

Université de Montréal

Évaluation et caractérisation des enzymes de métabolisme de la superfamille des CYP450 dans l'intestin grêle humain

Par Valérie Clermont

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté

En vue de l'obtention du grade de maîtrise

En Sciences Pharmaceutiques

Option pharmacologie

Novembre, 2017

© Valérie Clermont, 2017

Résumé en français et mots-clés français

L'administration orale des médicaments est la voie la plus simple et sécuritaire pour le traitement des patients. Cependant, celle-ci est associée avec une importante variabilité interindividuelle pouvant être attribuée à la génétique, l'environnement, les pathologies, etc. L'effet de premier passage hépatique a longtemps été considéré en tant que la cause majeure de variabilité des concentrations plasmatiques des médicaments administrés oralement. Il est maintenant reconnu que les organes extra-hépatiques, en particulier l'intestin, peuvent avoir un effet significatif au niveau du métabolisme pré-systémique des médicaments. En effet, ces composés doivent passer dans les entérocytes avant d'accéder à la circulation sanguine, les exposant à des enzymes de métabolisme telles que les Cytochromes P450 (CYP450). Les CYP450 catalysent le métabolisme de phase 1 et sont impliqués dans le métabolisme de 75% des médicaments utilisés en clinique.

Notre hypothèse est que la distribution régionale des CYP450 dans l'intestin grêle peut partiellement expliquer la variabilité interindividuelle dans les concentrations plasmatiques et la réponse aux médicaments. Nos objectifs sont d'y caractériser l'expression relative d'ARN messenger et l'activité *in vitro* des CYP450 majeurs. Puisque le transport des médicaments peut affecter l'absorption des xénobiotiques dans l'intestin, notre objectif secondaire est d'évaluer l'expression d'ARNm des transporteurs de médicaments.

Nous avons observé une grande variabilité interindividuelle dans l'expression d'ARNm et l'activité des CYP450 dans l'intestin grêle, ainsi qu'une activité catalytique significative pour les CYP3A4, CYP2J2 et CYP2C9.

Nos résultats permettront l'élaboration de meilleurs modèles pharmacocinétiques et amélioreront la prédiction de la variabilité des concentrations plasmatiques pour les médicaments administrés oralement.

Mots-clés : cytochromes P450, intestin grêle humain, variabilité interindividuelle, métabolisme, pharmacocinétique, transporteurs membranaires de médicaments

Résumé en anglais et mots-clés anglais

Oral administration of drugs has proven to be the easiest and safest way to treat patients. However, it is associated with great interindividual variability that could be attributed to genetics, environment, pathologies, etc. Hepatic first-pass metabolism was long considered as a major cause for variability in drug plasma concentrations. It is now recognized that extrahepatic organs, especially the small intestine, can have a significant effect in pre-systemic metabolism for orally administered drugs. Indeed, those compounds must go through the enterocytes before reaching the blood circulation, exposing them to drug-metabolizing enzymes, such as Cytochromes P450s (CYP450s). CYP450s mediate phase I metabolism reactions and are involved in the metabolism of 75% of clinically used drugs.

Our hypothesis is that regional CYP450 distribution in the small intestine can partly explain the observed interindividual variability in drug plasma levels and drug response for orally administered drugs. Therefore, our objectives are to characterize relative mRNA expression levels and *in vitro* activities of major CYP450 isoenzymes in human small intestine. Since drug transport can affect xenobiotic absorption in the small intestine, our secondary objective is to assess mRNA expression levels for membrane drug transporters.

We showed high interindividual variability in CYP450 mRNA expression and activity along the small intestine, as well as significant activity for CYP3A4, CYP2J2 and CYP2C9.

Our results will lead to better pharmacokinetic models and will improve variability prediction in plasma concentrations for orally administered drugs.

Keywords: cytochromes P450, human small intestine, interindividual variability, metabolism, pharmacokinetics, membrane drug transporters

Table des matières

Résumé en français et mots-clés français.....	i
Résumé en anglais et mots-clés anglais	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1- Introduction	1
Introduction	2
1. L'intestin grêle	4
1.1 Fonctions de l'intestin grêle	5
1.2 Anatomie de l'intestin grêle	5
2. Les cytochromes P450.....	11
2.1 Historique	15
2.2 Propriétés générales	16
2.2.1 Structure générale.....	16
2.2.2 Réactions catalysées	17
2.3 Nomenclature	18
2.4 Mécanismes	21
2.4.1 Cycle catalytique	21
2.5 Les isoenzymes CYP450	22
2.5.1 CYP2B6.....	23
2.5.2 CYP2C8.....	25
2.5.3 CYP2C9.....	27
2.5.4 CYP2C19.....	28
2.5.5 CYP2D6.....	29
2.5.6 CYP2E1	31
2.5.7 CYP2J2.....	32
2.5.8 CYP3A4 et CYP3A5.....	33
2.5.9 CYP4A11	37
2.6 Autres cytochromes P450	37

2.6.1 Les CYP1	37
2.6.2 Les CYP2	38
2.6.3 Les CYP3	39
2.6.4 Les CYP4	39
3. Interactions médicamenteuses	39
3.1 Induction	39
3.2 Inhibition	40
3.2.1 Inhibition compétitive	40
3.2.2 Inhibition non compétitive	41
3.2.3 Inhibition suicide	41
4. Transporteurs	42
4.1 Transporteurs ABC	44
4.2 Transporteurs SLC	46
5. Conclusion	47
6. Hypothèse	47
7. Objectifs	48
CHAPITRE 2- Article	49
Introduction	53
Materials and methods	55
Results	65
Discussion	69
Conclusion	72
CHAPITRE 3- Expression d'ARN messenger des transporteurs	93
Introduction	94
Méthodes	95
Résultats	97
Discussion	98
Conclusion	99
CHAPITRE 4- Discussion et conclusion	104
1. Discussion générale	105
1.1 ARN messenger	105

1.2 Protéines	106
1.3 Activité des isoenzymes CYP450.....	107
1.4 Corrélations ARN messenger, activité et génotype des CYP450	111
1.5 Comparaisons avec le foie	112
1.5.1 ARN messenger	112
1.5.2 Protéines	112
1.5.3 Activité des isoenzymes CYP450	113
2. Conclusion générale	117
Sources documentaires	119
Annexes	i
Annexe 1- Figure supplémentaire.....	ii
Annexe 2- Liste de contributions.....	iii

Liste des tableaux

Chapitre 2- Article

<i>Table 1 : Demographic characteristics of donors.....</i>	<i>77</i>
<i>Table 2 : Relative levels of mRNA expression for 17 CYP450 isoenzymes in 10 intestinal subsections ($2^{-\Delta\Delta CT}$).....</i>	<i>78</i>
<i>Table 3 : CYP450 activities measured in 5 different subsections along the human small intestine.....</i>	<i>79</i>
<i>Table 4 : Estimated in vitro kinetic parameters for CYP450 probes determined in proximal jejunum and mid-jejunum.....</i>	<i>80</i>
<i>Table 5 : CYP450 allele frequencies among donors.....</i>	<i>81</i>
<i>Supplemental Table 1 : Details on in vitro incubation conditions for each CYP450 probe.....</i>	<i>88</i>
<i>Supplemental Table 2 : Selected reaction monitoring parameters for each targeted metabolite and its respective internal standard.....</i>	<i>89</i>
<i>Supplemental Table 3 : mRNA expression of 17 CYP450 isoenzymes in various small intestine subsections ($2^{-\Delta CT}$).....</i>	<i>90</i>

Chapitre 3- Expression d'ARN messager des transporteurs

Tableau I : Caractéristiques démographiques des donneurs.....	100
Tableau II : Expression d'ARNm de 15 transporteurs membranaires dans 10 sections intestinales ($2^{-\Delta CT}$) (n=12).....	101
Tableau III : Expression relative de 15 transporteurs membranaires dans 10 sections intestinales ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (n=12).....	102

Chapitre 4- Discussion et conclusion

Tableau I : Valeurs de Km hépatiques (HLM) retrouvées dans la littérature et valeurs de Km intestinales de notre étude.....	109
Tableau II : Activité des isoenzymes CYP450 hépatiques et intestinales.....	114
Tableau III : CL _{int} des substrats tolbutamide, S-méphénytoïne et midazolam dans les microsomes de foie (HLM) et d'intestin grêle (HIM)	115

Liste des figures

Chapitre 1- Introduction

Figure 1 : Facteurs expliquant la variabilité lors de l'administration orale des médicaments.....	3
Figure 2 : Illustration de la composition des différentes couches intestinales.....	8
Figure 3 : Illustration des villosités et des types cellulaires intestinaux.....	10
Figure 4 : A) Contribution de différentes classes d'enzymes de métabolisme, B) Contribution des CYP450 individuels au métabolisme des médicaments.....	13
Figure 5 : A) Isoenzymes CYP450 dans le foie humain, B) Isoenzymes CYP450 dans l'intestin grêle chez l'humain.....	14
Figure 6 : Structure générale des CYP450.....	17
Figure 7 : Arbre phylogénétique des CYP450.....	20
Figure 8 : Cycle catalytique général des CYP450.....	21
Figure 9 : Transporteurs membranaires de l'entérocyte.....	44

Chapitre 2- Article

Figure 1 : <i>Pattern of CYP450 mRNAs expression in duodenum, jejunum and ileum</i>	84
Figure 2 : <i>Enzyme activities for CYP450 probe substrates measured in 5 different subsections of human small intestine from 9 individuals</i>	85
Figure 3 : <i>Inhibition assays in human small intestine microsomes</i>	86
Figure 4 : <i>Proximal jejunum intestinal activities according to genotype</i>	87
Supplemental Figure 1: <i>Correlation between mRNA and activity levels for CYP450s measured along the small intestine</i>	91

Chapitre 3- Expression d'ARN messenger des transporteurs

Figure 1 : Patron d'expression d'ARNm des transporteurs dans l'intestin grêle.....	103
--	-----

Annexe 1- Figure supplémentaire

Figure 1 : <i>ARNm en fonction du génotype</i>	ii
--	----

Liste des sigles et abréviations

A : Adénine
ABC : *ATP-binding cassette*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AhR : *Aryl hydrocarbon receptor*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASBT : *Apical sodium dependent bile acid transporter*
BCA : *Bicinchoninic acid assay*
BCRP : *Breast Cancer Resistance Protein*
C : Cytosine
Ca²⁺ : Ion calcium
CAR : *Constitutive androstane receptor*
CES : Carboxylestérase
CL_{int} : Clairance intrinsèque
CNT : *Concentrative nucleoside transporter*
CT : *Cycle threshold*
CYP450 : Cytochrome P450
Del : Délétion
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
e.g. : *Exempli gratia*
ENT : *Equilibrative nucleoside transporters*
et al. : *Et alia*
FMO : Flavine monooxygénase
G : Guanine
G6P : Glucose-6-phosphate
G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GR : *Glucocorticoid receptor*

H⁺ : Ion hydrogène

HKG : *Housekeeping gene* ou gène de maintenance

K_i : Constante d'inhibition

K_m : Constante de Michaelis-Menten

i.e. : *Id est*

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide- Spectométrie de masse

MAO : Monoamine oxydase

MCT : *Monocarboxylate transporter*

MRP : *Multidrug Resistance-associated Protein*

Na⁺ : Ion sodium

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NAT : N-acétyltransférase

OAT : *Organic anion transporters*

OATP : *Organic anion transporting polypeptides*

OCT : *Organic cation transporters*

OCTN : *Organic cation/carnitine transporters*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PEPT : *Peptide transport proteins*

P-gp : Glycoprotéine P

PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle

PXR : *Pregnane X receptor*

RT-qPCR : *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*

SLC : *Solute carrier protein*

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

T : Thymine

UGT : UDP-glucuronyltransférase

V_{max} : Vitesse maximale de réaction

À ma famille et mes amis,

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier ma directrice, Dre Véronique Michaud, ainsi que Dr Jacques Turgeon pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de développer mon esprit critique et ma pensée scientifique. Merci d'avoir partagé vos connaissances et de m'avoir donné les outils nécessaires pour réussir ma carrière scientifique. Merci d'avoir toujours cru en moi.

Merci au Dr Grégoire Leclair, mon premier superviseur de stage, pour m'avoir appris les bases de la recherche fondamentale et m'avoir motivée à poursuivre aux cycles supérieurs.

Merci à mon comité d'évaluation pour votre temps et vos commentaires. Merci à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal et au Centre de Recherche du CHUM pour m'avoir donné l'équipement et le bagage scientifique nécessaire pour poursuivre mes études.

J'aimerais remercier Fleur Gaudette et François Bélanger pour leur aide, ainsi que leur patience tout au long de mon projet et de mon développement en tant que scientifique. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.

Merci à mes collègues et amis du laboratoire, Michel Chamoun, Alexia Grangeon, Sophie Gravel, Charles Homsy, Henry Leung, Jennifer Lu et Roxanne Pelletier, pour m'avoir accompagnée durant mon parcours. Je garderai en mémoire tous les beaux moments passés en votre compagnie. Merci aussi à mes amis du 8^{ème} étage pour avoir rendu ces années aussi divertissantes.

Je souhaite tout particulièrement remercier les membres de ma famille qui ont toujours eu confiance en moi et qui m'ont supportée au long de mon cheminement. Je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui sans votre présence, vos encouragements et toutes les leçons que vous m'avez apprises au fil des années.

Chapitre 1- Introduction

Introduction

La voie orale est la plus utilisée lors de l'administration des médicaments, puisqu'elle est la plus simple et souvent plus sécuritaire pour le traitement des patients. Cependant, des différences au niveau de l'absorption ou du métabolisme pré-systémique des médicaments entraînent une variabilité interindividuelle importante pour cette voie d'administration comparativement à celle observée pour les voies parentérales.¹ L'effet de premier passage est caractérisé par le métabolisme d'un xénobiotique entre le site d'administration et le site de prélèvement d'un échantillon. Le métabolisme, tant au niveau intestinal qu'hépatique, dépend principalement de l'activité enzymatique, ainsi que du débit sanguin et de la liaison aux protéines plasmatiques.² Le métabolisme pré-systémique affecte la biodisponibilité orale des médicaments et varie considérablement d'un individu à l'autre. L'importance clinique de cette variabilité devient particulièrement critique lorsque la quantité de médicament se rendant à la circulation systémique est faible, ainsi que pour les composés avec une marge thérapeutique étroite comme l'anticoagulant warfarine et l'agent immunosuppresseur cyclosporine.^{1,2} L'activité enzymatique en tant que facteur de variabilité interindividuelle sera discutée davantage au cours de ce mémoire.

De nombreux facteurs influencent la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale. Parmi ceux-ci, on note les facteurs intrinsèques à la formulation du médicament (p. ex. dissolution de la formulation, mise en solution), ainsi que les facteurs physicochimiques, physiologiques (p. ex. pH, temps de transit intestinal) et environnementaux (p. ex. état nutritionnel, co-administration de médicaments).³ Les facteurs démographiques, tels que l'âge, le sexe, le poids, la génétique et les comorbidités peuvent également avoir un impact sur la quantité de médicament atteignant la circulation systémique.^{4,5} Un des déterminants majeurs influençant le métabolisme des médicaments est la génétique. En fait, certains polymorphismes génétiques sont associés à une

activité réduite (métaboliseurs lents) ou augmentée (métaboliseurs rapides) des enzymes de métabolisme des médicaments.⁵ Par ailleurs, la prise de certains aliments ou composés pharmaceutiques peut induire ou inhiber les enzymes de métabolisme. De plus, les aliments peuvent influencer directement la dissolution et l'absorption des xénobiotiques.^{3,6} Divers facteurs de variabilité au niveau de l'absorption des médicaments sont illustrés à la Figure 1.

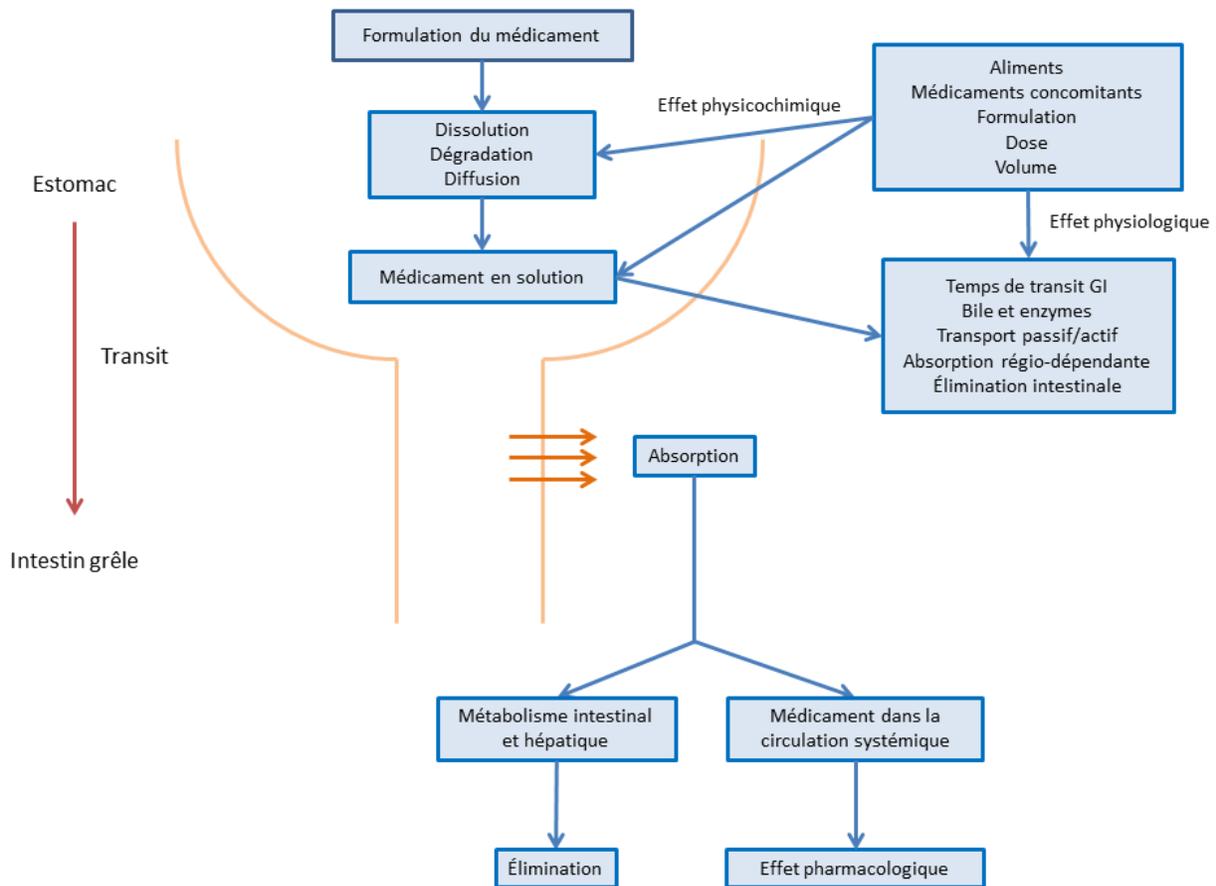


Figure 1 : Facteurs expliquant la variabilité lors de l'administration orale des médicaments
Figure adaptée de Fleisher et al. (1999) et de Aulton's Pharmaceutics (2008)^{1,3}

Un nombre croissant d'observations supportent l'hypothèse selon laquelle le métabolisme intestinal jouerait un rôle dans la variabilité interindividuelle associée à la biodisponibilité des médicaments. L'effet de premier passage entéro-hépatique peut réduire considérablement la

quantité de médicament atteignant la circulation systémique. En effet, une étude conduite par Varma *et al.* portant sur la comparaison des profils pharmacocinétiques oraux et intraveineux de 309 médicaments a démontré qu'environ 30% de ces composés subissaient plus de 20% d'extraction intestinale.⁷

Il est présentement difficile et complexe de modéliser l'extraction intestinale des médicaments, étant donné la variabilité interindividuelle et le manque de données sur la caractérisation régionale de l'activité de métabolisme dans l'intestin grêle. La circulation sanguine et la distribution de la substance ne sont pas uniformes dans tout l'intestin, ce qui contribue aussi à cette variabilité. Le temps de transit intestinal variable d'un individu à l'autre peut également affecter le métabolisme intestinal.⁸

1. L'intestin grêle

De plus en plus d'évidences supportent le rôle des enzymes de métabolisme, ainsi que des transporteurs d'influx et d'efflux retrouvés dans l'intestin grêle dans le processus d'absorption des médicaments administrés par voie orale. En effet, des études ont montré que l'intestin exprime des enzymes de métabolisme dont des enzymes de la superfamille du cytochrome P450 (CYP450), laquelle constitue le système enzymatique majeur impliqué dans le métabolisme des médicaments. Par conséquent, le métabolisme intestinal par les CYP450 peut contribuer significativement à l'effet de premier passage de plusieurs médicaments et ainsi affecter leur biodisponibilité. Toutefois, les données disponibles à ce sujet demeurent limitées et variables selon les sections intestinales étudiées.

