant un logP supérieur à zéro, caractéristique des molécules lipophiles qui diffusent facilement à travers les barrières, et sont donc associés *in vivo* à un TA proche de 1 (sauf le tédizolide, qui sera détaillé ultérieurement) (Figure 14), c'est-à-dire qui ne présentent pas d'intérêt à la nébulisation. D'un autre côté, de manière logique, les composés hydrophiles (logP<0) sont intéressants à nébuliser car leur TA dépasse 100 (Figure 14).

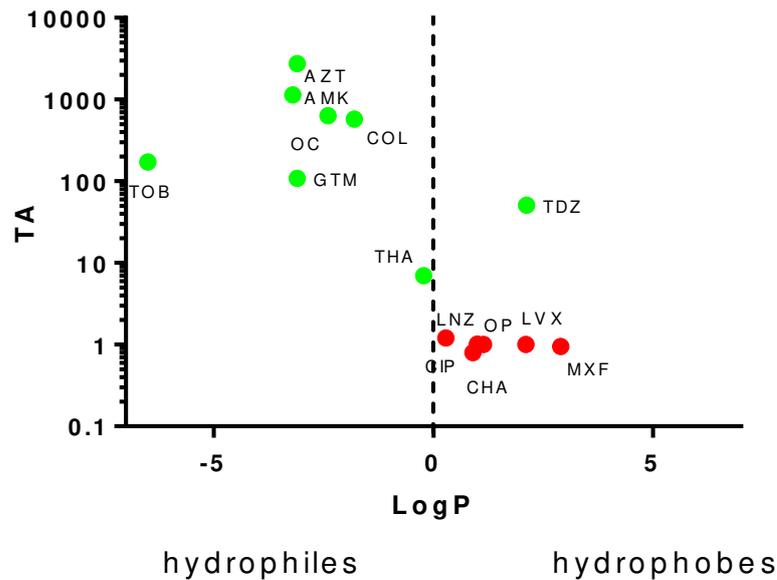


Figure 14 : Distribution du TA d'agents anti-infectieux en fonction de leur logP, en vert les composés ayant un TA proche de 1 et en rouge ceux ayant un TA supérieur à 1 et donc intéressants à nébuliser.

- Cependant, même si le logP semblent discriminer les composés intéressants à nébuliser, il ne semble pas prédire l'importance de l'exposition *in vivo* des molécules dans ELF après nébulisation. En effet, il n'existe pas de corrélation claire entre le logP et l'importance du TA. La tobramycine (TOB), la gentamicine (GTM) et l'amikacine (AMK) sont des aminosides présentant des caractéristiques physicochimiques proches avec des poids moléculaires respectifs de 467.5, 477.6 et 585.6 g/mol, des logP de -3.1, -3.2 et -6.5 et des charges à pH physiologique comparables (respectivement 5, 5 et 4) conduisant à pH physiologique, à des logD très proches : -8.27 pour la GTM, -9.81 pour l'AMK et -9.45 pour la TOB (données de www.chespider.com). Ces caractéristiques proches conduisent toutefois à des TA *in vivo* significativement différents : 108 pour la GTM, 172 pour la TOB et 1137 pour l'AMK qui reste à ce jour encore inexpliqué.
- Le TA calculé Équation 4 (page 49) est propre à chaque molécule et au modèle pharmacocinétique utilisé pour le caractériser. Pour tous les TA présentés dans le

Tableau 7, les AUC calculées ne comprennent pas l'intervalle entre 0 et 30min (correspondant au premier temps de prélèvement). Il a été choisi de ne pas prendre en compte cet intervalle car les modèles pharmacocinétiques utilisés sont tous basés sur le fait que la totalité de la dose a été administrée à $t=0$ dans un volume très faible (celui de l'ELF). Cette hypothèse est cohérente avec l'utilisation de la nébulisation intratrachéale à l'aide du microsprayer mais a pour conséquence d'estimer par le modèle des concentrations dans l'ELF très élevées (équivalente à plusieurs mg dans un volume inférieur à 1mL) dans les temps précoces de la cinétique après nébulisation. Ceci conduit à une exposition des anti-infectieux dans l'ELF très fortement sur-estimée après voie nébulisée et notamment pour les molécules à forte perméabilité. Pour limiter cet artefact, le TA a été estimé en omettant l'intervalle de temps 0-30min c'est à dire la phase de distribution, ce qui est source de biais dans l'analyse. Pour pouvoir évaluer de manière comparable ces molécules, il faudrait analyser les profils pharmacocinétiques avec le même modèle, ce qui n'a pas été possible avec des modèles pharmacocinétiques conventionnels. Toutefois, il a été envisagé de développer un modèle pharmacocinétique minimal basé sur la physiologie (PB/PK) où seuls les compartiments plasma et ELF seraient représentés via le logiciel de modélisation physiologique Gastroplus®. Ce type de logiciels a de nombreuses limites, notamment que les équations différentielles qui ne sont pas accessibles et les compartiments sont déjà prédéfinis. Dans notre cas, il n'y avait pas de compartiment « ELF », il n'était donc pas possible de décrire correctement les concentrations et d'y définir un métabolisme local dans le cas des promédicaments. La solution a donc été de se retourner dans le présent travail vers de la modélisation compartimentale.

- Les modèles cellulaires *in vitro* semblent pouvoir discriminer les comportements pharmacocinétiques pulmonaires, mais essentiellement pour des valeurs extrêmes de

perméabilité : les molécules à fortes perméabilités ($>2 \times 10^{-6}$ cm/s) ont un TA proche de 1 et celles à faibles perméabilités ($<0.1 \times 10^{-6}$ cm/s) permettent d'obtenir des TA intéressants, supérieurs à 100.

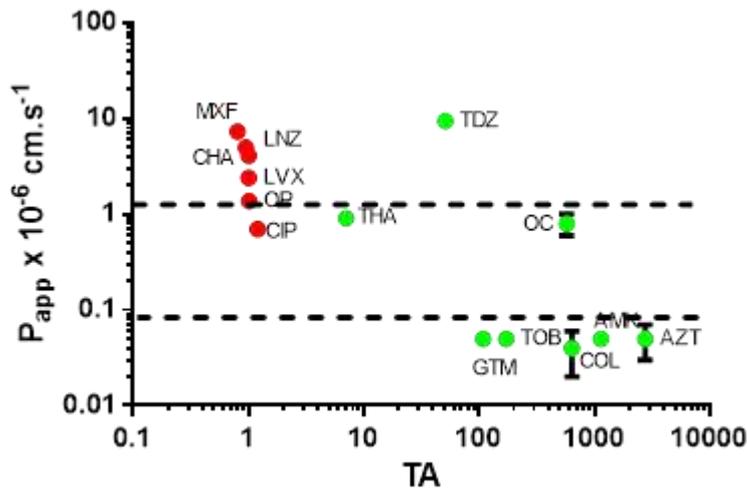


Figure 15 : perméabilité *in vitro* en fonction de la disponibilité thérapeutique (TA) mesurée *in vivo* chez le rat

Il existe cependant une zone où la perméabilité se situe entre 0.1 et 2×10^{-6} cm/s où les TA sont plus difficilement prévisibles. Trois molécules (ciprofloxacine (82, 140), oseltamivir carboxylate (130, 139) et thiamphénicol (91)) illustrent cette observation. Elles présentent des valeurs de perméabilité très proches de ce seuil et proches entre elles (respectivement de 0.70 ± 0.02 , 0.80 ± 0.20 et $0.91 \pm 0.10 \times 10^{-6}$ cm/s) mais ont un comportement *in vivo* très différent avec un TA proche de 1 pour la ciprofloxacine, proche de 10 pour le thiamphénicol et supérieur à 500 pour l'oseltamivir carboxylate, comme illustré dans la

Figure 16 : Profils pharmacocinétique chez le rat sain dans le plasma (en rouge) et l'ELF (en bleu) obtenus après administration intraveineuse (à gauche) et nébulisation (à droite) du thiamphénicol (en cours de publication), de l'oseltamivir carboxylate (130) et de la ciprofloxacine (82).

. Ces résultats montrent la difficulté de définir un seuil expérimental de perméabilité qui permettrait d'appréhender correctement le comportement biopharmaceutique *in vivo*.

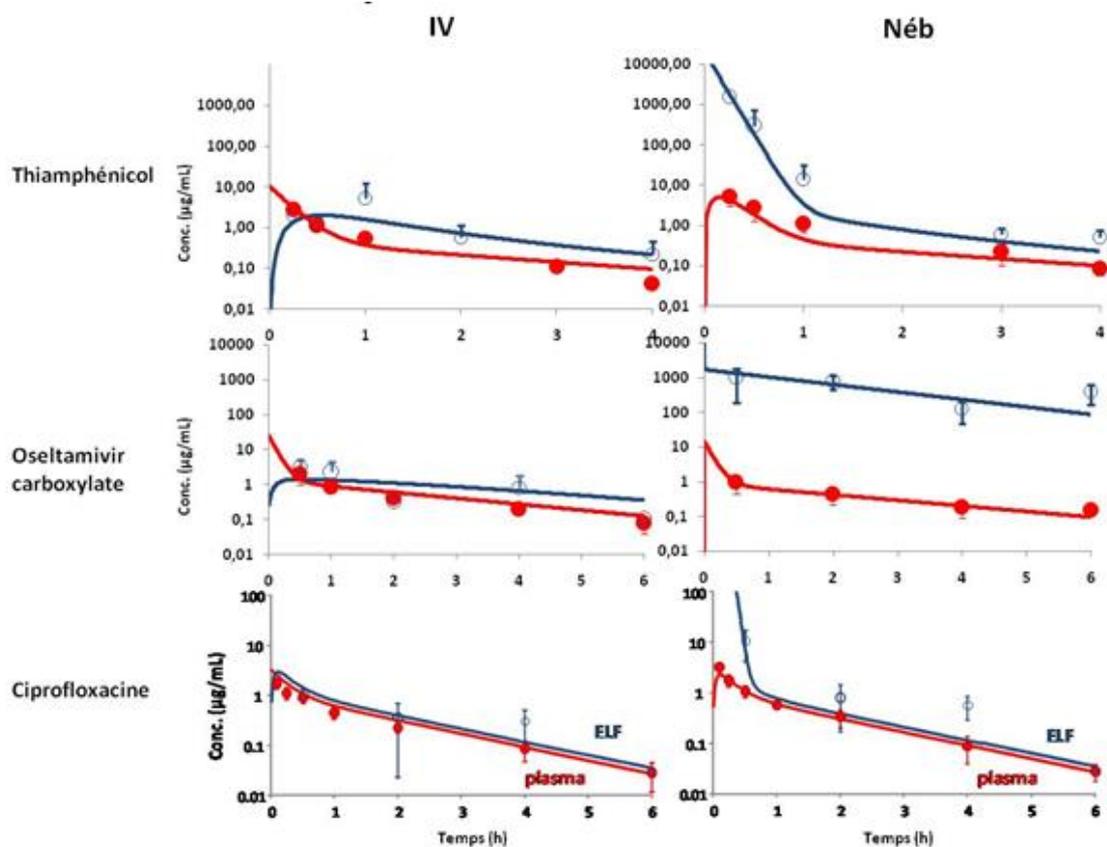


Figure 16 : Profils pharmacocinétique chez le rat sain dans le plasma (en rouge) et l'ELF (en bleu) obtenus après administration intraveineuse (à gauche) et nébulisation (à droite) du thiamphénicol (en cours de publication), de l'oseltamivir carboxylate (130) et de la ciprofloxacine (82).

Le manque de corrélation *in vitro/in vivo* est également visible dans ce travail de thèse. Par exemple, l'OC se classe parmi les molécules perméables sur un modèle de cellules Calu-3 ($P_{app} = 0.80 \times 10^{-6}$ cm/s) mais présente le comportement d'une molécule peu perméable *in vivo* avec un $TA > 500$.

- Ce manque de corrélation *in vitro/in vivo* pourrait être le résultat d'une différence de charge de la molécule entre les expérimentations. Le pH alvéolaire est difficilement

mesurable (141, 142). Le liquide pulmonaire fœtal, qui remplit les poumons d'un fœtus avant les premières respirations, a été évalué à un pH de 6.27. On peut donc émettre l'hypothèse que le surfactant pulmonaire puisse être légèrement acide. Dans le logiciel pharmacocinétique spécialisé en physiologie SimCYP[®], la population « volontaire sain » est caractérisée par un pH des fluides pulmonaires de 6.6 (143).. Dans notre travail de thèse, les études de perméabilités *in vitro* ont été menées au pH physiologique sanguin (pH 7.4), pouvant être à l'origine des différences d'ionisation et donc de divergences entre les études *in vitro* et *in vivo*. Revenons au cas de l'OC qui présente un pKa de 4 et 7,9. Sa forme acide est toujours ionisée, car on travaille à des pH supérieurs à 6. Lors des études *in vitro*, à pH proche du pKa2, l'OC est à moitié sous forme ionisée et sous forme non ionisée. Dans l'étude *in vivo*, à pH plus acide, la proportion de la forme ionisée augmente suggérant que la molécule traverse plus difficilement les épithéliums.