1.1 Fonctions de l'intestin grêle

L'intestin grêle remplit plusieurs fonctions physiologiques comprenant des fonctions liées à la digestion, la sécrétion, l'absorption et la motilité.⁹ Les caractéristiques de l'intestin grêle dont les nombreux replis, la présence d'enzymes de métabolisme, ainsi que le système circulatoire influencent grandement la fonction d'absorption. La section médiale de l'intestin grêle est la plus impliquée dans la digestion et l'absorption des nutriments grâce à l'importante quantité d'eau et d'ions qui y sont sécrétés pour faciliter ces processus. Les nutriments sont transformés et absorbés au long de l'intestin; les protéines et les carbohydrates sont hydrolysés; les gras sont solubilisés, puis hydrolysés. Ces changements sont médiés par des enzymes retrouvées dans la lumière intestinale, telles que l'amylase, la phospholipase et la lipase, ainsi que des enzymes présentes à la surface de la muqueuse, telles que la lactase et la sucrase. En général, les monosaccharides, les acides aminés, les électrolytes, les minéraux et les vitamines hydrosolubles se rendent dans la circulation sanguine et passent par le foie avant de se rendre à la circulation systémique. Les lipides, ainsi que les vitamines hydrosolubles, les esters de cholestérol et certains xénobiotiques lipophiles (p. ex. cyclosporine, mépitiostane, halofantrine)¹⁰ peuvent se rendre dans la circulation lymphatique, laquelle se déverse dans la circulation sanguine systémique sans préalablement passer par le foie.¹¹

1.2 Anatomie de l'intestin grêle

L'intestin grêle est divisé en trois sections anatomiques: le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum se situe directement après l'estomac duquel il est séparé par le pylore, un sphincter dictant la vitesse de la vidange gastrique. Cette section mesure entre 20 et 30 cm et se termine vis-à-vis le ligament de Treitz qui supporte la portion distale du duodénum.^{1,11} Ce dernier est considéré

comme étant la portion de l'intestin la plus impliquée dans l'absorption des médicaments à cause de sa grande surface de contact. La section médiale de l'intestin grêle, le jéjunum, mesure en moyenne 2 mètres et constitue environ 40% de l'intestin grêle. Le duodénum et le jéjunum sont caractérisés par une paroi intestinale épaisse et des plis de la muqueuse proéminents. La section distale de l'intestin grêle, l'iléon, mesure environ 3 mètres et représente les derniers 60%. La paroi intestinale est plus mince à ce niveau et les plis de la muqueuse y sont moins importants que pour les sections proximales. Le diamètre de la lumière intestinale diminue graduellement de la section proximale à la section distale.^{1,11}

L'intestin grêle est composé de quatre couches, qui sont disposées comme suit de l'intérieur de l'organisme vers la lumière intestinale: la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse.¹²

La séreuse, dont la fonction principale est le support, représente la couche externe de l'intestin et est composée d'épithélium et de tissu conjonctif.^{1,11}

La musculuse est composée de deux couches de muscles lisses dont les orientations sont opposées : une couche externe longitudinale mince, ainsi qu'une couche interne circulaire épaisse. Ces muscles permettent la motilité de l'intestin grêle et sont contrôlés par le plexus myentérique (système nerveux entérique) situé entre les deux couches musculaires. Deux types de mouvement sont effectués dans l'intestin grêle : le péristaltisme, qui propulse le contenu vers les sections distales, et la segmentation, qui permet le mélange du contenu et ralentit le transit intestinal.^{1,11}

La sous-muqueuse est composée de tissu conjonctif et contient des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, ainsi que des cellules nerveuses. Au niveau du duodénum, on y retrouve

les glandes de Brunner, dont la fonction est de sécréter du mucus et du bicarbonate afin de neutraliser l'acide provenant de l'estomac.^{1,11}

La muqueuse est la couche impliquée dans le métabolisme intestinal. Elle est divisée en trois sous-couches : la musculaire muqueuse, la *lamina propria* (chorion) et la couche épithéliale. La musculaire muqueuse sépare la sous-muqueuse de la muqueuse et peut changer la conformation de cette dernière.¹ La *lamina propria* est caractérisée par la présence de vaisseaux sanguins, de fibres nerveuses et de conduits lymphatiques. Elle occupe également une fonction de support structurel.⁹ Une couche monocellulaire de cellules épithéliales recouvrant les cryptes et les villosités définit la couche épithéliale. Cette dernière est en contact avec la lumière intestinale et s'étend de l'estomac jusqu'à la fin du colon. Cette couche épithéliale est liée par des jonctions occlusives près de la surface luminale. On y retrouve également des cellules exocrines, dont la fonction est de sécréter du mucus, ainsi que des cellules endocrines, dont la fonction est de sécréter des hormones.^{9, 11, 13} Un schéma général des couches intestinales est présenté à la Figure 2.

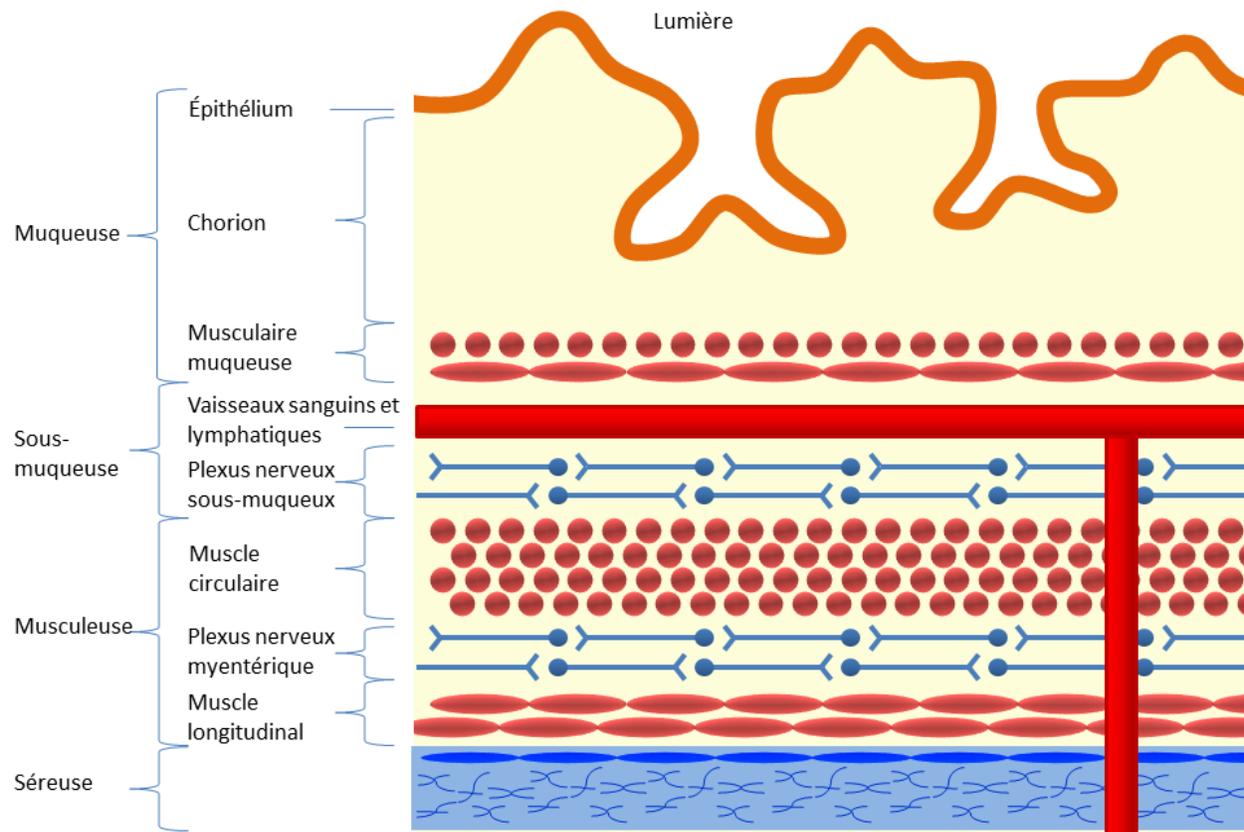


Figure 2 : Illustration de la composition des différentes couches intestinales
 Figure adaptée de *Physiologie humaine : Les mécanismes de fonctionnement de l'organisme* (2009)⁹

Les structures macroscopiques et microscopiques de l'intestin grêle, soit les plis de la sous-muqueuse, les villosités et les microvillosités permettent d'augmenter la surface d'absorption intestinale d'un facteur 600, comparativement à un cylindre lisse. L'intestin présente donc une surface d'absorption entre 200 et 300 m². Les valvules de Kerckring (également appelées plis de la sous-muqueuse) sont des structures macroscopiques circulaires ayant une taille de plusieurs millimètres, augmentant la surface de contact d'un facteur 3. Elles sont particulièrement visibles dans les sections proximales de l'intestin grêle, bien qu'on en retrouve jusqu'en section distale. Les villosités sont des projections en doigts de gant (1 mm de longueur en moyenne) augmentant

la surface d'absorption d'un facteur 10. Les villosités sont recouvertes de cellules épithéliales dont la surface membranaire comporte des microvillosités, souvent appelées bordures de brosse, qui augmentent la surface de contact d'un facteur 20. Ces projections sont d'environ 1 μm de longueur et sont couvertes par le glycocalyx (composé de protéines et de glycoprotéines). Chaque villosité possède son réseau capillaire, ainsi qu'un vaisseau lymphatique. Les entérocytes situés à la surface des villosités intestinales effectuent le transport des substrats (nutriments, composés endogènes, xénobiotiques) vers la *lamina propria*. Les cryptes, quant à elles, sont la source de quatre types cellulaires majeurs : les entérocytes absorbifs, les cellules caliciformes sécrétrices de mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth ayant un rôle dans l'immunité.^{7,9,11} La Figure 3 illustre les villosités et les différents types cellulaires présents à la surface intestinale.

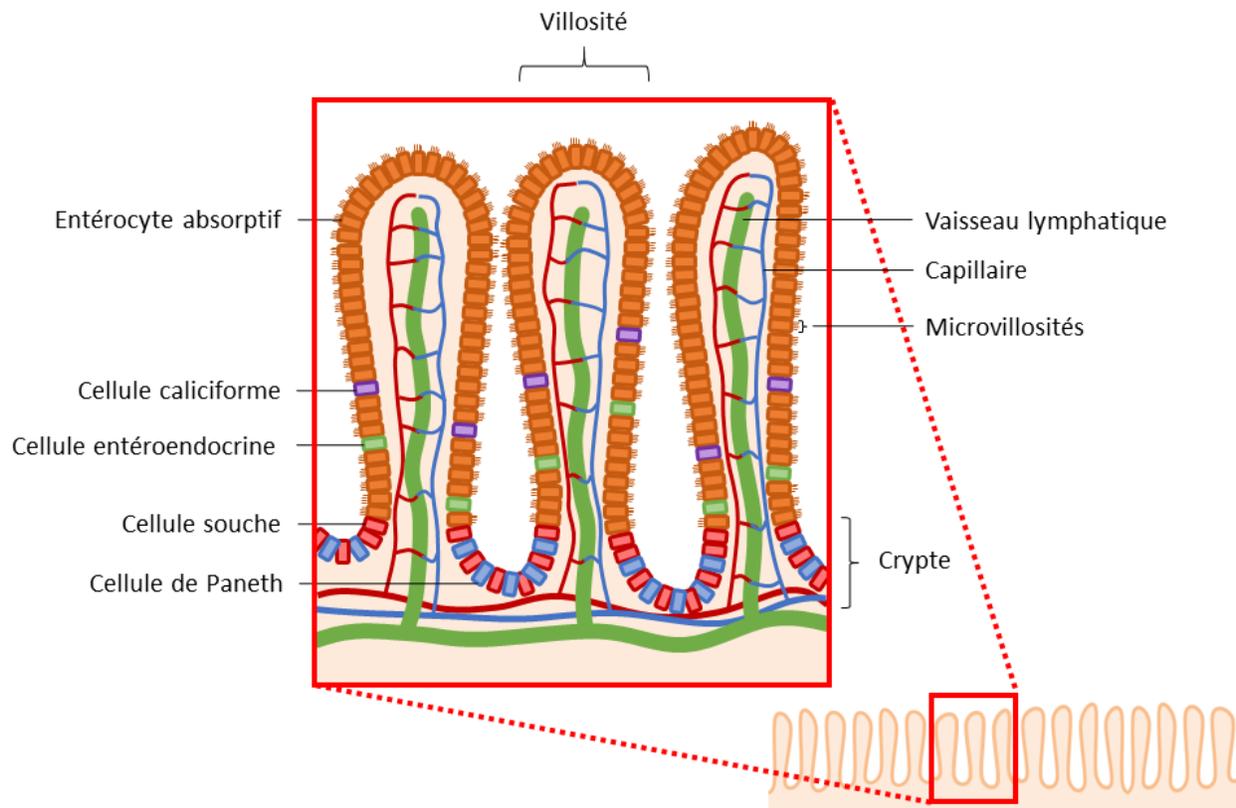


Figure 3 : Illustration des villosités et des types cellulaires intestinaux

Figure adaptée de *Physiologie humaine : Les mécanismes de fonctionnement de l'organisme* (2009) et Gerbe et al. (2012)^{9, 14}

Dans l'intestin grêle, les cellules se divisent à la base des villosités et se différencient en se déplaçant vers la pointe. Les cellules âgées sont alors remplacées et évacuées dans la lumière intestinale.¹¹ On observe un renouvellement quotidien important des cellules épithéliales, avec 17 milliards de cellules remplacées chaque jour et un remplacement de toutes les cellules épithéliales intestinales sur 5 jours.^{1,9} Le taux de renouvellement élevé diminue la possibilité d'induction des enzymes de métabolisme, puisque l'induction est un processus dépendant du temps. Cette caractéristique limite également la durée d'effet des inhibiteurs suicide et des substances pouvant endommager l'entérocyte. La courte durée de vie de l'entérocyte permet donc de maintenir une

activité métabolique relativement stable, malgré la présence d'inducteurs et d'inhibiteurs dans l'environnement digestif, sauf si l'exposition à ces composés est chronique.¹⁵

L'intestin grêle reçoit un approvisionnement en sang important supportant son rôle dans le processus d'absorption des xénobiotiques (environ un tiers du débit sanguin corporel).^{1,16} Le sang provenant des capillaires intestinaux se déverse dans les veines mésentériques, puis dans la veine porte hépatique, où les substances absorbées peuvent être métabolisées lors du premier passage hépatique.^{9,11} Le débit sanguin intestinal étant inférieur à celui observé au niveau hépatique, cela contribue à un temps de résidence supérieur du xénobiotique dans les entérocytes et augmente son exposition aux enzymes de métabolisme au niveau intestinal.¹⁶

En résumé, afin de se rendre à la circulation sanguine, le composé devra traverser la couche épithéliale de l'intestin grêle, où il sera exposé aux enzymes de métabolisme intestinales avant de se retrouver dans les capillaires mésentériques. Les capillaires se draineront ensuite dans la veine porte hépatique et le composé passera par le foie, où il sera sujet encore une fois à des enzymes de métabolisme avant d'accéder à la circulation systémique.¹

2. Les cytochromes P450

Les enzymes qui sont impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques peuvent être divisées en deux principaux groupes : enzymes oxydatives ou enzymes de conjugaison. Par exemple, les cytochromes P450 (CYP450) sont des enzymes oxydatives catalysant des réactions de phase 1, alors que les N-acétyltransférases (NAT) et les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) sont des enzymes de conjugaison médiant des réactions de phase 2. Le rôle de ces enzymes de métabolisme est de rendre les xénobiotiques plus hydrophiles afin de faciliter leur excrétion.¹⁶

Plusieurs enzymes de métabolisme sont retrouvées dans l'intestin grêle humain, telles que des cytochromes P450, des transférases (p. ex. UGT, sulfotransférases, etc.), des peptidases, des protéases, des lipases, des nucléases, des glycosidases et des enzymes de la microflore intestinale.⁸ Pour certains composés, tels que la terfénadine, le saquinavir, la cyclosporine, le midazolam et le vérapamil, le métabolisme intestinal pourrait avoir un effet significatif sur la biodisponibilité.¹⁷

Les CYP450 forment une superfamille d'enzymes de métabolisme de phase 1. Au total, 57 CYP450 ont été caractérisés et sont répartis en 18 familles et 41 sous-familles.^{6, 18} Les CYP450 participent au métabolisme de 75% des médicaments sur le marché, démontrant ainsi leur importance clinique.⁶ Les isoformes pertinentes seront investiguées plus en détail ci-dessous.

Les CYP450, estérases, flavine-monooxygénases (FMO) et monoamine oxydases (MAO) font partie des enzymes de phase 1 et catalysent les réactions d'oxydation, à l'exception des estérases (réaction d'hydrolyse).^{19, 20} Environ 50% de l'élimination totale des xénobiotiques, ainsi que 80% du métabolisme oxydatif sont attribués aux diverses isoenzymes de la superfamille CYP450.²¹ Les enzymes de métabolisme de phase 2, telles que UGT et NAT, médient des réactions de conjugaison suivant généralement le métabolisme de phase 1. Ces enzymes sont retrouvées à la fois au niveau hépatique et intestinal.¹³ Dans l'ensemble, la contribution des CYP450 au métabolisme des xénobiotiques est considérable comparativement à celle des autres enzymes de métabolisme, tel qu'illustré à la Figure 4A. La contribution relative de chaque isoenzyme CYP450 majeure au métabolisme hépatique est présentée à la Figure 4B.

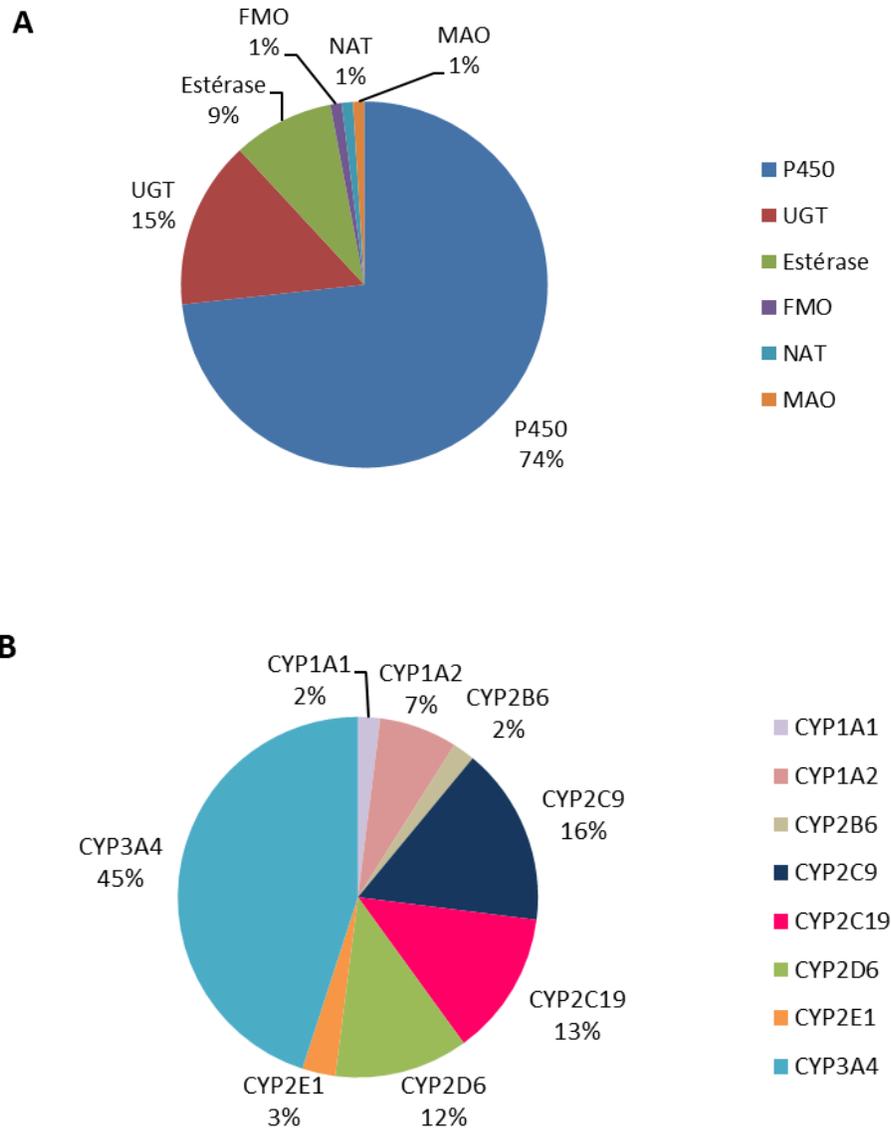


Figure 4 : A) Contribution de différentes classes d'enzymes de métabolisme hépatiques, B) Contribution des CYP450 individuels hépatiques au métabolisme des médicaments

*FMO : Flavine-monoxygénase, NAT : N-acétyltransférase, MAO : Monoamine oxydase, UGT: UDP-glucuronosyltransférase

Figure adaptée de Cytochrome P450 : Structure, Mechanism and Biochemistry, 4th edition (2015)⁶

Ces enzymes sont principalement localisées dans le foie, mais on les retrouve dans divers organes extra-hépatiques dont l'intestin grêle.²¹ La distribution des différentes isoenzymes CYP450 au niveau hépatique et intestinal est illustrée dans la Figure 5. Il est suggéré que les CYP450 sont distribués de façon régionale au long de l'intestin grêle, avec une concentration plus élevée en section proximale et dans la pointe des villosités.^{16, 22}

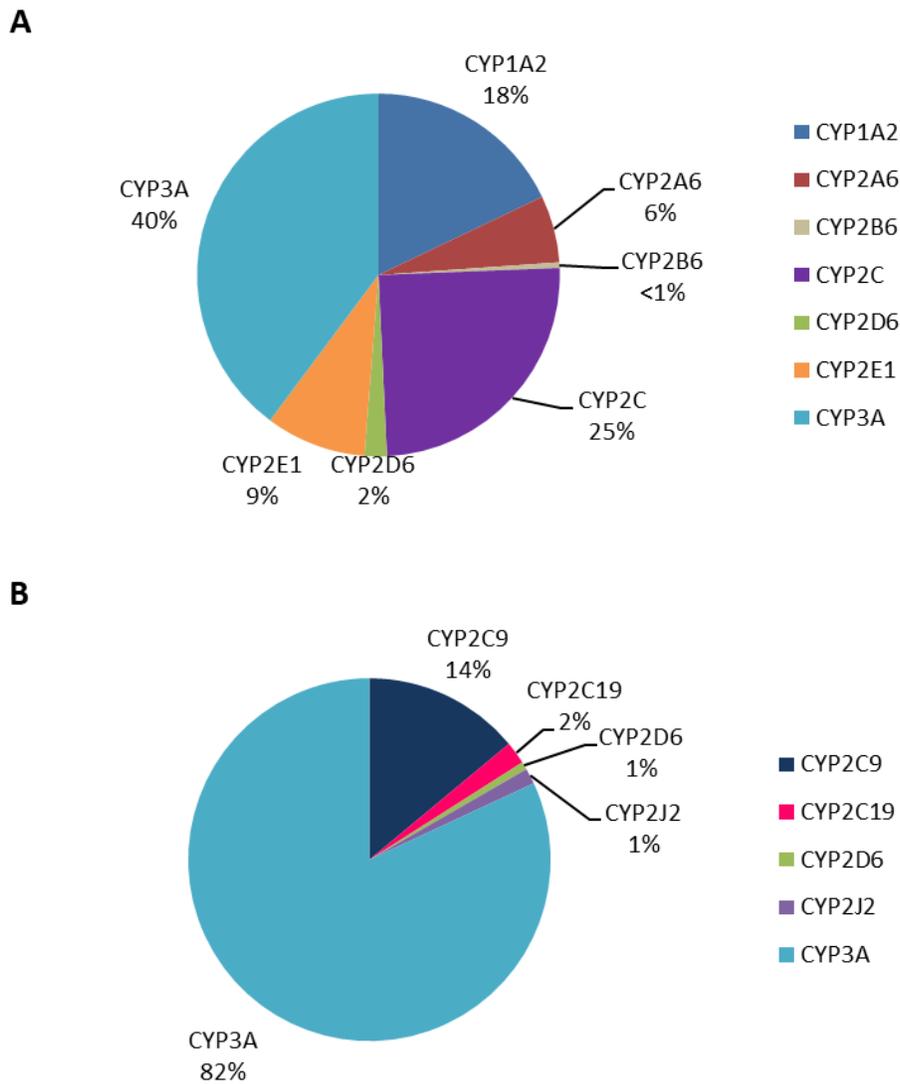


Figure 5 : A) Expression relative des isoenzymes CYP450 dans le foie humain, B) Expression relative des isoenzymes CYP450 dans l'intestin grêle chez l'humain
Figure adaptée de Paine et al. (2006)²¹