- Les résultats de l'OP et du LZD sont cohérents, il s'agit de molécules perméables *in vitro* et *in vivo*, avec un TA proche de 1.
- Le tédizolide quant à lui a fourni des résultats en demi-teinte. Tout d'abord, le comportement du TZD *in vivo* suggère qu'il soit substrat de pompes d'efflux (AUC ELF > AUC plasma libre après administration iv chez le rat et après administration orale chez l'homme) mais cet efflux n'apparaît pas *in vitro*. La majorité des pompes d'efflux étant exprimées dans les deux modèles cellulaires étudiés (Calu-3 et NCI-H441) d'autres hypothèses ont été explorées :
 - La possibilité d'une liaison aux protéines dans l'ELF, et dans ce cas on comparerait les concentrations totales dans l'ELF et les concentrations libres plasmatiques. Mais après ultrafiltration des lavages broncho-alvéolaires, les mêmes concentrations sont retrouvées par rapport aux concentrations avant l'ultrafiltration (différence de 15%). Même si de l'albumine est présente au niveau

de l'ELF, les concentrations dans l'ELF peuvent être considérées comme des concentrations libres.

- La possibilité d'une accumulation dans les macrophages présents dans l'ELF et d'un relargage à la suite d'une lyse de ces macrophages. Dans l'étude de Housmann étudiant la pharmacocinétique pulmonaire du TZD chez le volontaire sain (135), il a été observé un ratio proche de 40 entre les AUC ELF et plasma libre et un ratio 20 entre les AUC macrophages et plasma libre. À la suite de cette observation, on peut en déduire un ratio de 2 entre l'AUC ELF et l'AUC macrophages. Les concentrations en TZD dans l'ELF et dans les macrophages semblent donc relativement proches et une lyse des macrophages pendant le lavage broncho-alvéolaire ne devrait avoir aucune incidence sur les concentrations en TZD. Pour vérifier cette observation *in vivo*, un ratio intracellulaire/extracellulaire a été déterminé *in vitro* dans notre laboratoire à partir de macrophages de rats mis en culture. Un ratio concentrations intra-macrophages et extracellulaires, proche de 300 a été déterminé pour le TZD. Cette accumulation intra-macrophage du TZD (ratio intra/extracellulaire = 300) importante chez le rat est différente de ce qui a été initialement observée chez l'homme (135). Toutefois, le volume des macrophages représentent au maximum 10% du volume de l'ELF (26), si la totalité des macrophages étaient lysés pendant le processus de lavage broncho-alvéolaire, une augmentation de la concentration d'un facteur 30 serait observée (Figure 1, article 2). Or les concentrations dans l'ELF sont 225 fois plus élevées dans l'ELF par rapport aux concentrations plasmatiques libres chez le rat, La lyse des macrophages permet donc d'expliquer une partie des très fortes concentrations dans l'ELF observées pour le TZD, mais ne suffit pas pour en expliquer la totalité.

- Une dernière hypothèse pourrait contribuer à l'explication de ces fortes concentrations dans l'ELF, il s'agit d'une potentielle l'affinité de la molécule pour les composants du surfactant présents dans l'ELF, ce qui conduirait à une séquestration dans ce compartiment. Ce phénomène a été initialement observé pour la lascufloxacin, une nouvelle fluoroquinolone active contre de nombreux pathogènes respiratoires. Après administration orale chez l'homme, les concentrations dans l'ELF sont 62 fois plus élevées par rapport aux concentrations plasmatiques libres, ce qui est beaucoup plus élevé que pour les autres fluoroquinolones (144). Ohya et al. ont montré que la lascufloxacin se liait aux composants de l'ELF et notamment à la phosphatidylsérine (145), proposant que la liaison au surfactant pulmonaire est un mécanisme majeur dans la forte distribution de cette fluoroquinolone dans l'ELF. La méthodologie consiste à mesurer la partition d'une molécule entre deux phases lipophile et hydrophile (hexane / HBSS). La présence de surfactant ou de ses composants (principalement des phospholipides) modifie cette partition, ce qui permet d'évaluer indirectement la liaison aux composants du surfactant. En utilisant cette approche dans notre laboratoire lors d'une étude préliminaire *in vitro* comparant l'affinité du TDZ avec du Curosurf (extrait de surfactant pulmonaire d'origine porcine) ou différents phospholipides (phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, et phsophatidylsérine,) Il a pu être montrer que le tedizolide se lie aux composants du Curosurf de façon dépendante de la concentration, sans pour autant avoir pu identifier quel(s) phopsholipide(s) étai(en)t impliqué(s) (Figure 17).

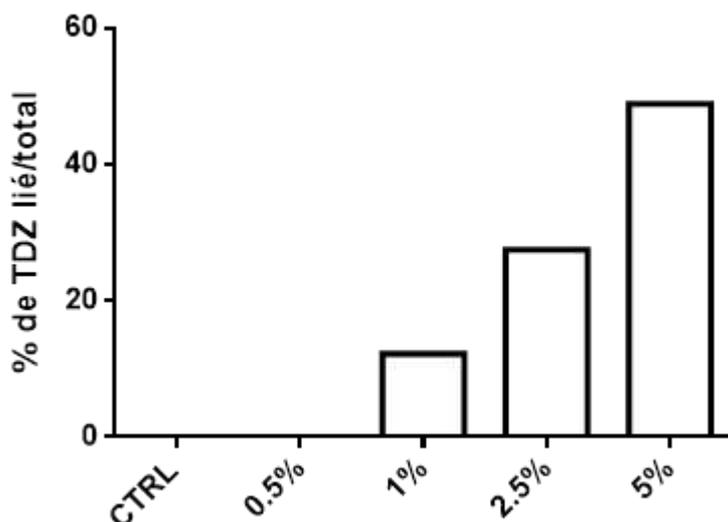


Figure 17 : Fraction de tédizolide lié aux surfactants pulmonaires. Différents % en volume de Curosurf ont été ajoutés dans les phases hexane et HBSS avant partition. Après 24hrs de décantation, la concentration de tédizolide dans la phase hexane représente la forme liée et la concentration dans la phase HBSS la forme libre (n=1).

Ainsi la liaison du TZD au surfactant pulmonaire pourrait être à l'origine du ratio ELF/plasma de 225 observé après administration IV et qui pourrait être responsable du TA de 50 observé *in vivo*. En effet, ce phénomène serait d'autant plus important après administration par voie aérienne, en diminuant l'absorption du TZD. Ces expériences sont en cours dans notre laboratoire et seront poursuivies afin de confirmer ces premiers résultats, d'évaluer également la liaison du linézolide et d'identifier les composants du surfactant responsables de cette liaison.

Comme nous l'avons vu, il est difficile de déterminer des paramètres descripteurs simples qui permettraient de prédire la pharmacocinétique d'une molécule simplement à partir d'études *in vitro*. Ces modèles *in vitro* sont une simplification de ce qu'il se passe dans un organisme dont une multitude de paramètres entrent en jeu :

- Des différences de pH peuvent entraîner des modifications de charge et *in fine* une modification de la perméabilité.
- La présence de tensio-actifs *in vivo* peuvent être à l'origine de phénomènes de séquestration et modifier la diffusion des composés.
- Ces transporteurs d'efflux ont un impact différent entre les études *in vitro* et *in vivo* (ratio inférieur à 5 *in vitro* pour nos molécules testées alors que les ratios peuvent aller jusqu'à 80 *in vivo*, comme avec l'exemple de l'oseltamivir phosphate).

Conclusion

Pour traiter des infections pulmonaires, la présence des transporteurs pulmonaires d'efflux au niveau apical est un atout car ils permettent d'augmenter les concentrations locales en agent anti-infectieux. Cela est observable *in vitro* sur des modèles cellulaires où il est possible de déterminer un ratio d'efflux. Dans les études *in vivo*, ce ratio est aussi observé après administration intraveineuse du composé, où l'exposition pulmonaire est plus importante que l'exposition plasmatique. Pour être encore plus efficace, on s'est interrogé sur l'avantage d'administrer ces composés localement. Cela a été fait avec l'oseltamivir phosphate, le promédicament de l'oseltamivir carboxylate. Cependant, bien que l'oseltamivir phosphate soit substrat de la P-gp, son absorption est tout de même trop rapide par rapport à sa conversion locale pour qu'une nébulisation soit efficace car seulement 2% de la dose a été convertie localement. Le tédizolide avait déjà montré chez l'homme une distribution pulmonaire importante. Cela a été confirmé chez le rat avec notre protocole standardisé, mais les études *in vitro* n'ont montré aucune implication de transporteurs d'efflux.

En théorie, les transporteurs pulmonaires d'efflux permettent d'avoir de fortes concentrations en substrat. Dans le cas des promédicaments, il est important d'avoir une vitesse de conversion locale plus importante que l'absorption pour avoir une nébulisation efficace. De plus, l'observation d'une plus grande exposition pulmonaire que systémique n'est pas synonyme d'implication de transporteurs, car d'autres phénomènes peuvent entrer en jeu, comme un biais lors de l'expérimentation avec la lyse des macrophages ou bien une affinité pour les composés du surfactant pulmonaire.

Références

1. West JB. 2012. Respiratory physiology: the essentials. Lippincott Williams & Wilkins.
2. Rogers K. 2011. The Respiratory System. Britannica Educational Publishing.
3. Sporty JL, Horáková L, Ehrhardt C. 2008. In vitro cell culture models for the assessment of pulmonary drug disposition. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 4:333–345.
4. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. 1999. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *European Respiratory Journal* 13:1177–1188.
5. Fernandes CA, Vanbever R. 2009. Preclinical models for pulmonary drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* 6:1231–1245.
6. Patton JS. 1996. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 19:3–36.
7. Groneberg D, Witt C, Wagner U, Chung K, Fischer A. 2003. Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respiratory medicine* 97:382–387.
8. Wall DA. 1995. Pulmonary absorption of peptides and proteins. *Drug Delivery* 2:1–20.
9. Mercer RR, Russell ML, Roggli VL, Crapo JD. 1994. Cell number and distribution in human and rat airways. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 10:613–624.
10. Stone KC, Mercer RR, Gehr P, Stockstill B, Crapo JD. 1992. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6:235–243.

11. Rennard S, Basset G, Lecossier D, O'donnell K, Pinkston P, Martin P, Crystal R. 1986. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *Journal of Applied Physiology* 60:532–538.
12. Noël-Georis I, Bernard A, Falmagne P, Wattiez R. 2002. Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins. *Journal of Chromatography B* 771:221–236.
13. Boucher R. 1994. Human airway ion transport. Part one. *American journal of respiratory and critical care medicine* 150:271–281.
14. Valeyre D, Soler P, Basset G, Loiseau P, Pre J, Turbie P, Battesti JP, Georges R. 1991. Patients'. *Am Rev Respir Dis* 143:1096–1101.
15. Thompson AB, Scholer SG, Daughton DM, Potter JF, Rennard SI. 1992. Altered epithelial lining fluid parameters in old normal individuals. *Journal of gerontology* 47:M171–M176.
16. Lamer C, De Beco V, Soler P, Calvat S, Fagon J, Dombret M, Farinotti R, Chastre J, Gibert C. 1993. Analysis of vancomycin entry into pulmonary lining fluid by bronchoalveolar lavage in critically ill patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 37:281–286.
17. Craig WA, Welling P. 1977. Protein binding of antimicrobials: clinical pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clinical pharmacokinetics* 2:252–268.
18. Craig WA, Evenson MA, Sarver KP, Wagnild JP. 1976. Correction of protein binding defect in uremic sera by charcoal treatment. *Translational Research* 87:637–647.

19. Goerke J. 1998. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1408:79–89.
20. Johansson J, Curstedt T. 1997. Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components. *European journal of biochemistry* 244:675–693.
21. Krishnamoorthy R, Mitra AK. 1998. Prodrugs for nasal drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* 29:135–146.
22. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. 1982. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *American Review of Respiratory Disease* 126:332–337.
23. Krombach F, Münzing S, Allmeling A-M, Gerlach JT, Behr J, Dörger M. 1997. Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison. *Environmental health perspectives* 105:1261.
24. Segel GB, Cokelet GR, Lichtman MA. 1981. The measurement of lymphocyte volume: importance of reference particle deformability and counting solution tonicity. *Blood* 57:894–899.
25. Ting-Beall HP, Needham D, Hochmuth RM. 1993. Volume and osmotic properties of human neutrophils. *Blood* 81:2774–2780.
26. Kiem S, Schentag JJ. 2008. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52:24–36.
27. Cander L, Forster RE. 1959. Determination of pulmonary parenchymal tissue volume and pulmonary capillary blood flow in man. *Journal of Applied Physiology* 14:541–551.

28. Cournand A, Riley R, Breed E, Baldwin E deF, Richards D, Lester M, Jones M. 1945. Measurement of cardiac output in man using the technique of catheterization of the right auricle or ventricle. *The Journal of clinical investigation* 24:106–116.
29. Chapman CB, Taylor HL, Borden C, Ebert RV, Keys A, Carlson WS. 1950. Simultaneous determinations of the resting arteriovenous oxygen difference by the acetylene and direct Fick methods. *The Journal of clinical investigation* 29:651–659.
30. Stead E, Warren J, Merrill A, Brannon E. 1945. The cardiac output in male subjects as measured by the technique of right atrial catheterization. Normal values with observations on the effect of anxiety and tilting. *The Journal of clinical investigation* 24:326–331.
31. Ebert RV, Borden CW, Wells HS, Wilson RH. 1949. Studies of the pulmonary circulation. I. The circulation time from the pulmonary artery to the femoral artery and the quantity of blood in the lungs in normal individuals. *The Journal of clinical investigation* 28:1134–1137.
32. Cunha B. 1991. Antibiotic pharmacokinetic considerations in pulmonary infections, p. 168–182. *In* .
33. Takano M, Kawami M, Aoki A, Yumoto R. 2015. Receptor-mediated endocytosis of macromolecules and strategy to enhance their transport in alveolar epithelial cells. *Expert opinion on drug delivery* 12:813–825.
34. Brunton LL; RH-D; BCK. 2018. *Goodman and Gilman’s manual of pharmacology and therapeutics*. McGraw-Hill New York.