2.1 Historique

Les différences interindividuelles furent d'abord rapportées par Pythagore (580-495 av. JC), qui avait remarqué que certains individus étaient malades à la suite de l'ingestion de fèves de *fava*. Le mécanisme pathologique de l'anémie hémolytique causée par l'ingestion de ces fèves chez ces individus ne fut découvert que près de 2400 ans plus tard; il s'agissait d'une déficience du gène glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Au cours de l'histoire, le terme *pharmakon* fut utilisé pour décrire l'effet de substances qui peuvent être à la fois un remède et un poison, tout dépendamment de la dose. Une nuance est également reconnue de nos jours, selon laquelle une dose thérapeutique pour certains individus peut être une dose toxique pour d'autres. Cela s'explique, entre autres, par la variabilité interindividuelle dans le métabolisme des médicaments. Alexander Ure fut le premier scientifique à rapporter la capacité d'un organisme à convertir des composés exogènes en un ou plusieurs métabolites en 1841.⁵ Puis, ce fut au cours de la deuxième moitié du 19^e siècle que les voies métaboliques majeures ont été découvertes.²³ Mendel y a également publié ses études sur l'hérédité qui ont permis de fonder la base de la génétique.⁵ La première moitié du 20^e siècle a été une ère où les voies métaboliques ont été confirmées et leurs mécanismes sous-jacents ont été étudiés. Contrairement au 19^e siècle, durant lequel le sang était considéré comme la source de la transformation des xénobiotiques, le début du 20^e siècle a démontré l'influence d'organes spécifiques sur le métabolisme. Des études conduites sur des animaux, notamment celles suivant l'ablation du foie, ainsi que la perfusion de foie et de reins ont permis de mettre ce phénomène en évidence. Par la suite, c'est aux alentours de 1940 que plusieurs scientifiques optimisant des méthodes de séparation cellulaire ont mis au point les techniques d'isolation des microsomes. Le premier livre entièrement dédié au métabolisme fut publié en 1947 par R.T. Williams, qui proposa les notions de métabolisme de phase I et de phase

2. C'est seulement à la fin des années 50 et au début des années 60 que les CYP450 furent découverts et caractérisés comme étant les sources d'oxydation de plusieurs composés exogènes et hormones stéroïdiennes. Les années suivantes ont permis la compréhension de plusieurs mécanismes modifiant l'activité des enzymes de métabolisme, tels que l'inhibition, l'induction et les polymorphismes. À partir des années 1980, les CYP450 majeurs avaient été caractérisés et plusieurs avancements technologiques ont permis le clonage et l'expression d'isoformes spécifiques recombinantes permettant l'évaluation d'une seule isoenzyme. En plus des nombreuses études portant sur les enzymes de métabolisme et particulièrement les CYP450, plusieurs recherches ont également été conduites sur l'expression et l'activité des transporteurs en tant que facteurs influençant les concentrations plasmatiques des médicaments.²³

2.2 Propriétés générales

2.2.1 Structure générale

La superfamille des CYP450 comporte une grande variété génétique entre les différentes isoenzymes qu'elle regroupe. Toutefois, la structure générale des protéines obtenues reste similaire et ce, même si l'homologie de séquence entre certaines isoenzymes est inférieure à 20%. Les CYP450 comportent en moyenne entre 480 et 560 acides aminés et sont riches en hélices alpha à l'extrémité carboxy-terminale, ainsi qu'en feuillets bêta à l'extrémité amino-terminale. L'apoprotéine est constituée de ces structures et est reliée à un groupement hème permettant l'échange d'oxygène lors des réactions catalysées par les CYP450.²⁴ La majorité des CYP450 sont retrouvés au niveau du réticulum endoplasmique, à l'exception de certains qui sont exprimés au niveau mitochondrial.⁶ Un schéma de la structure générale des CYP450 est illustré à la Figure 6.

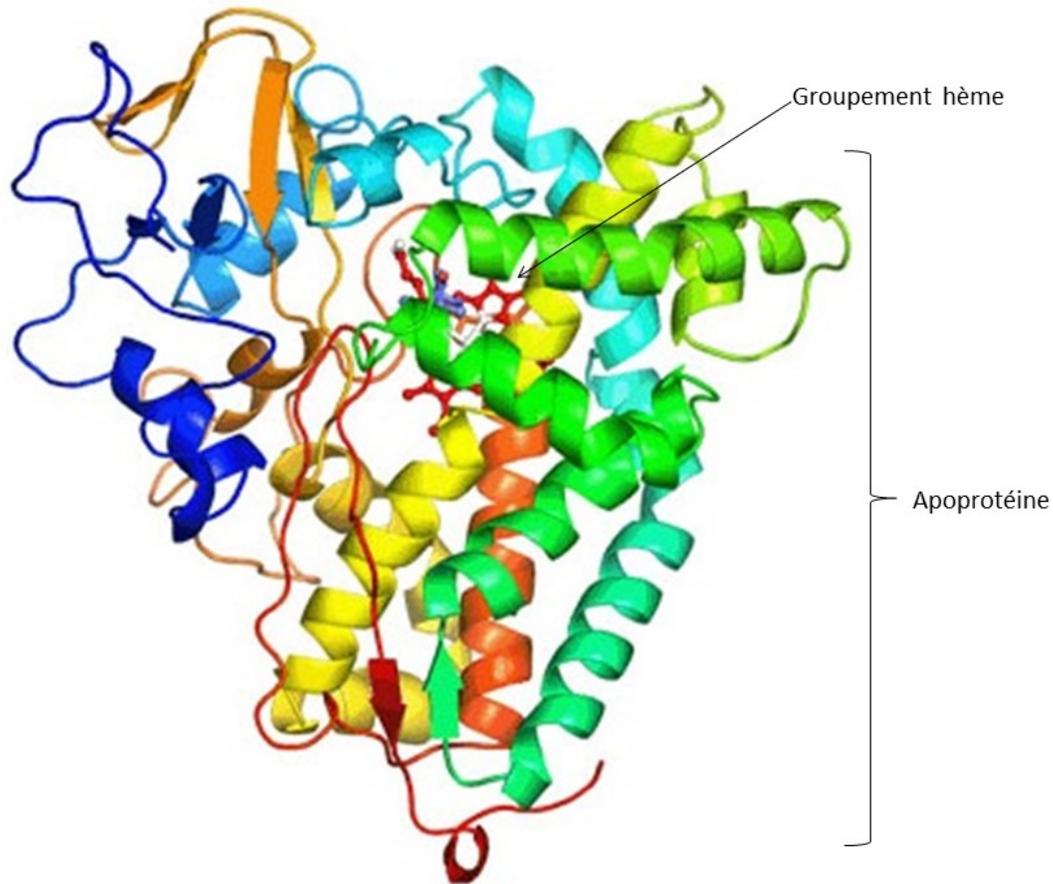


Figure 6 : Structure générale des CYP450
Figure adaptée de University of California-Irvine²⁵

2.2.2 Réactions catalysées

Bien que les CYP450 sont majoritairement connus pour leur activité catalytique des xénobiotiques, il est important de mentionner que ces derniers occupent également plusieurs fonctions endogènes majeures, telles que le métabolisme des acides gras et du cholestérol, ainsi que la synthèse de stéroïdes endogènes.²⁴ Les familles CYP1, CYP2 et CYP3 sont principalement reconnues pour leur participation dans le métabolisme des xénobiotiques et représentent environ 40% des gènes *CYP450* humains.¹⁸

Les CYP450 catalysent de nombreux types de réactions, dont la plus commune et la plus importante au niveau du métabolisme des produits pharmaceutiques est l'hydroxylation des atomes de carbone. Les réactions de N- et O-désalkylation se classent également dans la catégorie de l'hydroxylation, puisque c'est l'hydroxylation du groupe méthyle attaché à l'azote ou à l'oxygène qui mène au détachement du groupement alkyle. Les autres types de réactions médiées par les CYP450 peuvent être classées dans les catégories suivantes : formation d'époxyde, oxydation des cycles aromatiques, oxydation des hétéroatomes et réduction.²⁴

2.3 Nomenclature

Les CYP450 sont une superfamille de gènes comprenant plus de 2000 isoenzymes si l'on compte celles retrouvées chez les mammifères, les eucaryotes, les plantes et les champignons.^{24, 26} Un système de nomenclature débutant par les lettres CYP pour « cytochrome » et « pigment », suivies d'un chiffre pour la famille, d'une lettre pour la sous-famille et d'un chiffre pour l'isoenzyme, a été développé. Les gènes présentant plus de 40% d'homologie dans leur séquence sont considérées comme appartenant à la même famille et les séquences ayant plus de 55% de similarité appartiennent à la même sous-famille.^{24, 26} Les isoenzymes sont désignées selon leur ordre chronologique de découverte à l'intérieur de leur sous-famille. Le CYP1A1 a donc été le premier cytochrome à être nommé selon cette nomenclature.²⁴

Il est estimé que le premier gène de la famille des CYP450 serait apparu il y a environ 3,5 milliards d'années. Les autres gènes des CYP450 seraient donc tous dérivés de ce premier gène. Les plus anciens CYP450 dérivés du gène original datent d'environ 1,5 milliard d'années et étaient impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol afin de maintenir l'intégrité membranaire. Les CYP450 impliqués dans la synthèse des stéroïdes endogènes suivirent il y a

environ 900 millions d'années. Les familles d'isoenzymes impliquées aujourd'hui dans le métabolisme des médicaments ont surgi il y a 400 millions d'années.²⁴ Cette évolution est attribuée à l'émergence des espèces aquatiques au niveau terrestre. Ces espèces étant nouvellement exposées à des toxines précédemment absentes de leur diète, ainsi qu'à des produits de combustion dans l'atmosphère, les CYP450 ont évolué en conséquence. Une diversification aussi impressionnante n'aurait pas été possible sans l'interaction avec les végétaux. En effet, les CYP450 végétaux synthétisent des toxines comme moyen de défense et les CYP450 des herbivores évoluent en parallèle pour protéger l'organisme. Ce procédé mena donc à une diversification, non seulement au niveau des CYP450 des mammifères, mais également au niveau des végétaux.²⁴ Un arbre phylogénétique de l'évolution des CYP450 pertinents pour ce projet est présenté à la Figure 7. Seules les isoenzymes étudiées dans le cadre de mes travaux y ont été identifiées.

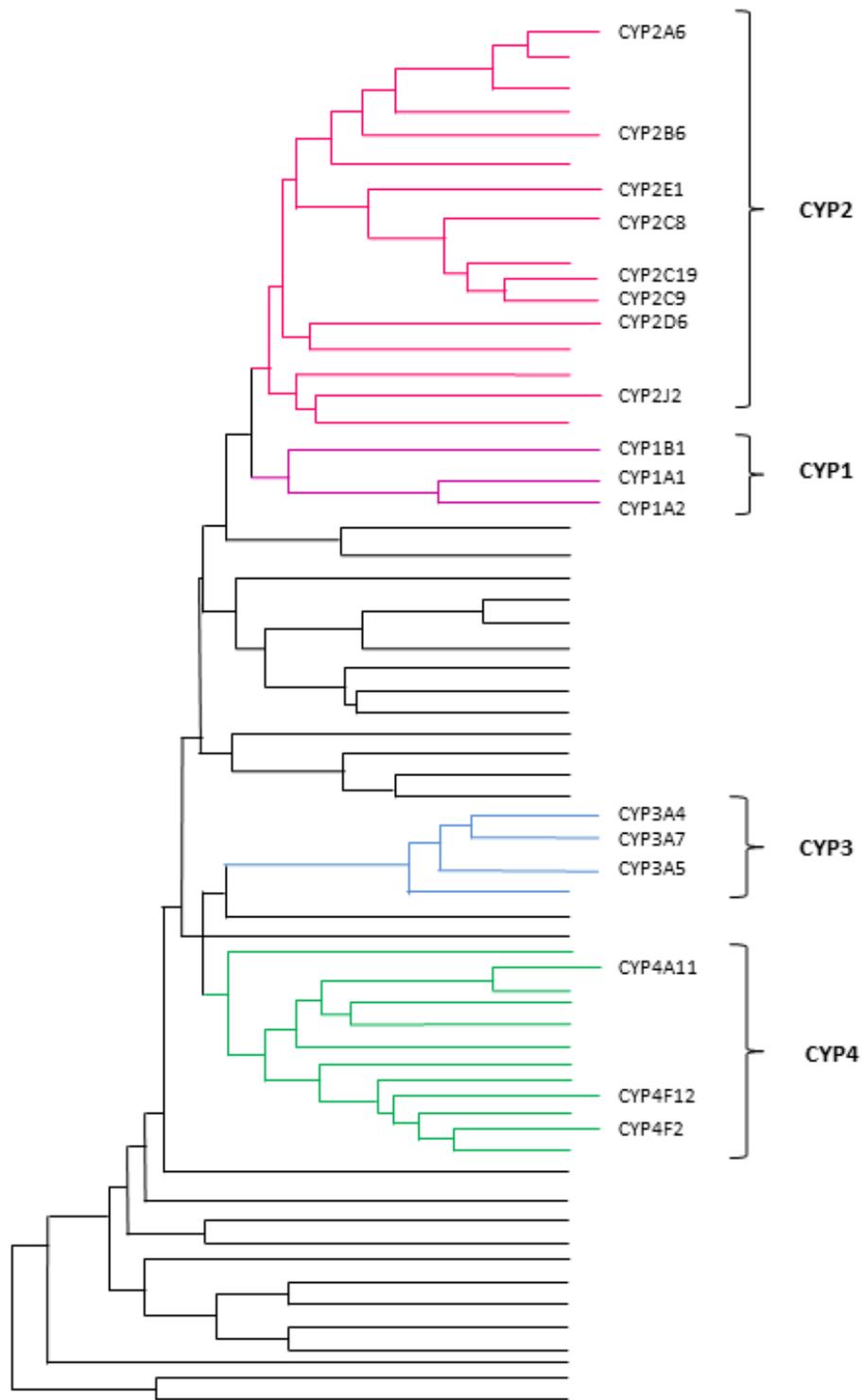


Figure 7 : Arbre phylogénétique des CYP450
 Figure adaptée de Kawashima et al. (2014)²⁶

2.4 Mécanismes

2.4.1 Cycle catalytique

Les CYP450 catalysent plusieurs types de réactions, tel que mentionné précédemment. Cependant, un cycle catalytique général peut être observé pour plusieurs réactions, tel qu'illustré à la Figure 8.

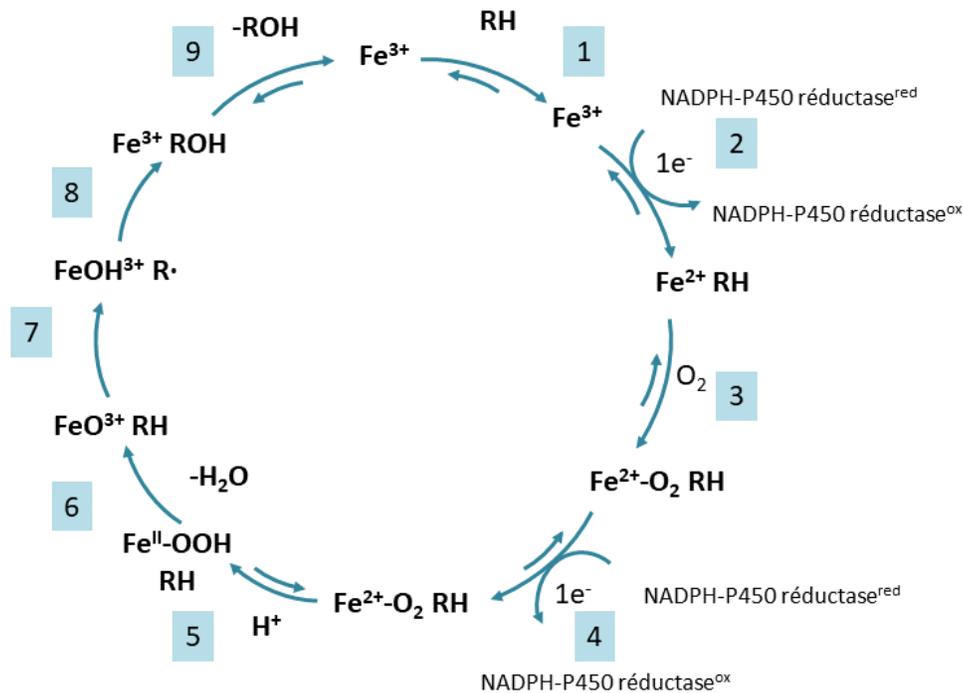


Figure 8 : Cycle catalytique général des CYP450
Figure adaptée de Guengerich et al. (2013)²⁷

Tout d'abord, 1) le substrat se lie à l'isoenzyme CYP450 ferrique, puis 2) un électron est transféré au groupement hème à partir de la NADPH-réductase réduite et le substrat est lié au résidu ferreux oxydé. 3) La molécule de O₂ se lie à l'enzyme ferreuse, puis 4) un deuxième électron est transféré à partir de la NADPH-P450 réductase ou le cytochrome b₅. 5) L'ajout d'un atome d'hydrogène et 6) le retrait d'une molécule d'eau mènent à l'enzyme oxydée liée au substrat. 7)

Le transfert de l'hydrogène du substrat à l'enzyme permet ensuite 8) la liaison d'un groupement hydroxy sur le substrat. 9) La liaison entre le métabolite nouvellement formé et l'enzyme est rompu, ce qui permet au cycle de se répéter.²⁷⁻²⁹

La NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase est une flavoprotéine pouvant intervenir dans des réactions d'oxydoréduction nécessitant le transfert d'un ou deux électrons. Les flavines de cette enzyme sont essentielles pour médier le transfert d'électron du NADPH donnant 2 électrons à l'hème du cytochrome P450 qui accepte un seul électron. La NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase intervient aux étapes 2) et 4) du cycle catalytique.⁶

Le cytochrome b₅ est une protéine de 134 acides aminés ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique ayant pour fonction le transfert d'électrons. Cette protéine fournit les électrons pour plusieurs réactions, notamment lors de la biosynthèse des lipides et la désaturation des acides gras à chaîne longue. Le cytochrome b₅ peut participer à l'étape 4) du cycle catalytique présenté ci-dessus, étant le transfert du deuxième électron à l'enzyme CYP450. Des études avec des enzymes purifiées ont été effectuées afin d'évaluer l'effet du cytochrome b₅ sur l'activité des CYP450. Il a été démontré que le cytochrome b₅ stimule l'activité des CYP2C19, CYP2E1 et CYP3A4, mais n'aurait aucun effet sur le CYP2D6.⁶

2.5 Les isoenzymes CYP450

La famille CYP2, impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes, englobe environ le tiers des séquences de CYP450 exprimées chez l'humain, ce qui en fait la plus large famille de gènes. La famille CYP3 regroupe seulement 4 gènes *CYP450*, dont le CYP3A4, l'isoenzyme CYP450 la plus impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques, conférant à cette famille une grande importance clinique. La famille CYP4 est surtout reconnue pour son activité

catalytique de l'acide arachidonique, ainsi que des acides gras. Cependant, il a été démontré que certaines isoenzymes de la famille CYP4 peuvent également métaboliser des xénobiotiques.²⁴ Les isoenzymes CYP450 présentant le plus d'intérêt dans le métabolisme des médicaments seront détaillées dans la prochaine section. Mes travaux de recherche se sont concentrés sur l'activité et l'expression relative de l'ARN messager (ARNm) des isoenzymes CYP450 les plus pertinentes au métabolisme des médicaments.