35. Schinkel AH, Jonker JW. 2012. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery reviews* 64:138–153.
36. Schinkel A, Kemp S, Dolle M, Rudenko G, Wagenaar E. 1993. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 268:7474–7481.
37. Juliano RL, Ling V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 455:152–162.
38. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. 2016. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer letters* 370:153–164.
39. Higgins CF, Gottesman MM. 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in biochemical sciences* 17:18–21.
40. Smit J, Schinkel AH, Elferink RO, Groen A, Wagenaar E, Van Deemter L, Mol C, Ottenhoff R, Van der Lugt N, Van Roon M. 1993. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451–462.
41. Smith AJ, Timmermans-Hereijgers JL, Roelofsen B, Wirtz KW, van Blitterswijk WJ, Smit JJ, Schinkel AH, Borst P. 1994. The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS letters* 354:263–266.

42. van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G. 1996. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87:507–517.
43. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:7735–7738.
44. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:695–698.
45. Choo EF, Leake B, Wandel C, Imamura H, Wood AJ, Wilkinson GR, Kim RB. 2000. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metabolism and Disposition* 28:655–660.
46. Saito Z-JZ Toshio Ohtsubo, Ichiro Noda, Yoshiyuki Shibamori, Takehito Yamamoto, Hitoshi Saito, Takehisa. 2001. Homozygous disruption of the *mdr1a* P-glycoprotein gene affects blood-nerve barrier function in mice administered with neurotoxic drugs. *Acta oto-laryngologica* 121:735–742.
47. Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. 1998. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproductive toxicology* 12:457–463.

48. Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S, Mori S. 1988. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer research* 48:1926–1929.
49. Schinkel A, Smit J, van Tellingen mO, Beijnen J, Wagenaar E, Van Deemter L, Mol C, Van der Valk M, Robanus-Maandag E, Te Riele H. 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491–502.
50. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *The Journal of clinical investigation* 97:2517–2524.
51. Sikic BI, Fisher GA, Lum BL, Halsey J, Beketic-Oreskovic L, Chen G. 1997. Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 40:S13–S19.
52. Boesch D, Gavériaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loo F. 1991. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833. *Cancer Research* 51:4226–4233.
53. Fischer V, Rodríguez-Gascón A, Heitz F, Tynes R, Hauck C, Cohen D, Vickers AE. 1998. The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A: implications for drug-drug interactions and pharmacological activity of the main metabolite. *Drug Metabolism and Disposition* 26:802–811.

54. Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand-Perret T. 1993. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer research* 53:4595–4602.
55. de Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE. 1999. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer letters* 146:117–126.
56. Dantzig A, Law K, Cao J, Starling J. 2001. Reversal of multidrug resistance by the P-glycoprotein modulator, LY335979, from the bench to the clinic. *Current medicinal chemistry* 8:39–50.
57. Mistry P, Stewart AJ, Dangerfield W, Okiji S, Liddle C, Bootle D, Plumb JA, Templeton D, Charlton P. 2001. In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer research* 61:749–758.
58. Newman MJ, Rodarte JC, Benbatoul KD, Romano SJ, Zhang C, Krane S, Moran EJ, Uyeda RT, Dixon R, Guns ES. 2000. Discovery and characterization of OC144-093, a novel inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer research* 60:2964–2972.
59. Cole S, Bhardwaj G, Gerlach J, Mackie J, Grant C, Almquist K, Stewart A, Kurz E, Duncan Am, Deeley R. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650–1654.
60. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole S, Deeley RG, Keppler D. 1994. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *Journal of Biological Chemistry* 269:27807–27810.

61. Müller M, Meijer C, Zaman G, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, De Vries E, Jansen P. 1994. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:13033–13037.
62. Evers R, Zaman G, van Deemter L, Jansen H, Calafat J, Oomen L, Elferink RO, Borst P, Schinkel AH. 1996. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *The Journal of clinical investigation* 97:1211–1218.
63. Loe DW, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. 1996. ATP-dependent 17-Estradiol 17-(β -D-Glucuronide) Transport by Multidrug Resistance Protein (MRP) INHIBITION BY CHOLESTATIC STEROIDS. *Journal of Biological Chemistry* 271:9683–9689.
64. Johnson DR, Finch RA, Lin ZP, Zeiss CJ, Sartorelli AC. 2001. The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance *mdr1a/1b*-and *mrp1*-deficient mice. *Cancer research* 61:1469–1476.
65. Cui Y, König J, Buchholz U, Spring H, Leier I, Keppler D. 1999. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Molecular pharmacology* 55:929–937.
66. Matsson P, Pedersen JM, Norinder U, Bergström CA, Artursson P. 2009. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharmaceutical research* 26:1816–1831.

67. Shugarts S, Benet LZ. 2009. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical research* 26:2039–2054.
68. Chen YN, Mickley LA, Schwartz AM, Acton EM, Hwang J, Fojo AT. 1990. Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* 265:10073–10080.
69. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:15665–15670.
70. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van de Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer research* 61:3458–3464.
71. Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Froot BG, Schellens JH. 1999. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer research* 59:4559–4563.
72. Malingre M, Beijnen J, Rosing H, Koopman F, Jewell R, Paul E, Huinink WTB, Schellens J. 2001. Co-administration of GF120918 significantly increases the systemic exposure to oral paclitaxel in cancer patients. *British journal of cancer* 84:42.

73. Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, Greenberger LM. 1998. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer research* 58:5850–5858.
74. Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM. 2000. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer research* 60:47–50.
75. He H, Rabindran S, Greenberger L, Carter G. 1999. Fumitremorgin C analogs that reverse mitoxantrone resistance in human colon carcinoma cells. *Medicinal Chemistry Research* 9:424.
76. van Loevezijn A, Allen JD, Schinkel AH, Koomen G-J. 2001. Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 11:29–32.
77. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research* 12:413–420.
78. Benet LZ. 2013. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. *Journal of pharmaceutical sciences* 102:34–42.
79. Wu C-Y, Benet LZ. 2005. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharmaceutical research* 22:11–23.

80. Benet LZ, Broccatelli F, Oprea TI. 2011. BDDCS applied to over 900 drugs. *The AAPS journal* 13:519–547.
81. Doan KMM, Humphreys JE, Webster LO, Wring SA, Shampine LJ, Serabjit-Singh CJ, Adkison KK, Polli JW. 2002. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303:1029–1037.
82. Gontijo AVL, Brillault J, Grégoire N, Lamarche I, Gobin P, Couet W, Marchand S. 2014. Biopharmaceutical characterization of nebulized antimicrobial agents in rats: 1. Ciprofloxacin, moxifloxacin, and grepafloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58:3942–3949.
83. Marchand S, Grégoire N, Brillault J, Lamarche I, Gobin P, Couet W. 2015. Biopharmaceutical characterization of nebulized antimicrobial agents in rats: 3. Tobramycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59:6646–6647.
84. Brillault J, De Castro WV, Harnois T, Kitzis A, Olivier J-C, Couet W. 2009. P-glycoprotein-mediated transport of moxifloxacin in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:1457–1462.
85. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 59:221–226.
86. Mathias NR, Timoszyk J, Stetsko PI, Megill JR, Smith RL, Wall DA. 2002. Permeability characteristics of calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats. *Journal of drug targeting* 10:31–40.

87. Ong HX, Traini D, Young PM. 2013. Pharmaceutical applications of the Calu-3 lung epithelia cell line. *Expert opinion on drug delivery* 10:1287–1302.
88. Endter S, Francombe D, Ehrhardt C, Gumbleton M. 2009. RT-PCR analysis of ABC, SLC and SLCO drug transporters in human lung epithelial cell models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61:583–591.
89. Sakamoto A, Matsumaru T, Yamamura N, Suzuki S, Uchida Y, Tachikawa M, Terasaki T. 2015. Drug Transporter Protein Quantification of Immortalized Human Lung Cell Lines Derived from Tracheobronchial Epithelial Cells (Calu-3 and BEAS 2-B), Bronchiolar–Alveolar Cells (NCI-H 292 and NCI-H 441), and Alveolar Type II-like Cells (A 549) by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of pharmaceutical sciences* 104:3029–3038.
90. Haghi M, Young PM, Traini D, Jaiswal R, Gong J, Bebawy M. 2010. Time- and passage-dependent characteristics of a Calu-3 respiratory epithelial cell model. *Drug development and industrial pharmacy* 36:1207–1214.
91. Nurbaeti SN, Olivier J-C, Adier C, Marchand S, Couet W, Brillault J. 2018. Active Mediated Transport of Chloramphenicol and Thiamphenicol in a Calu-3 Lung Epithelial Cell Model. *Journal of pharmaceutical sciences* 107:1178–1184.
92. Gazdar AF, Linnoila RI, Kurita Y, Oie HK, Mulshine JL, Clark JC, Whitsett JA. 1990. Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer research* 50:5481–5487.

93. Salomon JJ, Muchitsch VE, Gausterer JC, Schwagerus E, Huwer H, Daum N, Lehr C-M, Ehrhardt C. 2014. The cell line NCI-H441 is a useful in vitro model for transport studies of human distal lung epithelial barrier. *Molecular pharmaceutics* 11:995–1006.
94. Cozens A, Yezzi M, Kunzelmann K, Ohrui T, Chin L, Eng K, Finkbeiner W, Widdicombe J, Gruenert D. 1994. CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 10:38–47.
95. Ehrhardt C, Kneuer C, Fiegel J, Hanes J, Schaefer U, Kim K-J, Lehr C-M. 2002. Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o–: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies. *Cell and tissue research* 308:391–400.
96. Takano M, Naka R, Sasaki Y, Nishimoto S, Yumoto R. 2016. Effect of cigarette smoke extract on P-glycoprotein function in primary cultured and newly developed alveolar epithelial cells. *Drug metabolism and pharmacokinetics* 31:417–424.
97. Ren H, Birch NP, Suresh V. 2016. An optimised human cell culture model for alveolar epithelial transport. *PloS one* 11:e0165225.
98. Pozzoli M, Ong HX, Morgan L, Sukkar M, Traini D, Young PM, Sonvico F. 2016. Application of RPMI 2650 nasal cell model to a 3D printed apparatus for the testing of drug deposition and permeation of nasal products. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 107:223–233.

99. Nickel S, Clerkin CG, Selo MA, Ehrhardt C. 2016. Transport mechanisms at the pulmonary mucosa: implications for drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* 13:667–690.
100. Schanker LS. 1978. Drug absorption from the lung. *Biochemical Pharmacology* 27:381–385.
101. Marchand S, Bouchene S, de Monte M, Guillemainault L, Montharu J, Cabrera M, Grégoire N, Gobin P, Diot P, Couet W. 2015. Pharmacokinetics of colistin methansulphonate (CMS) and colistin after CMS nebulisation in baboon monkeys. *Pharmaceutical research* 32:3403–3414.
102. Mouton JW, Theuretzbacher U, Craig WA, Tulkens PM, Derendorf H, Cars O. 2007. Tissue concentrations: do we ever learn? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61:235–237.
103. Eisenberg EJ, Conzentino P, Eickhoff WM, Cundy KC. 1993. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 29:93–98.
104. Elmquist WF, Sawchuk RJ. 1997. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical research* 14:267–288.
105. Marchand S, Dahyot C, Lamarche I, Mimos O, Couet W. 2005. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of noninfected rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49:2356–2361.

106. Dhanani J, Roberts JA, Chew M, Lipman J, Boots RJ, Paterson DL, Fraser JF. 2010. Antimicrobial chemotherapy and lung microdialysis: a review. *International journal of antimicrobial agents* 36:491–500.
107. Dahyot C, Marchand S, Pessini GL, Pariat C, Debaene B, Couet W, Mimoz O. 2006. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of *Acinetobacter baumannii*-infected rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50:2265–2267.
108. Marchand S, Frasca D, Dahyot-Fizelier C, Breheret C, Mimoz O, Couet W. 2008. Lung microdialysis study of levofloxacin in rats following intravenous infusion at steady state. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52:3074–3077.
109. de la Peña A, Dalla Costa T, Talton JD, Rehak E, Gross J, Thyroff-Friesinger U, Webb AI, Müller M, Derendorf H. 2001. Penetration of cefaclor into the interstitial space fluid of skeletal muscle and lung tissue in rats. *Pharmaceutical research* 18:1310–1314.
110. Tasso L, Bettoni CC, Oliveira LK, Dalla Costa T. 2008. Evaluation of gatifloxacin penetration into skeletal muscle and lung by microdialysis in rats. *International journal of pharmaceutics* 358:96–101.
111. Zeitlinger M, Müller M, Joukhadar C. 2005. Lung microdialysis—a powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). *The AAPS journal* 7:E600–E608.
112. Hutschala D, Kinstner C, Skhirtladze K, Mayer-Helm B-X, Zeitlinger M, Wisser W, Müller M, Tschernko E. 2008. The impact of perioperative atelectasis on antibiotic