2.5.1 CYP2B6

Le CYP2B6 est une isoenzyme représentant environ 1 à 2% des CYP450 hépatiques et est également retrouvée au niveau pulmonaire chez l'humain.^{6, 24} Le CYP2B6 est impliqué dans le métabolisme d'environ 4% des médicaments utilisés en clinique.³⁰ On retrouve le gène pour cette isoenzyme au locus chromosomique 19q13.2.³¹ Le CYP2B6 est reconnu comme étant l'une des isoenzymes CYP450 les plus polymorphiques, avec 30 allèles définis et plus 100 polymorphismes répertoriés.³²

L'allèle *CYP2B6*4* (CYP2B6 785A>G) présente une fréquence élevée chez les asiatiques (15%) et les afro-américains (50%), et résulte en une augmentation de l'expression de la protéine du CYP2B6.³⁰ La mutation *CYP2B6*9* (CYP2B6 516G>T) résulte en une activité catalytique diminuée pour le bupropion et l'efavirenz.^{33, 34}

L'haplotype *CYP2B6*6* (CYP2B6 516G>T et 785A>G) est défini par deux variants non synonymes et est associé à une expression protéique et à une activité diminuées.^{30, 33} Plusieurs études utilisant les substrats efavirenz et bupropion ont conclu à une activité inférieure chez les patients porteurs de l'allèle *CYP2B6*6* (hétérozygotes et homozygotes).^{35, 36} Il a été démontré que c'était le *single nucleotide polymorphism* (SNP) CYP2B6 516G>T, correspondant au *CYP2B6*9*,

qui était responsable de la diminution de l'expression et de l'activité de la protéine chez les individus *CYP2B6**6.³⁷

L'importance clinique de cette isoenzyme est due à ses substrats, dont certains ont un index thérapeutique étroit. Cette isoforme est particulièrement importante dans le traitement du VIH (efavirenz et névirapine), la cessation tabagique ou le traitement de la dépression (bupropion) et la thérapie contre l'addiction à l'héroïne (méthadone).^{6, 30} Le CYP2B6 est également impliqué dans le métabolisme de l'artémisinine, le propofol et la kétamine.^{6, 38, 39}

On retrouve une variabilité interindividuelle jusqu'à 250 fois dans l'expression d'ARNm du CYP2B6 hépatique pouvant être attribuée aux facteurs génétiques, ainsi qu'aux facteurs induisant son expression. Plusieurs xénobiotiques peuvent induire l'expression du CYP2B6, tels que le phénobarbital, la rifampicine, la phénytoïne, l'efavirenz et la névirapine.³⁰ Les récepteurs nucléaires *pregnane X receptor* (PXR) et *constitutive androstane receptor* (CAR) sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène *CYP2B6*.³⁰

Le CYP2B6 peut être inhibé par des composés de diverses classes pharmaceutiques, tels que la ticlopidine, la phencyclidine, le peroxyinitrite, l'orphenadrine et le methimazole.^{6, 40}

Pour ce projet, l'activité du CYP2B6 a été évaluée en utilisant l'hydroxylation du bupropion en hydroxybupropion comme réaction spécifique au CYP2B6.^{38, 41} Ce composé utilisé en clinique en tant qu'antidépresseur et en aide à la cessation tabagique est couramment employé en tant que substrat phénotypique pour déterminer l'activité du CYP2B6 *in vitro* et *in vivo*.³⁹

2.5.2 CYP2C8

La sous-famille des CYP2Cs métabolise collectivement près de 20% des médicaments sur le marché et représente environ 20% de l'expression hépatique des CYP450.^{24, 42} Les isoenzymes de cette sous-famille partagent plus de 80% de similarité dans leur séquence. Cependant, leurs substrats diffèrent largement.²⁴ Il a été rapporté que le CYP2C8 pourrait représenter jusqu'à 7% des isoenzymes CYP450 retrouvées dans le foie, qu'il est aussi exprimé au niveau rénal et est impliqué dans le métabolisme de phase 1 d'environ 5% des médicaments sur le marché.^{6, 43}

Le CYP2C8 se retrouve au niveau du chromosome 10 (10q23.33) et son expression est très variable d'un individu à l'autre (environ 20 fois dans le foie).^{43, 44} Cela s'explique partiellement par la présence de polymorphismes génétiques pour cette isoenzyme, dont au moins 450 SNP ont été identifiés.⁴³ L'allèle *CYP2C8*2* (CYP2C8 805A>T) résulte en une diminution de l'activité métabolique et est présent chez 19% des afro-américains.⁴³ Le *CYP2C8*3* est une combinaison de deux mutations (CYP2C8 416G>A [R139K] et 1196A>G [K399R]) et est observé chez 11 à 14% des caucasiens.⁴³ L'influence de l'allèle *CYP2C8*3* varie selon les substrats. En effet, la clairance du repaglinide et de la rosiglitazone est augmentée, tandis qu'elle est diminuée pour le paclitaxel.^{43, 45} Le *CYP2C8*3* est également en déséquilibre de liaison (*linkage disequilibrium*) avec le *CYP2C9*2*, c'est-à-dire que ces deux allèles sont fréquemment retrouvés ensemble.⁴³ Le *CYP2C8*4* (792C>G) est retrouvé chez 7% des caucasiens et est associé avec une réduction de l'activité métabolique.⁴³

Les substrats métabolisés par le CYP2C8 sont très variés, ce qui s'explique en partie par la large cavité disponible de l'enzyme pour lier les substrats.⁴³ Plusieurs substrats importants utilisés dans le traitement du diabète (repaglinide, troglitazone, rosiglitazone), les traitements associés aux

maladies cardiovasculaires (cérivastatine, amiodarone), ainsi que les antimalariques amodiaquine et chloroquine sont métabolisés par cette isoenzyme.^{6,46} Le montelukast, un agent antiasthmatique, ainsi que le paclitaxel, un antinéoplasique, sont également métabolisés par le CYP2C8. Cette isoenzyme a également une importance au niveau endogène, puisqu'elle est impliquée dans le métabolisme de l'acide rétinoïque et l'acide arachidonique.^{24,46} Il est intéressant de noter que le CYP2C8 a un chevauchement plus important dans la spécificité de substrats avec le CYP3A4 qu'avec le CYP2C9 (avec lesquels il partage une homologie dans sa séquence de 25% et 70%, respectivement).⁴² Cela peut s'expliquer par la taille similaire des sites actifs des CYP2C8 et CYP3A4. Cependant, on observe différents profils métaboliques pour les mêmes substrats, probablement à cause de la forme différente du site actif et de l'affinité du substrat pour les deux enzymes.⁴²

L'induction du CYP2C8 *via* PXR, CAR et *glucocorticoid receptor* (GR) peut contribuer à la variabilité de son expression et de son activité. Cette isoenzyme est la plus inductible de la sous-famille des CYP2Cs et son expression peut être augmentée par la rifampicine, la dexaméthasone et le phénobarbital.⁴³

Une inhibition du CYP2C8 peut également se produire lors de l'administration, par exemple, de montelukast, de gemfibrozil, de triméthoprim, de zafirlukast et de sorafenib.^{46,47}

Dans le cadre de mes travaux de recherche, l'activité du CYP2C8 a été évaluée *via* l'incubation *in vitro* du repaglinide, un hypoglycémiant. La réaction monitorée est l'hydroxylation du repaglinide en hydroxyrepaglinide.⁴⁷

2.5.3 CYP2C9

Le CYP2C9 est considéré comme étant l'isoenzyme de la sous-famille CYP2C la plus importante en clinique.⁴² En effet, le CYP2C9 est l'isoenzyme la plus exprimée dans le foie après le CYP3A4 et contribue au métabolisme oxydatif d'environ 15 à 20% des médicaments.⁴⁸ Le CYP2C9 a également été détecté dans l'intestin grêle, l'aorte et les artères coronariennes.⁶ Le CYP2C9 se situe dans le même « *cluster* » chromosomique que les autres membres de la sous-famille CYP2C, c'est-à-dire au niveau 10q23.33.⁴⁹

Les polymorphismes dans le gène *CYP2C9* ont des impacts particulièrement importants en clinique, étant donné l'index thérapeutique étroit de plusieurs de ses substrats, tels que la phénytoïne, le tolbutamide et la S-warfarine.^{42, 48} Le CYP2C9 métabolise également le losartan, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (p. ex. célécoxib et diclofenac), ainsi que plusieurs substrats endogènes, tels que l'acide arachidonique, l'acide linoléique et la vitamine A.⁶ La fréquence de l'allèle *CYP2C9*2* (*CYP2C9* 430C>T) est d'environ 11% chez les caucasiens, tandis que le *CYP2C9*3* (*CYP2C9* 1075A>C) présente une fréquence de 6%.^{48, 50} Les patients homozygotes pour le variant *CYP2C9*2* et les individus porteurs d'au moins un allèle *CYP2C9*3* sont associés à un phénotype de métaboliseur lent.^{48, 51} Il a été démontré que le V_{\max} est diminué d'environ 50% chez les patients possédant l'allèle *CYP2C9*2*, mais que l'affinité envers les substrats demeure constante. La clairance significativement réduite des substrats du CYP2C9 chez les patients présentant l'allèle *CYP2C9*3* a été démontrée par une augmentation du K_m (affinité moindre de l'enzyme pour les substrats) et une diminution du V_{\max} , résultant en une diminution de la clairance pouvant aller jusqu'à 86% chez les homozygotes *CYP2C9*3/*3*.^{48, 51}

Le CYP2C9 peut être induit par la rifampicine, la phénytoïne et le phénobarbital *via* les récepteurs nucléaires CAR, PXR et GR.^{6, 52}

L'activité du CYP2C9 peut être inhibée par plusieurs composés comme le sulfaphénazole, l'amiodarone, le fluconazole, la fluvoxamine et le voriconazole.^{6, 40, 41, 48}

Pour mon projet, l'activité de cette isoenzyme a été mesurée par l'hydroxylation et la carboxylation du tolbutamide, un médicament hypoglycémiant.^{52, 53}

2.5.4 CYP2C19

Le CYP2C19 est exprimé majoritairement dans le foie, où il représente moins de 5% des CYP450 hépatiques, ainsi que dans l'intestin grêle.^{6, 54} Cette isoenzyme est retrouvée au locus chromosomique 10q23.3 et, est très polymorphique, avec au moins 48 variants génétiques caractérisés jusqu'à maintenant.^{6, 55, 56}

L'allèle non fonctionnel *CYP2C19*2* (CYP2C19 681G>A) résulte en une protéine tronquée suite à un épissage aberrant. Ce variant est retrouvé chez 12% des caucasiens et jusqu'à 35% des asiatiques. Le *CYP2C19*3* (CYP2C19 636G>A), présent à une fréquence inférieure à 1% chez les caucasiens, encode également une protéine tronquée.⁵⁷ Les patients homozygotes pour les allèles *CYP2C19*2* ou *CYP2C19*3* sont considérés comme des métaboliseurs lents, tandis que les porteurs hétérozygotes métabolisent les substrats de cette isoenzyme à un degré intermédiaire.⁵⁷ À l'opposé, les individus porteurs du variant *CYP2C19*17* (CYP2C19 -806C>T) sont classifiés comme métaboliseurs ultrarapides. En effet, cette mutation augmente l'expression et l'activité de métabolisme du CYP2C19.⁵⁷

Le CYP2C19 est important dans le métabolisme des substrats S-méphénytoïne, oméprazole, clopidogrel, voriconazole et escitalopram.⁶

Cette isoenzyme est inductible *via* CAR, PXR et GR α par la rifampicine, le ritonavir, le nelfinavir, le millepertuis (St John's Wort), la dexaméthasone, l'artémisinine et le phénobarbital. L'activité du CYP2C19 est stimulée en présence du cytochrome b5.^{6, 54}

L'activité du CYP2C19 est inhibée par la fluoxétine, la fluvoxamine, l'efavirenz, la ticlopidine, le méthimazole et l'isoniazid.⁴⁰

La voie spécifique utilisée dans ce projet pour l'étude du CYP2C19 est l'hydroxylation de l'anticonvulsivant S-méphénytoïne en 4-OH-méphénytoïne.⁴¹

2.5.5 CYP2D6

Bien que le CYP2D6 représente en moyenne 2-5% des CYP450 hépatiques, il est impliqué dans environ 25% des réactions catalysées par les CYP450. Cette isoenzyme retrouvée au locus 22q13.1 est très polymorphique et 165 variants génétiques du CYP2D6 ont été identifiés jusqu'à présent. L'industrie pharmaceutique tente de limiter le développement de substrats du CYP2D6, en raison de l'importante variabilité dans la réponse thérapeutique observée avec ces médicaments. Toutefois, cette isoenzyme demeure impliquée dans le métabolisme de plus de 70 produits pharmaceutiques largement prescrits. Le CYP2D6 est non seulement exprimé au niveau hépatique, mais également au niveau pulmonaire et cérébral.^{6, 24, 58}

Tel que mentionné précédemment, cette isoenzyme présente une très grande variabilité interindividuelle, notamment à cause des polymorphismes génétiques dans le gène *CYP2D6*. Une multiduplication des allèles de fonction normale *CYP2D6*1* et *CYP2D6*2* (*CYP2D6* 2850C>T et

4180G>C) résultant en *CYP2D6*1xN* et *CYP2D6*2xN* est associée au phénotype ultrarapide du CYP2D6, c'est-à-dire que l'activité catalytique du CYP2D6 est augmentée.^{59, 60} Au contraire, plusieurs variants dans le gène *CYP2D6* résultent en une expression et/ou une activité de métabolisme diminuées, caractérisant les phénotypes lents et intermédiaires. Le *CYP2D6*3* (*CYP2D6* 1749A>G et 2549delA), exprimé à une fréquence de moins de 1%, et le *CYP2D6*4* (*CYP2D6* 1846G>A) avec une prévalence de 17% sont associés avec une activité métabolique diminuée. Le *CYP2D6*5* résulte en une délétion complète du gène *CYP2D6* et est retrouvée chez environ 4% des caucasiens.⁶¹ Le variant *CYP2D6*6* (*CYP2D6* 1707delT- prévalence à moins de 1%) est associé à une diminution d'expression protéique.⁵⁶ Retrouvée chez 51% des asiatiques, la mutation *CYP2D6*10* (*CYP2D6* 100C>T) résulte en une enzyme instable et une affinité réduite pour les substrats. Le variant *CYP2D6*41* (*CYP2D6* 2988G>A) comporte des mutations retrouvées aussi pour le *CYP2D6*2* et cause un déficit dans l'épissage de l'ARNm.^{58, 60}

Malgré la diminution du développement de substrats requérant cette isoenzyme pour leur élimination, le CYP2D6 a tout de même une grande importance clinique, puisqu'il est impliqué dans le métabolisme de 50% des médicaments antipsychotiques (p. ex. halopéridol, rispéridone, thioridazine, fluphenazine).^{40, 58} Par ailleurs, plusieurs substrats appartenant à d'autres classes pharmacologiques sont métabolisés par cette isoenzyme, tels que le tamoxifène, la codéine, la débrisoquine (retirée du marché), le carvedilol, le métoprolol, le labétalol, le propranolol, la propafénone, l'amitriptyline, la venlafaxine, la fluoxétine, l'oxycodone, la désipramine, la paroxétine, le dextrométhorphan, etc.^{6, 24, 40}

Le CYP2D6, contrairement à de nombreuses enzymes, n'est pas inductible par des composés exogènes.⁶ La variabilité de l'activité résulte donc majoritairement de facteurs génétiques, physiologiques (p. ex. femmes enceintes), ainsi que de l'inhibition par des composés

exogènes.⁶² Les composés quinidine, terbinafine, abiraterone et amiodarone ont été rapportés comme inhibiteurs.^{6, 40, 41}

L'hydroxylation du β -bloqueur bufuralol et de l'antitussif dextrométhorphan est fréquemment utilisée pour les tests *in vitro* afin de déterminer l'activité du CYP2D6.⁴¹ Le bufuralol fut sélectionné comme substrat marqueur pour cette étude.

2.5.6 CYP2E1

L'activité catalytique du CYP2E1 envers plusieurs substances toxiques environnementales lui confère une grande importance en toxicologie. Cette isoenzyme représente environ 7% du contenu CYP450 hépatique, mais son expression est variable et peut même varier d'un facteur 10 entre les individus. On la retrouve aussi au niveau pulmonaire et cérébral.²⁴

Cette isoforme, retrouvée au locus chromosomique 10q26.3, est également sujette à des polymorphismes génétiques.⁶³ Le polymorphisme *CYP2E1**5 (une combinaison des variants CYP2E1 -1293G>C et 1053C>T) affecte la régulation transcriptionnelle et résulte en une expression de la protéine et une activité catalytique augmentées.^{64, 65} Environ 29% des sujets d'étude inclus dans une méta-analyse étaient porteurs du polymorphisme génétique *CYP2E1**5 pour au moins un allèle.⁶⁴

Le CYP2E1 est impliqué dans le métabolisme de plus de 70 composés, dont la chlorzoxazone, l'éthanol, l'acétone, l'halothane, l'isoflurane, et l'acétaminophène.^{6, 24} Cette isoenzyme intervient également dans l'activation de certains procarcinogènes, tels que les nitrosamines, et mène à la formation du métabolite toxique de l'acétaminophène.^{6, 66}

Il a été démontré que la consommation d'alcool, ainsi que la cigarette augmentent l'activité du CYP2E1.⁶⁶ Cependant, l'identité des composés présents dans la fumée de cigarette permettant l'induction du CYP2E1 reste inconnue, puisque des études ont écarté l'influence de la nicotine et du monoxyde de carbone.^{66, 67} Le CYP2E1 peut également être induit par divers composés industriels, tels que l'imidazole, l'acétone et le trichloroéthylène.⁶⁸ Cependant, l'induction du CYP2E1 ne se fait pas principalement par régulation transcriptionnelle, tel qu'est le cas pour la plupart des autres isoenzymes. En fait, la régulation se fait davantage *via* la stabilisation de l'ARNm et de la protéine.²⁴ L'activité de cette isoenzyme est également augmentée par le cytochrome b5.⁶

Cette isoenzyme est inhibée par le diéthylthiocarbamate, qui constitue un inhibiteur suicide.⁶

La 6-hydroxylation du relaxant musculaire chlorzoxazone fut utilisée comme réaction spécifique au CYP2E1 pour mes travaux de recherche.⁶⁶

2.5.7 CYP2J2

Le CYP2J2 est davantage considéré comme un CYP450 extrahépatique, puisqu'il est reconnu pour être exprimé majoritairement dans le cœur, l'endothélium vasculaire, le muscle squelettique, l'intestin grêle et plusieurs autres organes extrahépatiques.⁶⁹ Cette isoenzyme semble importante, non seulement pour ses fonctions endogènes au niveau du métabolisme de l'acide arachidonique, mais également au niveau du métabolisme de quelques médicaments. En effet, le CYP2J2 est impliqué dans le métabolisme de la terfénadine, l'ébastine, l'astémizole, l'amiodarone, la thioridazine et le bufuralol.^{6, 70}

La variabilité de l'activité de cette isoenzyme retrouvée au locus 1p32.1 peut s'expliquer par ses polymorphismes génétiques, lesquels sont moins nombreux comparativement aux autres isoenzymes.⁷¹ Le variant *CYP2J2*6* (*CYP2J2* 27660A>T) est associé à une diminution du métabolisme.⁶⁹ Le *CYP2J2*7* (*CYP2J2* 1920G>T) est un variant fonctionnel se présentant à une fréquence de 2 à 17%, dont l'effet se traduit par une diminution de 50% de la transcription comparativement à l'allèle sauvage *CYP2J2*1*.^{69, 70}

Il a été rapporté que le *CYP2J2* ne semblait pas être une isoenzyme sensible au phénomène d'induction.⁶ Cependant, une induction de l'expression d'ARNm de 2 fois a été observée dans les cardiomyocytes suivant l'exposition à la rosiglitazone.⁷²

L'activité du *CYP2J2* peut être inhibée par plusieurs composés, dont la rosiglitazone, le danazol, le cyclophosphamide, l'amiodarone, l'astémizole, la terféndine et le ritonavir.^{6, 72, 73}

L'ébastine est un antihistaminique métabolisé en hydroxyébastine et carboxyébastine par le *CYP2J2*.⁷⁴ Ce composé fut utilisé à titre de substrat marqueur du *CYP2J2* pour mon étude.

2.5.8 CYP3A4 et CYP3A5

Le *CYP3A4* est le plus étudié parmi toutes les isoenzymes du CYP450. Puisque cette isoforme joue un rôle majeur dans le métabolisme de 30 à 40% des médicaments utilisés en clinique, plusieurs études visent à identifier les sources de la variabilité observée dans son activité.⁷⁵ Cette isoforme est la plus exprimée, non seulement dans le foie, mais également dans l'intestin grêle, où elle contribuerait de façon importante à l'effet de premier passage entéro-hépatique. Il a été rapporté que cette isoenzyme représente environ 70-80% des CYP450 totaux dans l'intestin grêle humain et environ 25-40% dans le foie.^{6, 16, 21}

Une grande variabilité interindividuelle est observée pour cette isoenzyme (jusqu'à 100 fois au niveau hépatique). Cette variabilité semble peu ou partiellement s'expliquer par les polymorphismes dans le gène *CYP3A4*. Au moins 43 allèles du *CYP3A4* ont été identifiés jusqu'à maintenant. Toutefois, leur impact sur la pharmacocinétique de ses substrats sont souvent minimes, contradictoires ou inconsistants.^{6, 75, 76} Plus récemment, des évidences supportent l'impact *in vivo* du polymorphisme génétique *CYP3A4*22* (*CYP3A4* 6C>T), présent dans la population caucasienne à une fréquence d'environ 6%.⁷⁷ Le *CYP3A4*1/*22* a été associé avec une diminution de l'expression de la protéine jusqu'à 28%, ainsi qu'à une diminution de l'activité comparativement au génotype sauvage *CYP3A4*1/*1*.⁷⁷

Les substrats métabolisés par le *CYP3A4* sont nombreux, ce qui contribue à la possibilité de nombreuses interactions médicamenteuses liées à cette isoenzyme.²⁴ Le *CYP3A4* métabolise, entre autres, le midazolam, la nifédipine, la quinidine, le 17 α -éthinyloestradiol, l'aflatoxine B1, la simvastatine, la cyclosporine, le sildenafil et le dextrométhorphan.^{6, 16} Il a été rapporté que le métabolisme intestinal par le *CYP3A4* était plus important que le métabolisme par le *CYP3A4* hépatique pour des substrats comme la cyclosporine, le midazolam, le flurazepam, l'érythromycine, le tacrolimus et le saquinavir.^{8, 16} Il est proposé que le débit sanguin plus lent dans les entérocytes résulterait en un temps de résidence supérieur des substrats. Cela permettrait aux *CYP450*, notamment le *CYP3A4*, d'être davantage en contact avec le substrat, augmentant ainsi l'efficacité de l'enzyme au niveau intestinal comparativement au foie.¹⁶

L'importance du *CYP3A4* intestinal peut être démontrée notamment avec le métabolisme de la cyclosporine (un immunosuppresseur avec un index thérapeutique étroit). En effet, ce médicament est métabolisé entre 25 et 51% au niveau de l'intestin grêle, tandis que le foie serait responsable d'environ le tiers de son métabolisme.⁸ Un autre exemple est celui du midazolam,

dont le métabolisme présystémique intestinal est également significatif, avec un taux d'extraction intestinal similaire au taux d'extraction hépatique ($44 \pm 14\%$ et $43 \pm 24\%$, respectivement) et une biodisponibilité orale moyenne d'environ 30%.^{8, 16, 78}

Cette isoenzyme, localisée sur le chromosome 7q22.1, peut être induite *via* les récepteurs nucléaires PXR, CAR et PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) lors de l'administration de millepertuis, rifampicine, barbituriques et dexaméthasone.^{6, 16} Son activité catalytique est également potentialisée par le cytochrome b5.⁶

Il est à noter que le CYP3A4 peut être inhibé par des composés présents dans le jus de pamplemousse, les furanocoumarins, qui inhibent l'enzyme par un mécanisme d'inhibition suicide entraînant ainsi la formation d'un complexe irréversible.¹¹ Par conséquent, cela peut causer d'importantes interactions médicaments-nourriture en augmentant la biodisponibilité des composés métabolisés par le CYP3A4 intestinal. En effet, il a été démontré par Lown *et al.* (1997) que le jus de pamplemousse diminue non seulement l'activité du CYP3A4 intestinal, mais en réduit également l'expression.⁷⁹ Des interactions cliniquement significatives ont été rapportées pour la terfénaire (antihistaminique), la cyclosporine (immunosuppresseur), le saquinavir (inhibiteur de protéase) et le vérapamil (bloqueur de canaux calciques) suivant leur co-administration avec du jus de pamplemousse.^{1, 80} Une augmentation des concentrations plasmatiques jusqu'à 12 fois a pu être observée pour certains composés.²⁴ L'activité du CYP3A4 est également inhibée par le kétoconazole, ainsi que l'érythromycine, le ritonavir et la troleandomycine.⁶

Le CYP3A5 représente environ 2% de la sous-famille des CYP3A. Le CYP3A5 a 85% d'homologie de séquence avec le CYP3A4. Les substrats et les réactions catalysées par cette isoenzyme sont très similaires à celles médiées par le CYP3A4. Tout comme le CYP3A4, on

retrouve le CYP3A5 au locus chromosomique 7q22.1.^{6, 75} On retrouve principalement cette isoenzyme au niveau extra-hépatique, notamment dans les poumons, le colon, les reins, l'œsophage et la glande pituitaire antérieure.²⁴

La variabilité de l'activité du CYP3A5 associée à la présence de polymorphismes génétiques est importante, puisque seulement 25% des caucasiens démontrent une activité catalytique pour cette isoforme.⁶ Au moins 26 allèles du CYP3A5 ont été identifiés jusqu'à maintenant, dont deux principaux allèles associés avec une perte d'expression (*CYP3A5*3* et *CYP3A5*6*). Le SNP *CYP3A5*3* (CYP3A5 6986A>G) est caractérisé par une défectuosité dans l'épissage de l'ARNm menant à une protéine non fonctionnelle. Ce variant est retrouvé chez 82 à 95% des caucasiens. Le *CYP3A5*6* (CYP3A5 14690G>A) est un allèle non fonctionnel menant à une protéine tronquée et ainsi, à une absence d'expression du CYP3A5. On retrouve ce SNP à une fréquence de 7 à 17% chez les afro-américains.⁸¹

Il existe un chevauchement important dans la spécificité des substrats entre les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5. Généralement, le CYP3A5 métabolise plusieurs substrats du CYP3A4 avec un impact égal ou moindre au métabolisme médié par le CYP3A4. Cependant, certaines réactions sont catalysées davantage par le CYP3A5 que par le CYP3A4, tels que la O⁶-déméthylation de la thébaine, un opiacé, ou l'activation du lapatinib, un antinéoplasique.⁶

Les inhibiteurs du CYP3A4, dont le kétoconazole, le fluconazole, le gestodène et le cannabidiol, inhibent généralement le CYP3A5.⁶

L'hydroxylation du midazolam, une benzodiazépine utilisée en anesthésie ou dans les cas d'insomnie, est une réaction spécifique au CYP3A4/5 et fut utilisée pour mon projet de recherche.⁴¹

2.5.9 CYP4A11

Le CYP4A11 est une isoenzyme des CYP450 exprimée majoritairement dans le foie et dans le rein. Le CYP4A11 catalyse l' ω -hydroxylation des acides gras et ne semble pas impliqué dans le métabolisme des médicaments. Cependant, son importance au niveau endogène est démontrée par son métabolisme de l'acide laurique, de l'acide arachidonique et des prostaglandines.^{6, 82}

Au moins 9 variants génétique dans le gène *CYP4A11* (locus chromosomique 1p33)⁸³ ont été répertoriés.⁶ Cependant, ces variants n'ont pas été étudiés dans le cadre de ce projet.

Le CYP4A11 peut être induit par le clofibrate et la dexaméthasone *via* le récepteur PPAR α . Peu d'inhibiteurs ont été rapportés pour cette isoenzyme.⁶

L'hydroxylation de l'acide laurique fut monitorée comme réaction spécifique au CYP4A11 au cours de cette étude.⁸⁴

2.6 Autres cytochromes P450

Les CYP450 suivants ont été analysés seulement au niveau de l'expression d'ARN messager et seront traités brièvement.

2.6.1 Les CYP1

Le CYP1A1 est impliqué dans l'activation de certains composés hétérocycliques et les amines aromatiques, ainsi que les hydrocarbures polycycliques. Cette isoenzyme est exprimée dans le foie chez le fœtus, mais très peu chez l'adulte. On la retrouve majoritairement au niveau pulmonaire. Le CYP1A1 n'est pas considéré comme étant une isoenzyme majeure dans le

métabolisme des médicaments, mais pourrait jouer un rôle dans la carcinogénèse induite par des composés chimiques.⁶

Le CYP1A2 est exprimé principalement dans le foie et a environ 70% d'homologie de séquence avec le CYP1A1. Il a été estimé que cette isoenzyme représente environ 6 à 13% des CYP450 hépatiques. Le CYP1A2 joue un rôle dans l'activation des carcinogènes et métabolise également les amines aromatiques. La caféine est un substrat important de cette isoenzyme et est fréquemment utilisée comme substrat marqueur pour évaluer son activité.⁶

Le CYP1B1 est très peu exprimé dans le foie et est retrouvé principalement dans les organes extrahépatiques, tels que le rein, le poumon et l'intestin grêle. Il ne semble pas avoir un rôle majeur au niveau du métabolisme des médicaments. Cependant, sa capacité à activer divers carcinogènes chimiques, tels que les hydrocarbures polycycliques, les amines hétérocycliques, les amines aromatiques et les hydrocarbures nitropolycycliques explique son importance dans le développement de tumeurs. Le CYP1B1 serait d'ailleurs surexprimé dans divers types de tumeurs malignes.⁶

2.6.2 Les CYP2

Le CYP2A6 est exprimé de manière intermédiaire dans le foie humain, ainsi que dans la muqueuse nasale et oesophagienne, dans la trachée et les poumons. Cette isoenzyme est impliquée dans le métabolisme du coumarin, de plusieurs produits chimiques industriels, ainsi que la nicotine. Certaines études ont également indiqué une surexpression du CYP2A6 dans les tumeurs colorectales.⁶

2.6.3 Les CYP3

Le CYP3A7 est principalement connu pour son expression au niveau du foie chez le fœtus, tandis que l'expression du CYP3A4 y est très faible. Son activité catalytique est similaire à celle du CYP3A4.⁶

2.6.4 Les CYP4

Le CYP4F2 catalyse plusieurs réactions liées aux substrats endogènes, tels que les lipides, le leucotriène B₄, l'acide arachidonique et la vitamine E. Cette isoenzyme présente deux polymorphismes génétiques résultant en une diminution de la stabilité de la protéine. Ces polymorphismes influencent la dose de warfarine nécessaire pour exercer son activité anticoagulante, puisque le CYP4F2 oxyde la vitamine K qui est impliquée dans le processus de coagulation (cible de la warfarine).⁶ Le CYP4F2 métabolise le fingolimod (utilisé dans le traitement de la sclérose en plaques) et serait induit par la lovastatine.⁶

Le CYP4F12 présente au moins 7 variants génétiques, dont certains sont associés à une perte d'activité.⁶ Cette isoenzyme catalyse majoritairement des réactions endogènes, comptant parmi ses substrats l'acide arachidonique, le leucotriène B₄ et des analogues de la prostaglandine.⁶ Cependant, le CYP4F12 a également été associé à l'hydroxylation de l'antihistaminique ébastine avec une clairance environ 250 fois inférieure à celle observée pour le CYP2J2.⁷⁴

3. Interactions médicamenteuses

3.1 Induction

Certaines isoenzymes du CYP450 sont inductibles lors de l'exposition à certains composés, tel que mentionné dans les sections précédentes. Les CYP1A1, CYP2C9, CYP2E1 et CYP3A4

font partie des isoenzymes démontrant un caractère inductible. La majorité des CYP450 inductibles sont régulés par des mécanismes transcriptionnels (à l'exception du CYP2E1) qui impliquent la liaison d'un composé à un récepteur nucléaire (souvent *aryl hydrocarbon receptor* AhR, CAR ou PXR).^{29, 85} En général, un substrat se lie à l'un des récepteurs nucléaires, ce qui mène ultimement à l'induction de l'enzyme *via* la translocation du récepteur vers le noyau permettant l'activation de la transcription du gène, ce qui en fait un processus dépendant du temps.⁸⁶ Suite à l'induction d'une isoenzyme, l'activité catalytique maximale de cette dernière sera augmentée et la constante d'affinité restera la même, puisque l'affinité reste inchangée.²⁹ La co-administration d'un composé inducteur pour une isoenzyme avec un médicament substrat de cette même isoenzyme entraînera une augmentation de la clairance intrinsèque *via* l'augmentation du V_{\max} . Ce changement peut être cliniquement important pour les médicaments à faible clairance, dont le métabolisme est limité par la quantité d'enzymes disponibles.²⁹

3.2 Inhibition

L'inhibition des CYP450 peut se faire selon plusieurs mécanismes, dont certains seront détaillés ci-dessous.

3.2.1 Inhibition compétitive

L'inhibition compétitive est souvent désignée comme étant une inhibition réversible. Le mécanisme de ce type d'inhibition implique une compétition au site actif de l'isoenzyme, ce qui correspond à la première étape du cycle catalytique illustré à la section 2.4.1. Les inhibiteurs réversibles peuvent se lier à l'hème ou à une région lipophile de la protéine. La puissance d'un inhibiteur est généralement proportionnelle à sa lipophilicité et à la force de la liaison avec la protéine.²⁹ Le processus de compétition est illustré par l'équation 1, où v , V_{\max} , $[S]$, K_m , $[I]$ et K_i

représentent respectivement la vitesse de la réaction, la vitesse maximale de la réaction si le substrat sature l'enzyme, la concentration de substrat, la concentration nécessaire de substrat pour atteindre la moitié du V_{max} , la concentration d'inhibiteur et la constante reflétant l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur.⁸⁷

Équation 1 :

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$$

Un inhibiteur compétitif aura donc pour effet d'augmenter le K_m apparent, mais n'aura pas d'effet sur la vitesse maximale de la réaction.²⁹

3.2.2 Inhibition non compétitive

L'inhibition non compétitive fait partie des processus d'inhibition réversible.²⁹ Lors de ce processus, l'inhibiteur se lie de manière allostérique. Le composé n'empêche donc pas la liaison du substrat à l'enzyme, mais empêche la réaction catalytique qui formerait normalement le métabolite. La co-administration d'un substrat et d'un inhibiteur non compétitif aura pour effet de diminuer l'activité catalytique, mais n'aura pas d'effet sur l'affinité du substrat pour l'enzyme.²⁹

3.2.3 Inhibition suicide

L'inhibition suicide est définie comme un type d'inhibition irréversible. Ce type d'inhibition se produit lorsqu'une isoenzyme métabolise un substrat dont le métabolite est hautement réactif. Ce métabolite va par la suite inactiver l'enzyme *via* une altération du groupement hème et/ou un changement au niveau de la protéine. Le CYP450 se trouve donc inactivé par le processus d'inhibition suicide. Seules les enzymes touchées par l'inhibition seront

détruites ou endommagées. Lors d'un cas d'inhibition suicide, une inactivation de l'enzyme dépendante du temps sera observée. Ce type d'inhibition est caractérisé par une diminution de l'activité catalytique (V_{\max}) due à la quantité réduite d'enzymes disponibles pour effectuer la réaction. Cependant, le K_m restera inchangé, puisque l'affinité du substrat pour l'enzyme n'est pas influencée par ce type d'inhibition.²⁹

4. Transporteurs

Le processus d'absorption des xénobiotiques peut également être affecté par l'activité des transporteurs membranaires. Ces transporteurs peuvent faciliter ou limiter le passage du médicament de la lumière intestinale à l'entérocyte et de l'entérocyte à la circulation sanguine.⁸⁸ Le transport du médicament sera traité brièvement, puisque l'expression intestinale de divers transporteurs constitue un objectif secondaire dans ce projet.

En fait, l'absorption d'un composé au niveau de la membrane peut se faire par la voie paracellulaire ou la voie transcellulaire. La voie paracellulaire est caractérisée par la diffusion passive de la molécule au niveau des jonctions serrées entre les cellules épithéliales de l'intestin. Cette voie est moins empruntée par les médicaments, puisqu'elle est réservée à de petites molécules hydrophiles et qu'elle constitue moins de 0,01% de la surface totale de l'intestin grêle.

La voie transcellulaire peut être divisée en deux mécanismes majeurs au niveau de l'absorption des médicaments : la diffusion passive et le transport actif. La diffusion passive transcellulaire est la voie principale d'absorption de certains médicaments au niveau intestinal.⁸⁹ Puisque la membrane cellulaire est une bicouche lipidique composée de phospholipides dont la tête est hydrophile et la queue est hydrophobe, les petites molécules lipophiles peuvent diffuser

plus facilement à travers cette membrane.^{7, 90} Cependant, certains composés sont difficilement absorbés de manière passive et vont requérir l'aide de transporteurs pour traverser la membrane. Le transport actif des médicaments s'effectue à l'aide de deux superfamilles de transporteurs, soit celle des transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC) et celle des transporteurs *Solute carrier proteins* (SLC), lesquelles seront détaillées brièvement au cours de ce texte.⁷

Les deux familles majeures de transporteurs membranaires (ABC et SLC) sont retrouvées au long de l'intestin grêle humain. Au niveau de l'entérocyte, l'emplacement de ces transporteurs est distinct (voir Figure 9 ci-dessous). Différents transporteurs peuvent être impliqués dans le processus d'absorption, soit en facilitant (influx) ou en limitant l'absorption (efflux) des xénobiotiques. L'impact des transporteurs intestinaux sera déterminé par l'affinité des substrats et leur spécificité pour les différents transporteurs, ainsi que par l'expression régionale des transporteurs.⁹¹

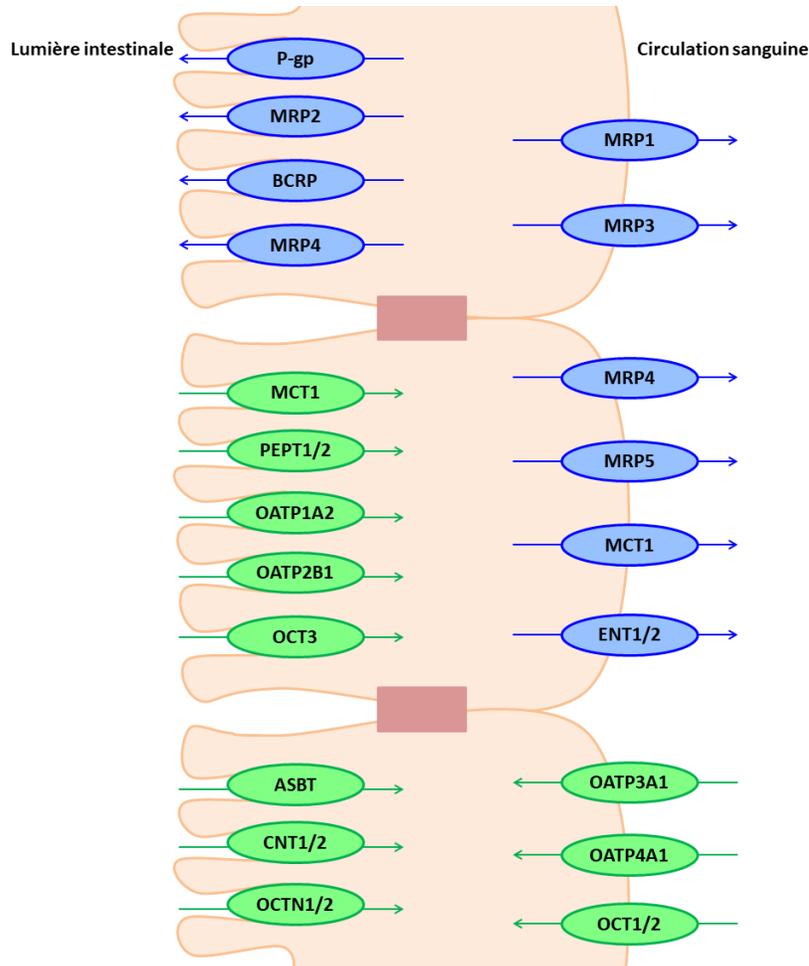


Figure 9 : Transporteurs membranaires de l'entérocyte
 Figure adaptée de Shugarts et al. (2009)⁹²

4.1 Transporteurs ABC

Les transporteurs ABC sont des transporteurs d'efflux présents dans les membranes cellulaires et intracellulaires. Les transporteurs ABC les plus connus sont le ABCB1 (Glycoprotéine P; P-gp), le ABCG2 (*Breast Cancer Resistance Protein*; BCRP) et la famille des ABCC (*Multidrug Resistance-associated Proteins*; MRP).⁹³ Environ 50 transporteurs ABC ont été répertoriés jusqu'à présent. En règle générale, les transporteurs ABC effectuent du transport d'efflux [ABCB1 (P-gp), ABCC (MRP), ABCG2 (BCRP)], c'est-à-dire un transport du milieu

intracellulaire à extracellulaire.⁹⁴ Les transporteurs de la famille des ABC utilisent l'ATP comme source d'énergie pour transporter les substrats contre un gradient de concentration.⁹²

Les transporteurs ABC présentent un défi pharmacologique, puisqu'en plus d'intervenir dans le processus d'absorption intestinale des médicaments, ils contribuent à la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie, ainsi qu'à la résistance des bactéries aux antibiotiques.⁹³

Au niveau du jéjunum chez l'humain, Seithel *et al.* (2006), ainsi que Drozdik *et al.* (2014) ont trouvé une expression d'ARNm importante pour les transporteurs ABCC2 et ABCB1, tandis que les transporteurs ABCG2 et ABCC3 étaient exprimés à un niveau modéré.^{91,95} Il a été rapporté que les transporteurs ABCB1 et ABCC3 pourraient avoir un impact important au niveau de la quantité de xénobiotique absorbée, puisque ABCB1 limite l'entrée dans l'entérocyte et ABCC3 facilite le transport des composés vers la circulation sanguine.^{11,92}

Le transporteur ABCB1, également appelé P-glycoprotéine (P-gp) est le transporteur d'efflux majoritaire de l'intestin grêle et est localisé à la surface apicale des entérocytes matures.⁷⁹ Il a été rapporté dans la littérature que l'expression de la P-gp augmente au long de l'intestin.⁹⁶ Plusieurs substrats du CYP3A4, tels que la cyclosporine, l'érythromycine, le tacrolimus et le vérapamil sont également substrats du transporteur ABCB1, ce qui limite grandement leur biodisponibilité.⁹⁷ Parmi ces composés, on retrouve également la digoxine, le paclitaxel, le saquinavir et le talinolol. Le fait que ces composés soient substrats du CYP3A4 et de la P-gp permet aux molécules non métabolisées d'être excrétées par le transporteur dans la lumière intestinale pour ensuite être ré-exposées aux enzymes de métabolisme.^{7,8,94}

Le transporteur ABCG2 (BCRP) a également une grande importance clinique avec son large spectre de substrats, ainsi que sa forte expression tout au long de l'intestin grêle humain.⁷

Son expression diminuerait au long de l'intestin grêle.⁹⁶ Plusieurs classes de médicaments sont sujettes au transport d'efflux *via* le transporteur BCRP : des agents anticancéreux, des antiviraux, des statines et des antibiotiques.⁷

4.2 Transporteurs SLC

Environ 400 transporteurs SLC ont été identifiés à ce jour. Les transporteurs SLC sont classés selon leur fonction. On y retrouve les transporteurs *organic anion transporters* (OAT), *organic anion transporting polypeptides* (OATP), *organic cation transporters* (OCT) et *peptide transport proteins* (PEPT).⁹³ La majorité des transporteurs SLC sont des transporteurs d'influx suivant le gradient de concentration des composés, mais ils peuvent être bidirectionnels. Ces transporteurs n'utilisent pas de source d'énergie directe, mais peuvent utiliser les gradients ioniques H⁺, Na⁺ et Ca²⁺ créés par les transporteurs actifs primaires pour effectuer leur activité de transport.^{7, 92, 96} Dans l'intestin, on retrouve les OCT et les OCTN (*organic cation/carnitine transporters*), qui transportent les cations organiques, ainsi que les OATP qui transportent les anions organiques.⁹⁴ Les études de Seithel *et al.* (2006) et Drozdik *et al.* (2014) mentionnées précédemment ont également évalué l'expression intestinale des transporteurs de la famille des SLC. Le transporteur PEPT1 était le plus fortement exprimé, les transporteurs OCTN2 et MCT1 étaient exprimés à un niveau intermédiaire, alors que les transporteurs OATP2B1, OCT1, OAT2 et OCT3 étaient exprimés faiblement.^{91, 95}

Suite à son entrée dans l'entérocyte, le xénobiotique sera exposé à diverses enzymes de métabolisme qui limiteront sa biodisponibilité. Parmi ces enzymes, on retrouve les CYP450, qui ont été discutés précédemment et seront détaillés davantage au cours de ce mémoire.¹⁶

5. Conclusion

En résumé, le métabolisme intestinal peut limiter la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale et introduire une variabilité interindividuelle dans la réponse clinique. Cette variabilité peut s'expliquer par les différences d'expression et d'activité des CYP450, tant au niveau hépatique qu'au niveau intestinal. L'effet de premier passage entéro-hépatique contribue grandement à la faible biodisponibilité de certains composés. Les enzymes CYP450 sont sujettes à divers facteurs pouvant moduler leur expression et leur activité, tels que les polymorphismes génétiques et les interactions médicamenteuses. Cela peut avoir un impact significatif sur les concentrations plasmatiques et contribuer à la variabilité dans la réponse aux médicaments.