- penetration into lung tissue: an in vivo microdialysis study. *Intensive care medicine* 34:1827.
113. Herkner H, Muller MR, Kreischitz N, Mayer BX, Frossard M, Joukhadar C, Klein N, Lackner E, Muller M. 2002. Closed-chest microdialysis to measure antibiotic penetration into human lung tissue. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165:273–276.
114. De la Peña A, Liu P, Derendorf H. 2000. Microdialysis in peripheral tissues. *Advanced drug delivery reviews* 45:189–216.
115. Matzi V, Lindenmann J, Porubsky C, Kugler SA, Maier A, Dittrich P, Smolle-Jüttner FM, Joukhadar C. 2010. Extracellular concentrations of fosfomycin in lung tissue of septic patients. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 65:995–998.
116. Guillon A, Pardessus J, Lhommet P, Parent C, Respaud R, Marchand D, Montharu J, De Monte M, Janiak P, Boixel C. 2019. Exploring the fate of inhaled monoclonal antibody in the lung parenchyma by microdialysis, p. 297–304. *In* . Taylor & Francis.
117. Reynolds HY. 1987. Bronchoalveolar Lavage 1, 2. *American Review of Respiratory Disease* 135:250–263.
118. Dargaville PA, South M, Vervaart P, McDOUGALL PN. 1999. Validity of markers of dilution in small volume lung lavage. *American journal of respiratory and critical care medicine* 160:778–784.
119. Valcke Y, Pauwels R, Van der Straeten M. 1990. Pharmacokinetics of antibiotics in the lungs. *European Respiratory Journal* 3:715–722.

120. Baldwin D, Honeybourne D, Wise R. 1992. Pulmonary disposition of antimicrobial agents: methodological considerations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36:1171.
121. Marcy TW, Merrill WW, Rankin JA, Reynolds HY. 1987. Limitations of using urea to quantify epithelial lining fluid recovered by bronchoalveolar lavage. *American Review of Respiratory Disease* 135:1276–1280.
122. Kiem S, Schentag JJ. 2014. Interpretation of epithelial lining fluid concentrations of antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection & chemotherapy* 46:219–225.
123. Sakagami M. 2006. In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery. *Advanced drug delivery reviews* 58:1030–1060.
124. Tronde A, Bosquillon C, Forbes B. 2008. The isolated perfused lung for drug absorption studies, p. 135–163. *In Drug Absorption Studies*. Springer.
125. Herget J, Chovanec M. 2010. Isolated perfused murine lung: a well characterized preparation for studying lung vascular function. *Drug Discovery Today: Disease Models* 7:131–135.
126. Yapa SW, Li J, Patel K, Wilson JW, Dooley MJ, George J, Clark D, Poole S, Williams E, Porter CJ. 2014. Pulmonary and systemic pharmacokinetics of inhaled and intravenous colistin methanesulfonate in cystic fibrosis patients: targeting advantage of inhalational administration. *Antimicrobial agents and chemotherapy* AAC. 01705-13.

127. Marchand S, Boisson M, Mehta S, Adier C, Mimos O, Gregoire N, Couet W. 2018. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats. 6. Aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.
128. Gontijo AVL, Grégoire N, Lamarche I, Gobin P, Couet W, Marchand S. 2014. Biopharmaceutical characterization of nebulized antimicrobial agents in rats: 2. Colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58:3950–3956.
129. Marchand S, Grégoire N, Brillault J, Lamarche I, Gobin P, Couet W. 2016. Biopharmaceutical characterization of nebulized antimicrobial agents in rats. 4. Aztreonam. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60:3196–3198.
130. Bedor DCG, Marchand S, Lamarche I, Laroche J, de Santana DP, Couet W. 2016. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 5. Oseltamivir Carboxylate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60:5085–5087.
131. He G, Massarella J, Ward P. 1999. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clinical pharmacokinetics* 37:471–484.
132. Jones RN, Moet GJ, Sader HS, Mendes RE, Castanheira M. 2009. TR-700 in vitro activity against and resistance mutation frequencies among Gram-positive pathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 63:716–720.
133. Roger C, Roberts JA, Muller L. 2018. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxazolidinones. *Clinical pharmacokinetics* 57:559–575.
134. Molina-Torres CA, Barba-Marines A, Valles-Guerra O, Ocampo-Candiani J, Cavazos-Rocha N, Pucci MJ, Castro-Garza J, Vera-Cabrera L. 2014. Intracellular activity of

- tedizolid phosphate and ACH-702 versus *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 13:13.
135. Housman ST, Pope JS, Russomanno J, Salerno E, Shore E, Kuti JL, Nicolau DP. 2012. Pulmonary disposition of tedizolid following administration of once-daily oral 200-milligram tedizolid phosphate in healthy adult volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56:2627–2634.
136. Hoffmann G, Funk C, Fowler S, Otteneder MB, Breidenbach A, Rayner CR, Chu T, Prinssen EP. 2009. Nonclinical pharmacokinetics of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in the central nervous system. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53:4753–4761.
137. Marchand S, Gobin P, Brillault J, Baptista S, Adier C, Olivier J-C, Mimosz O, Couet W. 2010. Aerosol therapy with colistin methanesulfonate: a biopharmaceutical issue illustrated in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:3702–3707.
138. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Smeaton TC, Coulthard K. 2004. Pharmacokinetics of colistin methanesulphonate and colistin in rats following an intravenous dose of colistin methanesulphonate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53:837–840.
139. Carrez R, Brillault J, Grégoire N, Lamarche I, Laroche J, Couet W, Marchand S. 2019. Pulmonary Pharmacokinetics of Oseltamivir Carboxylate in Rats after Nebulization or Intravenous Administration of Its Prodrug, Oseltamivir Phosphate. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63:e00074-19.

140. Brillault J, De Castro WV, Couet W. 2010. Relative contributions of active mediated transport and passive diffusion of fluoroquinolones with various lipophilicities in a Calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54:543–545.
141. Choudhury D, Tanner MG, McAughtrie S, Yu F, Mills B, Choudhary T, Seth S, Craven T, Stone J, Mati I. 2017. Endoscopic sensing of alveolar pH. *Biomedical optics express* 8:243–259.
142. Scarpelli EM. 2003. Physiology of the alveolar surface network. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 135:39–104.
143. Fischer H, Widdicombe JH. 2006. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *The Journal of membrane biology* 211:139–150.
144. Furuie H, Tanioka S, Shimizu K, Manita S, Nishimura M, Yoshida H. 2018. Intrapulmonary pharmacokinetics of lascufloxacin in healthy adult volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62:e02169-17.
145. Ohya K, Takano J, Manita S. 2019. In Vitro Mechanistic Study of the Distribution of Lascufloxacin into Epithelial Lining Fluid. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 63:e02208-18.
146. Brillault J, Tewes F, Couet W, Olivier J-C. 2017. In vitro biopharmaceutical evaluation of ciprofloxacin/metal cation complexes for pulmonary administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:92–98.
147. Tewes F, Gobbo OL, Ehrhardt C, Healy AM. 2016. Amorphous calcium carbonate based-microparticles for peptide pulmonary delivery. *ACS applied materials & interfaces* 8:1164–1175.

148. Tewes F, Brillault J, Lamy B, O'Connell P, Olivier J-C, Couet W, Healy AM. 2015. Ciprofloxacin-loaded inorganic–organic composite microparticles to treat bacterial lung infection. *Molecular pharmaceutics* 13:100–112.
149. Lamy B, Tewes F, Serrano DR, Lamarche I, Gobin P, Couet W, Healy AM, Marchand S. 2018. New aerosol formulation to control ciprofloxacin pulmonary concentration. *Journal of Controlled Release* 271:118–126.

Abstract

In the face of the shortage of new anti-infectives and the ever-increasing emergence of multi-resistant infectious agents, it is essential to make better use of the therapeutic arsenal at our disposal. This may involve the use of new routes of administration in order to act more effectively locally. To treat lung infections, inhalation or nebulisation appear to be a logical option. It has been shown previously that the rather hydrophilic molecules were good candidates for this route of administration because the pulmonary epithelium was not very permeable to them and the active principle was sequestered in the lung. On the other hand, for lipophilic compounds that diffuse rapidly through the epithelium, pulmonary administration is of little therapeutic interest. The situation becomes more complex in the case of prodrug nebulization and/or when efflux pumps are involved in the pulmonary distribution of anti-infectives. In order to better characterize the role of efflux pumps in the pulmonary distribution of anti-infectives *in vitro* and their impact *in vivo*, the pulmonary distribution of several anti-infectives was evaluated according to a standardized protocol in rats, allowing measurement and comparison of free plasma and pulmonary epithelial fluid (ELF) concentrations after systemic and intratracheal administration. The first study focuses on the pulmonary distribution of oseltamivir, an anti-viral active against influenza, which is administered as a prodrug (oseltamivir phosphate (OP)). It has been shown *in vitro* that OP (non-active) is a substrate for efflux pumps and that this active transport is characterized *in vivo* by higher local concentrations of OP in ELF than in plasma regardless of the route of administration (intravenous or nebulization). However, these high pulmonary prodrug concentrations have little effect on pulmonary concentrations of the active molecule (oseltamivir carboxylate (OC)), due to low local conversion to the active compound and pulmonary permeability of the OC. The second study presents the case of oxazolidinones

(linezolid and tedizolid) used to treat Gram-positive infections for which *in vivo* studies in humans had previously shown local concentrations (ELF) higher than plasma concentrations after oral administration. These data were found in rats according to our standardized protocol and supplemented with post-nebulization data, suggesting a major role for transporters in their pulmonary diffusion. However, membrane permeability and *in vitro* inhibition studies conducted in a cellular model (NCI-H441) were unable to demonstrate the role of these efflux transporters on high pulmonary concentrations. Other explanations have been considered such as protein binding in ELF or intracellular penetration of active compound. In conclusion, these *in vivo* and *in vitro* studies on 4 active compounds have allowed us to improve our knowledge of the parameters that govern the pulmonary diffusion of anti-infectives such as permeability and affinity for efflux transporters and to show the complexity of extrapolation *in vitro/in vivo*.

Key words : Pharmacokinetics modeling, Lung, Efflux transporters, Nebulisation, Oseltamivir, Oxazolidinones

Résumé

Face à la pénurie de nouveaux anti-infectieux et à l'émergence toujours plus importante d'agents infectieux multi-résistants, il est primordial de mieux utiliser l'arsenal thérapeutique à notre disposition. Cela peut passer par l'utilisation de nouvelles voies d'administration afin d'agir plus efficacement localement. Pour traiter des infections pulmonaires, l'inhalation ou la nébulisation apparaissent comme des voies logiquement intéressantes. Il a été montré précédemment que les molécules plutôt hydrophiles étaient des bonnes candidates à cette voie d'administration car l'épithélium pulmonaire leur était peu perméable et le principe actif était séquestré au niveau du poumon. A l'inverse, pour les composés lipophiles qui diffusent rapidement à travers l'épithélium, l'administration pulmonaire ne présente que peu d'intérêt thérapeutique. La situation se complexifie dans le cas de la nébulisation de promédicaments et/ou lorsque des pompes d'efflux interviennent dans la distribution pulmonaire des anti-infectieux. Afin de mieux caractériser le rôle des pompes d'efflux dans la distribution pulmonaire des anti-infectieux *in vitro* et leur impact *in vivo*, la distribution pulmonaire de plusieurs anti-infectieux a été évaluée selon un protocole standardisé chez le rat, permettant de mesurer et donc de comparer les concentrations libres plasmatiques et dans le liquide épithélial pulmonaire (ELF) après administrations systémique et intratrachéale. Le premier travail porte sur la distribution pulmonaire de l'oseltamivir, un anti-viral actif contre la grippe, qui est administré sous forme de promédicament (oseltamivir phosphate (OP)). Il a été montré *in vitro* que l'OP (non actif) est substrat de pompes d'efflux et que ce transport actif se caractérise *in vivo* par des concentrations locales plus élevées d'OP dans l'ELF que dans le plasma quelle que soit la voie d'administration (intraveineuse ou nébulisation). Cependant, ces fortes concentrations pulmonaires en promédicament n'ont que peu d'effet sur les concentrations pulmonaires en molécule active (oseltamivir carboxylate (OC)), du fait

d'une faible conversion locale en composé actif et de la perméabilité pulmonaire de l'OC. La deuxième étude présente le cas des oxazolidinones (linézolide et tédizolide) utilisées pour traiter les infections à Gram positif pour lesquels des études *in vivo* préalablement réalisées chez l'homme avaient montrées des concentrations locales (ELF) supérieures aux concentrations plasmatiques après administration orale. Ces données ont été retrouvées chez le rat selon notre protocole standardisé et complétées avec des données après nébulisation, suggérant un rôle majeur des transporteurs dans leur diffusion pulmonaire. Cependant, les études de perméabilité membranaire et d'inhibition *in vitro* réalisées sur un modèle cellulaire (NCI-H441) n'ont pas pu mettre en évidence le rôle de ces transporteurs d'efflux sur les concentrations pulmonaires élevées. D'autres explications ont été envisagées comme la liaison à des protéines dans l'ELF ou encore la pénétration intracellulaire des principes actifs. En conclusion, ces études *in vivo* et *in vitro* sur 4 composés nous ont permis d'améliorer nos connaissances sur les paramètres qui gouvernent la diffusion pulmonaire des anti-infectieux telles que la perméabilité et l'affinité pour des transporteurs d'efflux et de montrer la complexité d'extrapolation *in vitro/in vivo*.

Mots clés : modélisation pharmacocinétique, Poumon, Transporteur d'efflux, Nébulisation
Oseltamivir, Oxazolidinones