6. Hypothèse

Suite à l'administration orale des médicaments, plusieurs facteurs peuvent intervenir dans le processus d'absorption, affectant ainsi la quantité qui sera biodisponible. Parmi ces facteurs, on note particulièrement les enzymes retrouvées dans les entérocytes, lesquelles peuvent participer à l'élimination des médicaments avant qu'ils atteignent la circulation systémique. De plus, il a été discuté brièvement des transporteurs de médicaments, lesquels peuvent faciliter ou limiter le passage des médicaments de la lumière intestinale à la circulation systémique.

L'hypothèse supportant ce projet de recherche est que les enzymes de métabolisme retrouvées au long de l'intestin grêle présentent une expression spécifique et que leur activité peut contribuer au métabolisme présystémique. Cela peut affecter l'effet de premier passage de certains médicaments suivant leur administration par voie orale et aurait un impact sur la biodisponibilité de ces composés. Par conséquent, le métabolisme intestinal suivant l'administration orale des

médicaments pourrait contribuer à la variabilité des concentrations plasmatiques et de la réponse thérapeutique.

7. Objectifs

Il existe peu de données sur la caractérisation détaillée de l'expression et de l'activité des différentes isoenzymes des CYP450 au long de l'intestin grêle. La majorité des études ont utilisé des échantillons préparés en groupant les sections provenant de plusieurs donneurs ou la longueur totale de l'intestin d'un donneur, empêchant ainsi une caractérisation de la variabilité régionale et interindividuelle.

En étudiant différentes sections de l'intestin grêle, les objectifs de ce projet sont 1) de caractériser l'expression relative d'ARN messenger des isoenzymes CYP450 pertinentes, 2) d'évaluer et comparer l'activité *in vitro* des CYP450 les plus impliqués dans le métabolisme des médicaments chez l'humain et 3) d'étudier l'influence des polymorphismes génétiques sur l'activité des CYP450 intestinaux. L'objectif secondaire est d'investiguer l'expression différentielle d'ARNm des transporteurs de médicaments au long de l'intestin grêle humain.

CHAPITRE 2- Article

CYP450 activities and mRNA expression levels in human small intestine

(Version originale, en préparation pour soumission)

Valérie Clermont^{1,2}, Alexia Grangeon², Azemi Barama³, Jacques Turgeon^{1,2,4,5},

Veronique Michaud^{1,2,4,5}

¹ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

³ Department of Surgery, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montreal, QC, Canada

⁴ College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, FL, USA

⁵ University of Florida Research and Academic Center, Lake Nona Campus, Orlando, FL, USA

Address for correspondence:

Véronique Michaud, B.Pharm., Ph.D.

Centre de recherche du CHUM,

900 St. Denis Street, Viger Tower, R08-480

Montreal, Quebec, Canada, H2X 0A9.

Tel: 514-890-8000 ext.15812

E-mail: v.michaud@umontreal.ca

Number of words (abstract); 250

Number of references; 18

Number of tables; 5

Number of figures; 4

Number of supplemental tables; 3

Number of supplemental figures; 2

Keywords: Cytochromes P450, small intestine, drug metabolism, CYP450 probe markers,
CYP450 mRNA

ABSTRACT

Drug metabolism in the human intestine limits the bioavailability of orally administered drugs. The CYP450 superfamily of enzymes plays a key role in presystemic metabolism of drugs which can contribute to interindividual variability in their plasma levels and response. The objective of our study was to characterize mRNA expression levels and *in vitro* activities of major CYP450s along the entire human small intestine. Intestine specimens (2-7m, from duodenum to ileum) from 9 deceased individuals eligible for organ donation were obtained. Relative mRNA expression levels for 17 CYP450s were determined in 10 intestinal sections (4 from duodenum, 3 from jejunum and 3 from ileum) by TaqMan RT-qPCR. *In vitro* incubations with intestinal microsomes (5 preparations: 1 from combined duodenum sections, 2 from jejunum and 2 from ileum) were performed with 9 CYP450 probe-substrates. Overall, the relative pattern of CYP450 mRNA expression was similar along the entire small intestine. CYP450 mRNA transcripts ranked as follows: CYP3A4>2C9>2C19>2J2>3A5. However, CYP450 mRNA transcripts showed different expression tendencies: some isoenzymes tended to decrease from duodenum to ileum (CYP1A1, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP4A11) while others tended to increase (CYP1B1, CYP2B6, CYP2D6, CYP2J2, CYP4F2). CYP450 activities were greater in the proximal part of the small intestine and decreased in the ileum. The highest intestinal CYP450 activities were observed with midazolam (CYP3A4) (CL_{int} : 3.2-111 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein/min), ebastine (CYP2J2) (CL_{int} : 15-209 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein/min) and tolbutamide (CYP2C9) (CL_{int} : 0.013-0.67 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein/min). Our results confirmed significant CYP450 expressions and activities in human small intestine, as well as their wide interindividual variability.

INTRODUCTION

Over the years, oral administration of drugs has proven to be the most desirable and accessible route to treat patients with chronic diseases (Paine et al., 2006; El-Kattan and Varma, 2012; Gavhane and Yadav, 2012; Pereira de Sousa and Bernkop-Schnurch, 2014). However, oral administration of xenobiotics leads to significant interindividual variability, which can be attributed to several factors such as genetics, environment (*e.g.* diet, smoking or co-medication), pathologies (*e.g.* liver disease), or anthropometric measures (weight, age) (Temesvari et al., 2012).

Several enzymes, more specifically isoenzymes of the CYP450 superfamily, are involved in the phase I metabolism of xenobiotics. CYP450 isoenzymes, predominantly expressed in the liver, are involved in the metabolism of about 75% of clinically used drugs. Following their administration, differences observed between plasma concentrations of orally and parenterally administered drugs are often explained by the ‘hepatic’ first pass metabolism. However, it is now recognized that extrahepatic CYP450s, and especially CYP450s expressed in the intestine, can modulate systemic drug exposure (Ortiz de Montellano, 2015).

Indeed, the human small intestine has long been overlooked as a metabolizing organ. Several studies have reviewed the potential significance of intestinal metabolism (Lin et al., 1999; Doherty and Charman, 2002; Kaminsky and Zhang, 2003; Gavhane and Yadav, 2012; Pereira de Sousa and Bernkop-Schnurch, 2014). Presystemic metabolism is of particular importance for orally administered drugs since they must go through enterocytes before reaching the blood circulation. A study conducted by Varma *et al.* on 309 drugs administered orally showed that ~30% of these compounds undergo significant intestinal extraction (Varma et al., 2010).

There is a lack of data on the differential expression and activity of CYP450 enzymes along the entire human small intestine. Evidence suggests that CYP450s have a regional distribution, as well as a higher concentration in the villus tips (Galetin and Houston, 2006; Pereira de Sousa and Bernkop-Schnurch, 2014). Previously published studies rarely used different sections from the same individual, making it difficult to compare the regional distribution of these enzymes. Since most of the data are derived using a pool of intestinal specimens, the characterization and assessment of interindividual variability in CYP450 expressions and activities along the entire small intestine could not fully be established (Obach, 2001; Galetin and Houston, 2006; Paine et al., 2006; Groer et al., 2014).

We hypothesized that intestinal CYP450s contribute to the presystemic metabolism of drugs, which could partly explain interindividual variability in drug plasma levels and drug response. Using human small intestinal tissue, the objectives of this study were, 1) to characterize relative mRNA expression levels of relevant CYP450 isoenzymes, 2) to assess and compare *in vitro* metabolic activities of the major CYP450s involved in drug metabolism, and 3) to evaluate the contribution of CYP450 polymorphisms to their corresponding *in vitro* activity.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Bupropion, hydroxybupropion, hydroxybupropion-d₅, repaglinide, 3'-hydroxyrepaglinide (M4), hydroxytolbutamide, 1'-hydroxytolbutamide-d₉, carboxytolbutamide, 4'-carboxytolbutamide-d₉, bufuralol, hydroxybufuralol, hydroxybufuralol-d₉, 6-hydroxychlorzoxazone, ebastine, hydroxyebastine, hydroxyebastine-d₅, carboxyebastine, carebastine-d₅, desalkylebastine, desalkylebastine-d₅, 4-hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam-d₅, 12-hydroxydodecanoic-d₂₀ acid, S-mephenytoin, 4-hydroxymephenytoin and 4-hydroxymephenytoin-d₂ were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). Hydroxychlorzoxazone-d₂ was obtained from TLC PharmaChem (Mississauga, ON, Canada). Midazolam, 1'-hydroxymidazolam and 1'-hydroxymidazolam-d₄ were purchased from Cerilliant (Round Road, TX, USA). Tolbutamide, chlorzoxazone, 12-hydroxydodecanoic acid, lauric acid, β -Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP), glucose-6-phosphate (G6P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), dimethyl sulfoxide (DMSO), tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and dithiothreitol (DTT) were obtained from Bioshop (Burlington, ON, Canada) and from Gibco®, Life Technologies Ltd. (Eugene, OR, USA), respectively. Aprotinin and leupeptin were acquired from Roche (Mannheim, Germany). Glycerol was purchased from Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, USA). Drugs used as CYP450 inhibitors including sulfaphenazole, fluvoxamine, quinidine, diethyldithiocarbamate, astemizole, ketoconazole and troleandomycin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Montelukast was purchased from Santa Cruz

Biotechnology (Dallas, TX, USA). All other chemicals used were commercially available and of analytical grade.

Sample preparation

Human intestinal specimens

This project was approved by the CHUM research ethics committee (project 14.109). The collection of human intestinal specimens was conducted in collaboration with Transplant Québec, a non-profit organization responsible for organ donation regulation and coordination.

Intestinal specimens were obtained from 9 deceased individuals eligible for organ donation and for whom consent was given for research purpose tissue retrieval. The whole length of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) was collected for each donor, except when the pancreas has been used for transplantation, in which case the duodenum was not obtained (n=2). After resection, the small intestine was conserved in an ice-cold Krebs-Ringer transport solution until arrival at the research center. The small intestine regions (duodenum, jejunum and ileum) were visually identified and separated in subsections of 10 cm each. Finally, tissue samples were then washed twice in cold Tris-KCl-EDTA pH 7.4 buffer. Samples were subsequently snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Isolation of RNA and preparation of cDNA

Total RNA was extracted from the different subsections (n=10) along the human small intestine [4 for the duodenum, 3 for the jejunum (proximal, medial and distal) and 3 for the ileum (proximal, medial and distal)]. The method used to extract total mRNA was adapted from previously published work from our laboratory (Michaud et al., 2010). About 100 mg of tissue

was homogenized with a Tissue Ruptor in a 2 mL Eppendorf tube containing 500 μ L of Trizol. An additional 500 μ L of Trizol and 200 μ L of chloroform were added to the tube, which was then vortexed for 1 minute. The sample was centrifuged at 13,000 g for 20 minutes at 4°C. The upper aqueous layer was removed and transferred to a new 2 mL Eppendorf tube, where 500 μ L of 70% RNase free ethanol was added and mixed using the up-and-down method. Total RNA was extracted using the Qiagen kit (RNeasy Mini kit; Qiagen Sciences, MD, USA) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA (2 μ g) of each sample was loaded for reverse transcription, as well as 6 μ g of random primers, RNase Free water and 2 μ L of 10 mM dNTP mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The samples were subsequently preheated at 65°C for 5 minutes and put on ice. Then, 5X-first strand buffer (8 μ L), DTT (4 μ L), RNase OUT (2 μ L) and Superscript II (2 μ L) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were added to each sample. After a brief vortex, the samples were heated at 42°C for 50 minutes for reverse transcription. This process was terminated by heating at 70°C for 15 minutes and cooling down to 4°C. The cDNA was then stored at -80°C until RT-qPCR experiments were performed. Commercial pooled human intestinal RNA was reverse transcribed by the same procedure and used as calibrator in RT-qPCR analyses.

RT-qPCR Analysis

Relative mRNA expression levels for 17 CYP450s were determined for the 10 different subsections along the small intestine. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) experiments were done using TaqMan probes from Applied Biosystems (Foster, CA, USA). The analyzed CYP450s were: CYP1A1 (Hs01054796_g1), CYP1A2 (Hs00167927_m1), CYP1B1 (Hs00164383_m1), CYP2A6 (Hs00868409_s1), CYP2B6 (Hs04183483_g1), CYP2C8 (Hs00946140_g1), CYP2C9 (Hs00426397_m1), CYP2C19 (Hs00426380_m1), CYP2D6 (Hs02576167_m1), CYP2E1 (Hs00559368_m1), CYP2J2 (Hs00951113_m1), CYP3A4 (Hs00604506_m1), CYP3A5

(Hs01070905_m1), CYP3A7 (Hs00426361_m1), CYP4A11 (Hs00167961_m1), CYP4F2 (Hs00426608_m1) and CYP4F12 (Hs02515808_s1). RPLPO (Hs99999902_m1) and RPS9 (Hs02339424_g1) were validated (data not shown) and used as housekeeping genes.

cDNA dilutions were performed in MilliQ water (1:20) in order to obtain 5 ng of cDNA per reaction. The cDNA samples were mixed with TaqMan Fast PCR Master Mix and probes. MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) were run on an Applied Biosystems QuantStudio 6 under fast amplification conditions for 40 cycles consisting of 1 second at 95°C and 20 seconds at 60°C. Results were analyzed with the QuantStudio 6™ Software version 1.1 (Carlsbad, CA, USA). As indicated previously, RPLPO and RPS9 were used as housekeeping genes and pooled human intestinal cDNA (Human Small Intestine Total RNA, Clontech, Mountainview, CA, USA) was used as calibrator.

The relative quantification of various gene expressions was calculated with the comparative CT method using the formula $2^{-\Delta CT}$ (Schmittgen and Livak, 2008). Only CT values ≤ 35 were included in the analyses. Since CT values >35 were not reliable and considered below the quantification level of the assay; a CT value between 35 and 38 was defined as not quantifiable (NQ) while a CT value over 38 was considered not detectable (ND). In addition, mRNA levels associated with the expression of each CYP450 isoenzyme between subsections were determined using a calibrator and the following formula: $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008). Determination of mRNA levels was performed in triplicate for each sample. Calibrator and housekeeping gene values were verified between RT-qPCR runs to validate the results.

CYP450 activities in human small intestine

Preparation of human intestine microsomes

Intestinal microsomes were prepared from duodenum (tissue was pooled from 2 subsections), jejunum (proximal and mid-jejunum only) and ileum (proximal and mid-ileum only) regions. The amount of tissue available in each region limited our capacity for preparing sufficient amount of microsomes to conduct the various experiments. Therefore, CYP450 activities will be compared among 5 different sections of the small intestine. In this respect, the assessment of full kinetic profiles (including K_m , V_{max} and intrinsic clearance) was performed for the jejunum (proximal and mid-jejunum subsections only).

Frozen sections of human small intestine were placed on a cold metal plate to thaw slightly before mucosal scraping. Mucosal scraping was performed using 2 subsections (10 cm each) of small intestine using disposable scalpels to prevent contamination. (Paine et al., 1997; von Richter et al., 2004; Galetin and Houston, 2006) The mucosal scraping was immersed in an ice-cold solution of Tris-KCl-EDTA buffer 100 mM (pH 7.4) containing 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.01 mM PMSF, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin. Samples were homogenized with a tissue ruptor on ice. The microsomal fraction was isolated by differential ultracentrifugation techniques. The first centrifugation step was performed for 20 minutes at 10,000g at 4°C. The supernatant was transferred to clean centrifuge tubes and centrifuged at 100,000g for 90 minutes at 4°C. The resulting pellet was resuspended in Tris-KCl-EDTA buffer to undergo a third centrifugation (100,000g for 90 minutes at 4°C). The microsomal pellet was resuspended in a Tris-KCl-EDTA buffer with 10% glycerol. Incubations for bupropion, ebastine and midazolam were performed on freshly isolated human intestine microsomes, as described below in *In vitro incubations*. The

remaining volume of microsomes was flash-frozen immediately after homogenization and stored in a -80°C freezer to perform additional incubations with other probe substrates.

The microsomal protein concentrations were quantified by Bicinchoninic Acid (BCA) protein assay using a BCA Pierce kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with Bovine Serum Albumin (BSA) as a standard, following the manufacturer's recommendations.

In vitro incubations

In vitro incubations with intestinal microsomes were performed with various CYP450 probe substrates: bupropion (CYP2B6), repaglinide (CYP2C8), tolbutamide (CYP2C9), S-mephenytoin (CYP2C19), bufuralol (CYP2D6), chlorzoxazone (CYP2E1), ebastine (CYP2J2), midazolam (CYP3A4/5) and lauric acid (CYP4A11).

Assay conditions, such as buffer choice, incubation period, protein content and drug concentrations, were previously optimized by standard incubation procedures for each probe substrate. Briefly, the standard incubation mix containing human intestinal microsomes (HIM) (20-40 µL, mean protein range: 0.34-0.67 mg/mL), Tris buffer (100 mM, pH 7.5) or phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) and NADPH-regenerating system (NADP⁺ 6.5 mM, G6P 16.5 mM, MgCl₂ 5 mM and 0.2 units G6PD) was pre-incubated in a shaking bath for 10 minutes at 37°C. Reaction was initiated by the addition of substrates (bupropion, repaglinide, tolbutamide, S-mephenytoin, bufuralol, chlorzoxazone, ebastine, midazolam or lauric acid) to the incubation mixture (total volume of 0.5 mL).

Incubations were performed (in duplicate) first with microsomes from jejunum sections using 5 different substrate concentrations ranging from 0.25 to 4-times K_m values. Based on these

results, incubations (in triplicate) with microsomes from duodenum and ileum sections were conducted at 1 substrate concentration selected to ensure enzyme saturation.

After 30 minutes (or 45 minutes for S-mephenytoin and bufuralol), the reaction was stopped using 1 mL of ice-cold methanol containing isotope-labeled probe metabolite(s) being used as internal standards. Reaction mixture was placed on ice for at least 10 minutes, centrifuged for 10 minutes at 13,000 g and the supernatant was transferred to an injection vial for LC-MS/MS analyses. For S-mephenytoin and lauric acid, an evaporation step to concentrate the samples was performed prior to transfer. The solution was evaporated to dryness at 50°C under a gentle stream of nitrogen for approximately one hour, reconstituted with 200 µL methanol and transferred to an injection vial for analysis. Specific incubation parameters for each substrate are detailed in Supplemental Table 1.

Inhibition studies

Inhibition studies were performed on intestinal microsomes from 3 subjects to confirm the specificity of the probe substrates to their respective metabolic pathway. Inhibitors were selected for the corresponding probe substrates associated with significant degree of metabolism in intestinal microsomes (i.e. tolbutamide, chlorzoxazone, ebastine and midazolam): sulfaphenazole (10 µM) for CYP2C9, diethyldithiocarbamate (50 µM) for CYP2E1, astemizole (50 µM) for CYP2J2, as well as ketoconazole (5 µM) for CYP3A4/5. Experiments were carried at saturation for each substrate: 400 µM for tolbutamide (CYP2C9), 600 µM for chlorzoxazone (CYP2E1), 5 µM for ebastine (CYP2J2) and 10 µM for midazolam (CYP3A4). The same procedures were used as described previously for standard incubations, except for the addition of the inhibitor prior to the pre-incubation period of 10 minutes. Results are expressed as the inhibition percentage of

marker substrate metabolite formation compared to the standard incubation (without inhibitor). Inhibition results for the other probe substrates are not shown considering the low extent of CYP450 activity for these metabolic pathways.

LC-MS/MS analysis

Chromatographic conditions for the metabolites of Bupropion, Ebastine and Midazolam

LC-MS/MS analyses for the metabolites of bupropion, ebastine and midazolam were performed on a Thermo Scientific Acclaim RSLC Polar Advantage C16 column (75*3.0 mm, 3 µm) and Phenomenex Security Guard Cartridge (C12, 4*2 mm) operating at 50°C. The mobile phase consisted of A) 0.1% formic acid in acetonitrile and B) 10 mM ammonium formate in water adjusted to pH 3 using gradient elution. The A:B ratio varied from 25:75 to 60:40 (v/v) at a flow rate 500 µL/min for a total run time of 10 minutes. Ten microliters of the sample were injected into the LC-MSMS system.

A Thermo Scientific TSQ Quantiva Triple Quadrupole mass spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with a Thermo Scientific Ultimate 3000 XRS UHPLC system (San Jose, CA, USA) using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in positive ion mode using selected reaction monitoring (SRM) (Supplemental Table 2).

Chromatographic conditions for the metabolites of Repaglinide, Tolbutamide, S-Mephenytoin, Bufuralol, Chlorzoxazone and Lauric acid

Analyses for the metabolites of repaglinide, tolbutamide, S-mephenytoin, bufuralol, chlorzoxazone and lauric acid were carried out on a Phenomenex Luna PFP (2) column (150 x 3.0 mm I.D., 3 µm) with a Phenomenex PFP security guard cartridge operating at 40°C. An isocratic

mobile phase consisting of acetonitrile and 0.01% formic acid with a fixed ratio of 40:60 (v/v) was used at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ for tolbutamide, chlorzoxazone and lauric acid, while a ratio of 50:50 (v/v) was used for repaglinide and bufuralol. A ratio of 30:70 (v/v) was used for the analysis of S-mephenytoin metabolites. A volume of ten microliters for each sample was injected into the LC-MSMS system, except for tolbutamide and S-mephenytoin, where five microliters were injected.

The HPLC system consisted of a Shimadzu Prominence series UFLC pump and auto sampler (Kyoto, Japan). The tandem MS system used was a Thermo TSQ Quantum Ultra (San Jose, CA, USA). The mass spectrometer was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted heated electrospray ion source. MS detection was performed in negative ion mode for chlorzoxazone, tolbutamide, and lauric acid metabolites, as opposed to positive ion mode for bufuralol and repaglinide metabolites using selected reaction monitoring (SRM) (Supplemental Table 2).

CYP450 genotypes

Isolation of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from intestinal tissue samples with the PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The resulting DNA was stored at -20°C until use. Aliquots were made at a concentration of 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in DNA-free water and 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ in TE buffer.

Genotyping for the common variants of the CYP450s of interest was performed by TaqMan RT-qPCR SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Probes used for each SNP were as follows: *CYP2B6**4 (rs2279343), *CYP2B6**9 (rs3745274), *CYP2C8**2 (rs11572103),

*CYP2C8*3 R139K* (rs11572080), *CYP2C8*3 K399R* (rs10509681), *CYP2C8*4* (rs1058930), *CYP2C9*2* (rs1799853), *CYP2C9*3* (rs1057910), *CYP2C19*2* (rs4244285), *CYP2C19*3* (rs4986893), *CYP2C19*17* (rs12248560), *CYP2D6*2* (rs1135840), *CYP2D6*3* (rs35742686), *CYP2D6*4* (rs3892097), *CYP2D6*6* (rs5030655), *CYP2D6*10* (rs1065852), *CYP2D6*41* (rs28371725), *CYP2E1*5* (rs3813867), *CYP2J2*6* (rs72547598), *CYP2J2*7* (rs890293), *CYP3A4*22* (rs35599367), *CYP3A5*3* (rs776746) and *CYP3A5*6* (rs10264272) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A copy number assay was also performed for *CYP2D6* (Hs04083572_cn) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Genomic DNA was mixed with TaqMan Fast PCR Master Mix and probes of interest. MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) were run on an Applied Biosystems QuantStudio 6 with SNP genotyping settings for 40 cycles, and with copy number variation settings for the *CYP2D6* assay for 40 cycles. Results were analyzed with the QuantStudio 6™ Software version 1.1 (Carlsbad, CA, USA).

Data analysis and regression

Regression analyses were calculated *via* the XCalibur software. Calibration curves were defined as linear and were described by the equation $y=ax+b$. The correct weight was applied ($1/x$) and ($1/x^2$) according to each standard curve established by comparing the peak-area ratios of metabolites with the internal standard.

Statistical analysis

Relative expression levels of CYP450 mRNAs and activities were analyzed by non-parametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis) followed by the Dunn *post-hoc test*. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant. Data analyses for kinetic studies were

performed on GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Enzyme kinetic parameters were determined by non-linear regression analysis using Michaelis-Menten equation. Data was expressed as the mean \pm S.D. for K_m , V_{max} and intrinsic clearance ($CL_{int} = V_{max}/K_m$).

RESULTS

Subject characteristics

Small intestine specimens from 9 individuals were collected over a 13-month period (March 2015 to April 2016). Demographic characteristics for each donor are detailed in Table 1. The mean age of donors was 54 years (range 27-75) and 44% were female donors.

RT-qPCR Analysis

Pie charts illustrating the relative pattern of CYP450 mRNA expressions for different intestinal regions (combined subsections) are presented in Figure 1 (details for each subsection are presented in Supplemental Table 3). Overall, a similar pattern of relative CYP450 mRNA expression was observed along the entire human small intestine. CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2J2 displayed the highest levels of mRNA expression (>5%) in all intestinal sections. CYP4F2, CYP4F12 and CYP3A5 were expressed at intermediate levels (1-5%). CYP1A1, CYP2B6, CYP4A11, CYP1B1, CYP2D6, CYP2E1 and CYP2C8 displayed low levels of mRNA expression (<1%), whereas CYP1A2, CYP2A6 and CYP3A7 were not quantifiable or undetectable in each of the analyzed samples.

Table 2 shows the relative mRNA expression for each CYP450 isoenzyme in order to determine the regional variation along the intestine. Our results indicated that CYP1A1 and CYP2C19 expressions decreased along the human small intestine from the duodenum to the ileum

($P < 0.05$). A similar tendency was observed for CYP2C9, CYP2E1 and CYP4A11 (did not reach statistical significance). On the opposite, an increase in CYP1B1, CYP2B6, CYP2J2 and CYP4F2 mRNA expression levels was observed from the duodenum to the distal part of the jejunum ($P < 0.005$). Overall, mRNA expressions for other CYP450s tended to be constant without any major differences along intestinal sections (CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, and CYP4F12). All data intra- and inter-day variation was less than 4%.

CYP450 polymorphisms

The observed genotype frequency distribution did not show a significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. The *CYP3A5*1* allele which is referred to as wild-type was not found in any subject. No individual carried the duplication or multiplication of the *CYP2D6* gene. No *CYP2C19* loss of function variant alleles (*2 or *3) was found in our study. In contrast, 3 subjects were heterozygous for the *CYP2C19*17* gain of function allele. CYP450 allele frequencies for the investigated SNPs are reported in Table 5.

CYP450 activities along the human small intestine

In vitro CYP450 activities obtained along the entire small human intestine are presented in Table 3 (5 subsections/subject). Our results demonstrated detectable CYP450 activities for all substrates tested. Overall, the extent of drug metabolism by intestinal CYP450s significantly decreased along the small intestine for repaglinide (CYP2C8), tolbutamide (CYP2C9) and S-mephenytoin (CYP2C19) ($P < 0.05$). Although not statistically significant, a similar trend was observed for bupropion (CYP2B6), bufuralolol (CYP2D6), chlorzoxazone (CYP2E1), midazolam (CYP3A4) and lauric acid (CYP4A11). We observed that these activities were the greatest in the proximal part of the jejunum while decreasing along the intestine as follows: proximal jejunum \geq

duodenum ~ mid-jejunum > proximal ileum ~ distal ileum. The lack of statistical significance could be attributed to the wide interindividual variability in drug-metabolizing enzyme activities. The only metabolic pathway that displayed a uniform distribution along the small intestine was CYP2J2 (ebastine). Figure 2 illustrates CYP450-mediated metabolism profiles determined for each individual along the small intestine. The oxidative metabolism of midazolam, ebastine, tolbutamide, chlorzoxazone and bupropion was found in >84% of the intestinal specimens. In contrast, only 40 to 63% of the intestinal specimens exhibited CYP450 activities for S-mephenytoin, bufuralol, repaglinide and lauric acid; levels of CYP-dependent hydroxylation activity for these isoenzymes were generally low or below the limit of quantification (Figure 2).

Extensive CYP3A4 metabolism was observed in the small intestine: formation of 1-hydroxymidazolam was 135 ± 109 pmol/mg protein/min in proximal jejunum (Table 3). The intestinal CYP3A4 activity ranged from 13 to 335 pmol/mg protein/min in proximal jejunum, demonstrating high interindividual variability (Figure 2). Our data showed that the highest 1-hydroxymidazolam formation was found in the proximal jejunum section and decreased slightly in the distal part of the intestine ($P=0.06$). Inhibition study results showed a decrease of $98\% \pm 1\%$ in midazolam hydroxylation in the presence of the CYP3A4 inhibitor ketoconazole (Figure 3). CYP2J2 exhibited the second highest activity and was consistently maintained among the intestinal sections (duodenum to mid-ileum: ranging from 26 to 34 pmol/mg protein/min) (Table 3). An inhibition of $76\% \pm 11\%$ for ebastine metabolism in presence of astemizole confirmed that ebastine metabolism found in the intestine was CYP2J2-mediated (Figure 3). Although CYP2C9 also exhibited a marked intersubject variability, the intestinal hydroxylation of tolbutamide differed significantly along the small intestine sections; maximal activity was present in the proximal part of the intestine and decreased by ~8-fold in the ileum (Figure 2, Table 3). Inhibition

results showed that sulfaphenazole reduced tolbutamide metabolism by $73\% \pm 12\%$, confirming the role of CYP2C9 in intestinal metabolism. Even though hydroxylation of chlorzoxazone was found in the intestine, results from our inhibition study showed that hydroxychlorzoxazone formation was only decreased by $34\% \pm 16\%$ by diethyldithiocarbamate, indicating that other enzymes than CYP2E1 might be involved. Since the level of activity for bupropion was low, qualitative results are reported (Supplemental Figure 1). Use of various inhibitors suggested that more than one isoenzyme is involved in the metabolism of bupropion in human intestine. Overall, CYP450-mediated metabolism exhibited large interindividual variability in the small intestine for all the pathways investigated.

Since jejunum was associated with the greatest drug-metabolism activity, further characterization of CYP450 activities was performed in this part of the small intestine. The estimated *in vitro* kinetic parameters for 6 CYP450s are presented in Table 4. Major drug-metabolizing activities in the intestine were found for CYP3A4, CYP2J2 and CYP2C9. Midazolam (60 and 43 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein/min) and ebastine (57 and 61 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein/min) demonstrated the highest intrinsic clearance values in proximal and mid-jejunum, respectively.

The association between relative CYP450 mRNA expressions and their corresponding CYP450 activities measured in the human small intestine are illustrated in Supplemental Figure 2. The Spearman's correlation analyses indicated that CYP450 mRNA expressions and corresponding CYP450 activities in the human intestine were moderately associated for CYP2C19, CYP2D6 and CYP4A11 ($r_s = 0.44\text{-}0.56$). Other CYP450s displayed a low correlation between expression levels and protein activity.

CYP2C9, CYP2J2 and CYP3A4 activities in relation to genotype are shown in Figure 4. Results observed in subjects carrying the *CYP2C9**3 and *CYP3A4**22 mutations are consistent with decreased function of these variant alleles. In contrast, the variant *CYP2J2**7 allele was associated with an increased function. Due to the limited number of samples analyzed and the low frequency of variant alleles, no statistically significant difference could be found between groups. For other CYP450 probe substrates, the low activity levels prevented us to establish any relationship.

DISCUSSION

Our work showed that the majority of tested CYP genes are expressed in all regions of the human small intestine, except for CYP1A2, CYP2A6 and CYP3A7. As previously reported, CYP3A4 had the highest mRNA expression levels in all human small intestinal subsections, followed by CYP2C9, CYP2C19 and CYP2J2. Although the ranking stayed constant between individuals, we observed an interindividual variability in mRNA expression of 6.1-fold, 4.3-fold, 6.5-fold and 3.5-fold for CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2J2, respectively. In addition, according to our data, the activity was ranked as follows from highest to lowest CYP450 activity: CYP3A4, CYP2J2, CYP2C9, CYP2E1, CYP4A11, CYP2C19, CYP2B6, CYP2D6 and CYP2C8.

Our results corroborated those reported by Paine *et al.*; the most expressed isoenzymes in both their study and ours were CYP3A, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2J2 (Paine et al., 2006). The most expressed CYP450 mRNAs were the same for all our subjects. Gröer *et al.* reported similar data in their study measuring protein expression, with a ranking of CYP3A4>CYP2C9>CYP2C19. Since they did not quantify CYP2J2, it is not possible to compare the protein expression of that isoenzyme with our mRNA data (Groer et al., 2014).

Results showed wide intersubject variability of CYP450 activities in human small intestine; activity levels varied 26-fold for midazolam (CYP3A4), 8-fold for ebastine (CYP2J2) and 62-fold for tolbutamide (CYP2C9). Obach *et al.* reported a variability of 7-fold and 18-fold for CYP3A4 and CYP2C9, respectively (Obach, 2001). However, studies report different values, such as the variability for CYP3A4 activity, which ranges from 7- to 168-fold (Galetin and Houston, 2006). This type of variation between studies for interindividual variability is to be expected considering differences in methodologies as well as different sample types. Metabolic activities associated with CYP2D6 (bufuralol), CYP2C8 (repaglinide), CYP2C19 (S-mephenytoin), CYP2B6 (bupropion) and CYP4A11 (lauric acid) were low or undetectable.

Galetin *et al.* reported a mean activity of 230 pmol/mg protein/min for 1-hydroxymidazolam (CYP3A4), 3 pmol/mg protein/min for 4-hydroxytolbutamide (CYP2C9), 0.7 pmol/mg protein/min for hydroxybufuralol (CYP2D6) and 0.5 pmol/mg/min for 4-hydroxymephenytoin (CYP2C19) (Galetin and Houston, 2006). Our results are in the same range for CYP3A4 activity (mean: 135 pmol/mg protein/min), and slightly higher for CYP2C9 (mean: 13 pmol/mg protein/min) and CYP2C19 (mean: 5.2 pmol/mg protein/min). Moreover, our K_m values were similar to those reported by Galetin *et al.* for human small intestine and liver when the same substrates were used to characterize CYP450 activity (tolbutamide, S-mephenytoin and midazolam) (Galetin and Houston, 2006).

Inhibition studies conducted for CYP2C9, CYP2J2 and CYP3A4/5 substrates confirmed the specificity of their metabolic pathways in human intestine. Other substrates tested (chlorzoxazone and bupropion) showed moderate inhibition during these assays suggesting that non-specific metabolite formation is observed in the intestine for those compounds. The isoenzymes involved in the metabolism of bupropion and chlorzoxazone in the human small

intestine appear to differ from those involved in the human liver (CYP2B6 and CYP2E1, respectively). For instance, inhibition results for bupropion suggest that CYP3A4/CYP2J2 contribute to its metabolism in the small intestine. Incubations performed without NADPH exhibited no metabolite formation, therefore confirming that metabolism was NADPH-dependent (results not shown).

Our data demonstrated a significant relationship between mRNA contents and activities for CYP2C9 ($P=0.004$), CYP2C19 ($P<0.0001$), CYP2D6 ($P<0.0001$), CYP3A4 ($P=0.001$) and CYP4A11 ($P=0.0003$), but no significant correlations were found for the other isoenzyme tested. The aforementioned CYP450s displayed a moderate correlation, whereas CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1 and CYP2J2 exhibited a low degree of correlation between mRNA expressions and metabolic activities. The influence of genetic polymorphisms on the CYP450 activity were not found to be statistically significant for any isoenzyme. This could be attributed to the variability within each genotype group, in addition to the low number of subjects in each group and the low frequency of variant alleles.

The design of our study did not allow us to assess microbiome activity nor to determine the effects of diet components on intestinal enzyme activity, which could also have a significant influence on first-pass metabolism. The intestine was washed with Tris-KCl-EDTA pH 7.4 buffer in order to remove and minimize the potential contribution of microbiome activity. However, the design of our study allowed us to investigate interindividual differences and regional distribution of CYP450 isoenzymes. Our work distinguishes itself from previous studies as it reports data on several subjects, as well as multiple sections from the same donors.

CONCLUSION

This study allows for a better understanding of the role of various regions of the small intestine in the presystemic metabolism of drugs. We showed that significant metabolism takes place in the human intestine for CYP3A4, CYP2J2 and CYP2C9 substrates. We also demonstrated the high interindividual variability related to drug metabolism in the human small intestine.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This work was supported by internal fundings from the CRCHUM, and Faculté de Pharmacie, Université de Montreal. Véronique Michaud is the recipient of a research scholarship from FRQS in partnership with the Institut National d'Excellence en Santé et en Services Sociaux (INESSS). We are grateful to Transplant Québec and to the surgical teams for procedure coordination and tissue collection. We thank Mrs. Fleur Gaudette and the CRCHUM pharmacokinetics Core Facility for technical support and analytical method development. We also thank Mr. François Bélanger for his technical assistance providing support in the qPCR analysis.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no declarations of interest.

REFERENCES

- Doherty MM and Charman WN (2002) The mucosa of the small intestine: How clinically relevant as an organ of drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* 41:235-253.
- El-Kattan A and Varma M (2012) Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability, in: *Topics on Drug Metabolism* (Paxton DJ ed, InTech.
- Galetin A and Houston JB (2006) Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 318:1220-1229.
- Gavhane YN and Yadav AV (2012) Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 20:331-344.
- Groer C, Busch D, Patrzyk M, Beyer K, Busemann A, Heidecke CD, Drozdik M, Siegmund W, and Oswald S (2014) Absolute protein quantification of clinically relevant cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases by mass spectrometry-based targeted proteomics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 100:393-401.
- Kaminsky LS and Zhang QY (2003) The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 31:1520-1525.
- Lin JH, Chiba M, and Baillie TA (1999) Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacological Reviews* 51:135-157.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408.
- Michaud V, Frappier M, Dumas MC, and Turgeon J (2010) Metabolic activity and mRNA levels of human cardiac CYP450s involved in drug metabolism. *PloS one* 5:e15666.

- Obach RSZ, Q.-Y.; Dunbar, D.; Kaminsky, L.S. (2001) Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome P450s. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 29:347-352.
- Ortiz de Montellano PR (2015) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Springer International Publishing, Switzerland.
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, and Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34:880-886.
- Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, and Thummel KE (1997) Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 283:1552-1562.
- Pereira de Sousa I and Bernkop-Schnurch A (2014) Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome it. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 192:301-309.
- Schmittgen TD and Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* 3:1101-1108.
- Temesvari M, Kobori L, Paulik J, Sarvary E, Belic A, and Monostory K (2012) Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 341:294-305.

Varma MV, Obach RS, Rotter C, Miller HR, Chang G, Steyn SJ, El-Kattan A, and Troutman

MD (2010) Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *Journal of medicinal chemistry* 53:1098-1108.

von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, and Kivisto KT (2004)

Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clinical pharmacology and therapeutics* 75:172-183.

Table 1: Demographic characteristics of donors.

Subject	Gender	Age (years)	BMI (kg/m²)	Cause of death	Smoker status	Comorbidities
IN001	M	73	31.3	Cerebral vascular accident	No	Hypertension, hyperlipidemia, diabetes, coronaropathy
IN002	F	49	32.7	Cerebral vascular accident	Yes	Multiple sclerosis, hypertension
IN003	F	75	24.0	Cerebral vascular accident	Yes	Multiple sclerosis, glaucoma
IN004	M	42	25.9	Anoxia	Yes	None
IN005	M	52	23.9	Head trauma	Yes	Hypertension
IN006	M	27	20.5	Anoxia	Yes	None
IN007	F	58	30.1	Cerebral vascular accident	Yes	Hyperthyroidism
IN008	F	49	23.2	Anoxia	No	None
IN009	F	65	30.4	Anoxia	No	Hypertension, diabetes

Table 2: Relative levels of mRNA expression for 17 CYP450 isoenzymes in 10 intestinal subsections ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Results are expressed as mean \pm SD (**P* value <0.05 compared between subsections).

	D1	D2	D3	D4	Proximal jejunum	Mid-jejunum	Distal jejunum	Proximal ileum	Mid-ileum	Distal ileum	<i>P</i> value
CYP1A1	21.0 \pm 51.0	17.0 \pm 41.1	15.8 \pm 39.7	1.0 \pm 2.0	9.8 \pm 25.2	3.7 \pm 10.0	0.7 \pm 1.2	0.5 \pm 0.7	0.05 \pm 0.07	0.2 \pm 0.4	0.03
CYP1A2	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-
CYP1B1	0.7 \pm 0.4	0.6 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.9 \pm 0.7	0.5 \pm 0.2	1.3 \pm 1.0	2.6 \pm 2.2	2.2 \pm 1.7	3.2 \pm 3.1	1.8 \pm 0.9	< 0.0001
CYP2A6	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-
CYP2B6	2.8 \pm 1.3	2.2 \pm 1.1	1.7 \pm 0.9	1.6 \pm 1.0	3.1 \pm 3.7	2.5 \pm 3.6	3.3 \pm 4.4	3.0 \pm 3.1	8.3 \pm 9.3	17.5 \pm 8.9	0.0003
CYP2C8	10.8 \pm 1.3	6.5 \pm 2.3	5.9 \pm 5.2	3.4 \pm 1.5	4.4 \pm 2.2	3.6 \pm 1.4	5.2 \pm 1.8	5.3 \pm 1.4	4.9 \pm 3.6	6.1 \pm 5.1	0.57
CYP2C9	12.2 \pm 4.8	11.8 \pm 5.7	12.1 \pm 5.7	12.1 \pm 5.7	15.4 \pm 7.4	18.0 \pm 14.0	13.2 \pm 8.0	11.1 \pm 4.8	8.5 \pm 7.2	6.8 \pm 3.3	0.09
CYP2C19	7.0 \pm 1.3	6.3 \pm 3.1	6.4 \pm 2.8	6.4 \pm 3.9	7.6 \pm 3.5	8.2 \pm 6.4	5.4 \pm 2.7	4.9 \pm 3.0	4.2 \pm 3.9	3.0 \pm 1.6	0.017
CYP2D6	1.5 \pm 1.2	1.5 \pm 1.2	2.1 \pm 1.9	2.4 \pm 2.5	3.6 \pm 3.8	5.0 \pm 5.5	3.8 \pm 4.4	2.8 \pm 2.1	3.4 \pm 3.9	4.9 \pm 3.5	0.39
CYP2E1	12.4 \pm 12.1	7.9 \pm 10.3	1.7 \pm 1.1	1.6 \pm 0.9	1.5 \pm 1.0	2.4 \pm 1.7	3.2 \pm 2.7	3.0 \pm 2.0	4.0 \pm 3.0	2.4 \pm 1.3	0.29
CYP2J2	1.3 \pm 0.6	1.3 \pm 0.7	1.6 \pm 0.6	1.6 \pm 0.9	2.3 \pm 0.9	2.6 \pm 1.3	3.0 \pm 1.5	3.1 \pm 1.3	2.6 \pm 1.6	2.4 \pm 0.8	0.003
CYP3A4	5.5 \pm 5.2	5.6 \pm 3.7	6.8 \pm 4.9	6.4 \pm 3.9	9.7 \pm 7.5	10.3 \pm 8.8	9.6 \pm 8.0	9.3 \pm 7.0	7.7 \pm 9.3	5.7 \pm 2.7	0.92
CYP3A5	5.1 \pm 4.1	6.1 \pm 4.0	6.1 \pm 3.8	6.0 \pm 4.4	8.9 \pm 7.8	11.1 \pm 12.8	8.8 \pm 9.3	7.3 \pm 4.6	6.5 \pm 7.0	5.8 \pm 3.0	0.96
CYP3A7	NQ	NQ	0.4 \pm 0.8	0.2 \pm 0.5	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	-
CYP4A11	9.5 \pm 6.8	10.0 \pm 7.4	11.1 \pm 8.7	12.6 \pm 10.7	14.9 \pm 14.0	15.8 \pm 17.3	10.7 \pm 12.4	6.6 \pm 7.6	4.2 \pm 6.8	2.8 \pm 2.0	0.15
CYP4F2	1.8 \pm 1.1	1.7 \pm 0.8	1.9 \pm 0.7	2.4 \pm 1.0	3.7 \pm 2.2	4.2 \pm 3.0	4.0 \pm 3.3	3.3 \pm 1.8	3.0 \pm 2.0	3.7 \pm 1.2	0.024
CYP4F12	3.8 \pm 2.6	4.4 \pm 4.1	4.5 \pm 4.0	3.3 \pm 1.9	4.0 \pm 2.6	5.3 \pm 4.5	5.3 \pm 4.5	4.9 \pm 4.0	4.2 \pm 3.8	3.9 \pm 2.2	0.99

D: duodenum (D1 to D4 representing different subsections in the duodenum).

NQ: not quantifiable. ND: not detectable.

Table 3: CYP450 activities measured in 5 different subsections along the human small intestine (n=9). Incubations were performed at substrate saturation.

Probe substrate (CYP enzyme)	Activity (pmol/mg protein/min)										P value
	Duodenum		Proximal jejunum		Mid-jejunum		Proximal ileum		Mid-ileum		
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	
Bupropion→OH-BUP (CYP2B6)	1.4 ± 1.6	0.05 - 4.7	2.2 ± 2.2	0.13 - 7.1	2.0 ± 2.0	0.1 - 5.8	0.7 ± 0.8	0.06 - 2.0	0.9 ± 0.9	0.02 - 2.8	0.21
Repaglinide→OH-REP (CYP2C8)	0.5 ± 0.6	0 - 1.7	1.1 ± 1.2	0 - 2.9	0.8 ± 1.0	0 - 2.6	0.06 ± 0.12	0 - 0.36	0.1 ± 0.3	0 - 0.9	0.016
Tolbutamide→OH+COOH-TOL (CYP2C9)	5.6 ± 5.6	0 - 15	13 ± 12	0.7 - 42	7.8 ± 8.1	1.6 - 27	1.6 ± 1.6	0 - 4.9	1.3 ± 1.1	0 - 2.8	0.004
S-Mephenytoin→4OH-MEP (CYP2C19)	1.8 ± 2.2	0 - 5.7	5.2 ± 5.5	0 - 16	2.7 ± 3.5	0 - 8.7	0	-	0.3 ± 0.8	0 - 2.4	0.004
Bufuralol→OH-BUF (CYP2D6)	0.9 ± 1.0	0 - 2.3	1.5 ± 1.5	0 - 3.8	0.8 ± 1.1	0 - 2.8	0.3 ± 0.5	0 - 1.5	0.8 ± 1.3	0 - 3.9	0.28
Chlorzoxazone→OH-CZX (CYP2E1)	17 ± 20	0 - 51	14 ± 11	1.5 - 33	9.2 ± 9.1	0 - 28	7.4 ± 10.7	0 - 31	5.5 ± 6.4	0 - 16	0.27
Ebastine→OH+COOH EBA (CYP2J2)	26 ± 24	0 - 65	34 ± 30	13 - 110	30 ± 25	4.3 - 90	30 ± 27	0 - 84	28 ± 25	0 - 64	0.98
Midazolam→1-OH-MDZ (CYP3A4)	69 ± 75	1.0 - 213	135 ± 109	13 - 335	106 ± 96	7.5 - 271	34 ± 38	3.7 - 101	45 ± 46	0 - 130	0.06
Lauric acid→OH-Lauric acid (CYP4A11)	2.3 ± 2.8	0 - 7.2	5.9 ± 5.4	0 - 15	4.5 ± 4.9	0 - 14	1.6 ± 2.8	0 - 8.1	1.4 ± 1.8	0 - 4.5	0.13

Table 4: Estimated *in vitro* kinetic parameters for CYP450 probes determined in proximal jejunum and mid-jejunum (n=9).

Probe substrate (CYP enzyme)	Proximal jejunum			Mid-jejunum		
	V _{max} (pmol/mg prot/min)	K _m (μM)	CL _{int} (μL/mg prot/min)	V _{max} (pmol/mg prot/min)	K _m (μM)	CL _{int} (μL/mg prot/min)
Bupropion→OH-BUP (CYP2B6)	5.9 ± 5.6	803 ± 282	0.008 ± 0.007	6.8 ± 5.8	1127 ± 297	0.007 ± 0.006
Repaglinide→OH-REP (CYP2C8)	3.2 ± 2.0	64 ± 3.1	0.05 ± 0.03	3.4 ± 3.1	83 ± 43	0.04 ± 0.03
Tolbutamide→OH+COOH-TOL (CYP2C9)	26 ± 16	277 ± 338	0.2 ± 0.2	17 ± 14	194 ± 173	0.1 ± 0.1
S-Mephenytoin→4-OH-MEP (CYP2C19)	9.1 ± 5.4	29 ± 6.7	0.4 ± 0.3	8.0 ± 2.6	36 ± 10	0.3 ± 0.1
Ebastine→OH+COOH-EBA (CYP2J2)	56 ± 43	1.5 ± 1.2	57 ± 45	48 ± 41	1.2 ± 1.0	61 ± 63
Midazolam→1-OH-MDZ (CYP3A4)	174 ± 135	2.9 ± 1.6	60 ± 38	188 ± 234	3.3 ± 1.9	43 ± 35

Table 5: CYP450 allele frequencies among donors (n=9)

Gene	Allelic variant	Frequency % (n)
<i>CYP2B6</i>	<i>CYP2B6*1</i>	33% (6)
	<i>CYP2B6*4</i>	39% (7)
	<i>CYP2B6*9</i>	28% (5)
	<i>CYP2B6*6 (*4 and *9)</i>	28% (5)
<i>CYP2C8</i>	<i>CYP2C8*1</i>	72% (13)
	<i>CYP2C8*2</i>	0
	<i>CYP2C8*3</i>	28% (5)
	<i>CYP2C8*4</i>	0
<i>CYP2C9</i>	<i>CYP2C9*1</i>	61% (11)
	<i>CYP2C9*2</i>	28% (5)
	<i>CYP2C9*3</i>	11% (2)
<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2C19*1</i>	83% (15)
	<i>CYP2C19*2</i>	0
	<i>CYP2C19*3</i>	0
	<i>CYP2C19*17</i>	17% (3)
<i>CYP2D6</i>	<i>CYP2D6*1</i>	22% (4)
	<i>CYP2D6*2</i>	28% (5)
	<i>CYP2D6*3</i>	6% (1)
	<i>CYP2D6*4</i>	33% (6)
	<i>CYP2D6*5 (del)</i>	0
	<i>CYP2D6*6</i>	0
	<i>CYP2D6*10</i>	0
	<i>CYP2D6*41</i>	11% (2)
	<i>CYP2D6*N</i>	0
<i>CYP2E1</i>	<i>CYP2E1*1</i>	100% (18)
	<i>CYP2E1*5</i>	0
<i>CYP2J2</i>	<i>CYP2J2*1</i>	94% (17)
	<i>CYP2J2*6</i>	0
	<i>CYP2J2*7</i>	6% (1)
<i>CYP3A4</i>	<i>CYP3A4*1</i>	94% (17)
	<i>CYP3A4*22</i>	6% (1)
<i>CYP3A5</i>	<i>CYP3A5*1</i>	0
	<i>CYP3A5*3</i>	100% (18)
	<i>CYP3A5*6</i>	0

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Relative CYP450 mRNAs expression in duodenum, jejunum and ileum. The observed expression pattern of CYP450 mRNAs was similar among duodenum, jejunum and ileum regions with high expression for CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2J2. CYP1A2, CYP2A6 and CYP3A7 were not found in all samples along the small intestine. Others: CYP450s with relative mRNA expression levels less than 1% are regrouped into one group referred as “Others”.

Other CYP450s duodenum: CYP1B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1 and CYP4A11.

Other CYP450s jejunum: CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1 and CYP4A11.

Other CYP450s ileum: CYP1A1, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1 and CYP4A11.

Figure 2. Enzyme activities for CYP450 probe substrates measured in 5 different subsections of human small intestine for each tested individual. Experiments were conducted at saturation for each substrate. Each bar represents individual activity determined in duodenum, proximal and mid-jejunum, as well as proximal and mid-ileum subsections.

Figure 3. Inhibition assays in human small intestine microsomes. *In vitro* inhibition was investigated for CYP2C9, CYP2E1, CYP2J2 and CYP3A4 isoenzymes, which showed a significant degree of activity. Results are presented as the average inhibition percentage from the residual enzymatic activity (SD is used for descriptive error bars).

Figure 4. Intestinal activities according to genotype for pre-specified CYP450 enzymes including CYP2C9, CYP2J2 and CYP3A4. Data measured in the proximal jejunum subsection have been selected since this section was associated with a higher degree of activity that was quantifiable in most samples tested.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGEND

Supplemental Figure 1. *In vitro* inhibition assays of hydroxylation of bupropion in human intestinal microsomes (HIM) and recombinant purified CYP2B6 enzymes. Incubations were performed at saturation for bupropion with 100 μ M orphenadrine, 100 μ M ticlopidine, 50 μ M astemizole and 5 μ M ketoconazole. Results are presented as the average inhibition percentage from the residual enzymatic activity (SD is used for descriptive error bars).

Supplemental Figure 2. Correlation between mRNA and activity levels for CYP450s measured along the small intestine.

Figure 1.

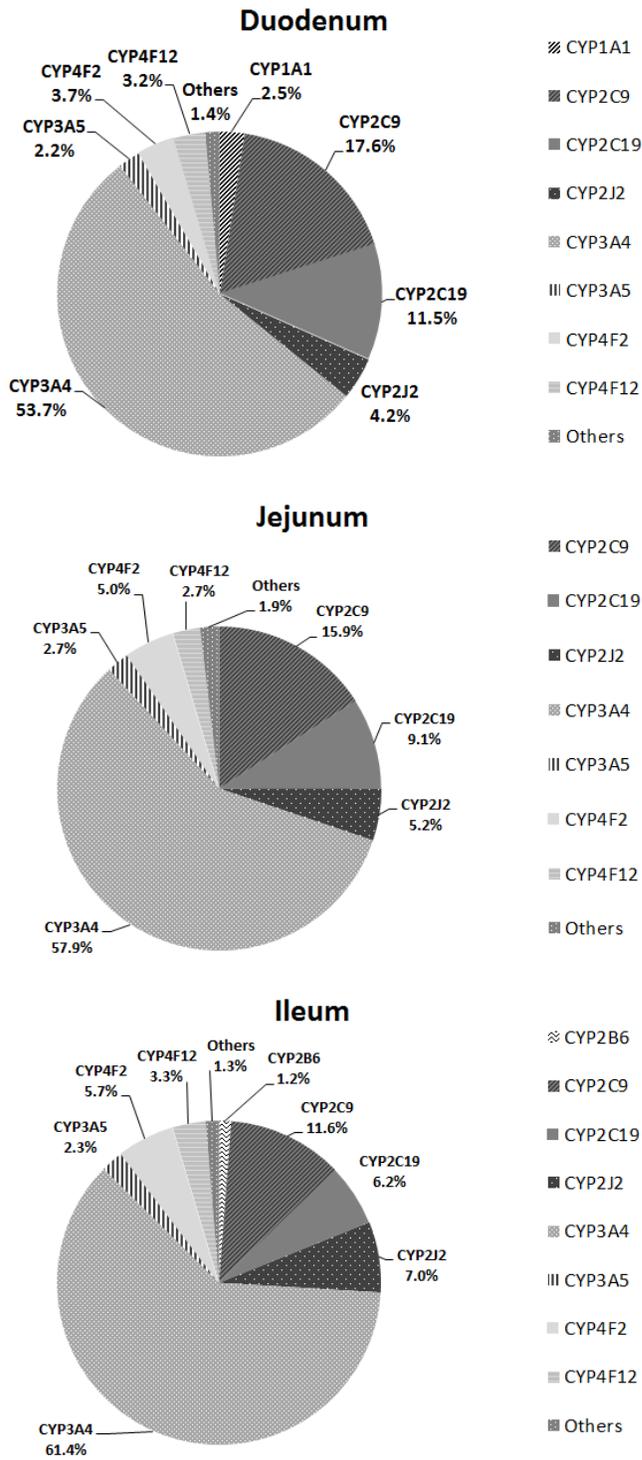


Figure 2.

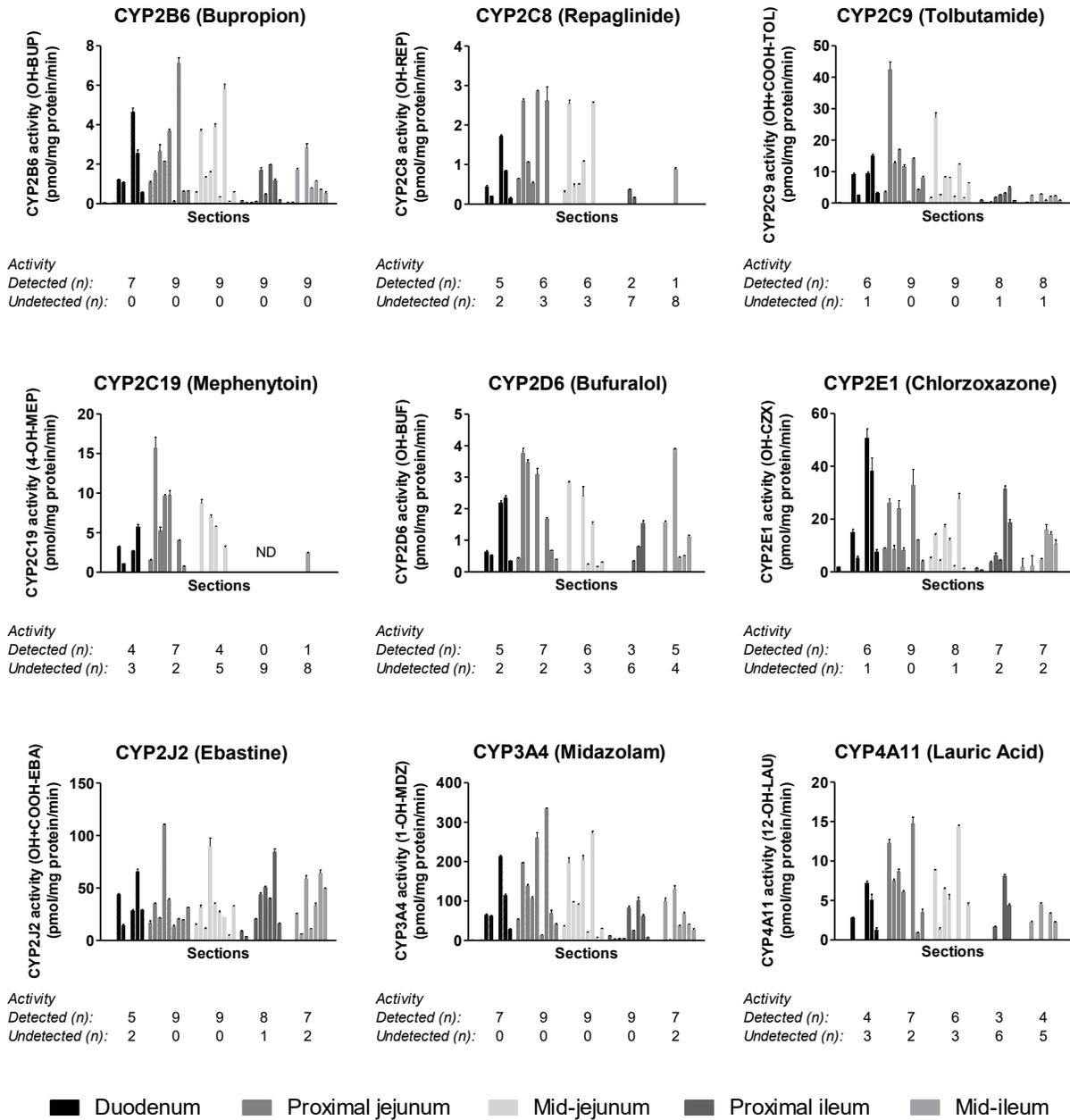


Figure 3.

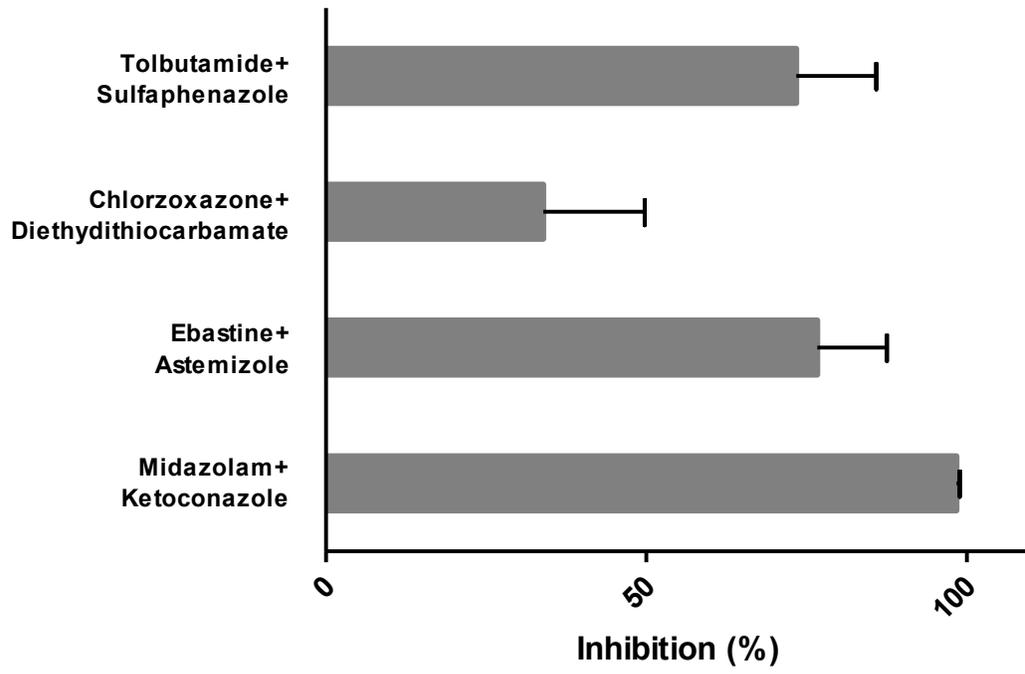
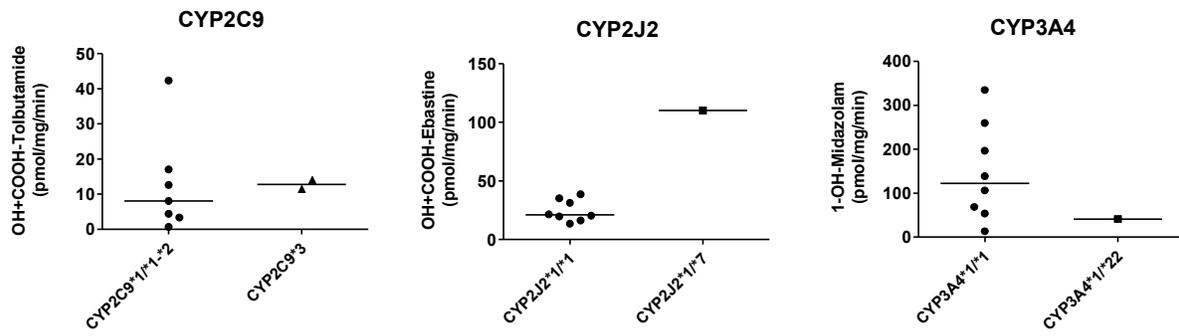


Figure 4.



SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table 1: Details on *in vitro* incubation conditions for each CYP450 probe.

Substrate	CYP450	Incubation buffer	Concentration range (μM)	Volume of microsomes (μL)	Incubation time (minutes)
Bupropion	CYP2B6	100 mM Phosphate pH 7.4	10 to 620	20	30
Repaglinide	CYP2C8	Phosphate buffer pH 7.4	3.4 to 68	25	30
Tolbutamide	CYP2C9	Tris buffer 100 mM pH 7.5	25 to 400	25	30
Mephenytoin	CYP2C19	Phosphate buffer pH 7.4	12.5 to 200	40	45
Bufuralol	CYP2D6	Phosphate buffer pH 7.4	40*	25	45
Chlorzoxazone	CYP2E1	Phosphate buffer pH 7.4	600*	20	30
Ebastine	CYP2J2	Phosphate buffer pH 7.4	0.25 to 5	20	30
Midazolam	CYP3A4	Phosphate buffer pH 7.4	0.25 to 15	20	30
Lauric acid	CYP4A11	Tris buffer pH 7.5	20*	20	30

**Only one concentration was tested for these probe-drugs due to the limited amount of intestinal microsomes available or to the very low level of activity detected.*

Supplemental Table 2: Selected reaction monitoring parameters for each targeted metabolite and its respective internal standard.

CYP450	Metabolite	SRM	Internal Standard	SRM
CYP2B6	Hydroxybupropion	256 → 139	Hydroxybupropion-d ₆	262 → 139
CYP2C8	Hydroxyrepaglinide	469.1 → 246.2	Desalkylebastine-d ₅	273.0 → 172.2
CYP2C9	Hydroxytolbutamide	284.9 → 186.1	Hydroxytolbutamide-d ₉	294.0 → 186.0
CYP2C9	Carboxytolbutamide	298.9 → 200.1	Carboxytolbutamide-d ₉	307.9 → 200.0
CYP2C19	4-Hydroxymephenytoin	235.0 → 133.0	4-Hydroxymephenytoin-d ₃	238.0 → 150.1
CYP2D6	Hydroxybufuralol	278.0 → 186.1	Hydroxybufuralol-d ₉	287.1 → 187.2
CYP2E1	Hydroxychlorzoxazone	284.9 → 186.1	Hydroxychlorzoxazone 15N-d ₂	186.9 → 123.1
CYP2J2	Carebastine	500 → 167	Carebastine-d ₅	505 → 172
CYP2J2	Hydroxyebastine	486 → 167	Hydroxyebastine-d ₅	491 → 172
CYP3A4	1-Hydroxymidazolam	342 → 168	1-Hydroxymidazolam-d ₄	346 → 168
CYP3A4	4-Hydroxymidazolam	342 → 234	4-Hydroxymidazolam-d ₅	347 → 235
CYP4A11	12-Hydroxylauric acid	214.9 → 169.1	12-Hydroxylauric acid-d ₂₀	235.2 → 188.3

Supplemental Table 3: mRNA expression of 17 CYP450 isoenzymes in various small intestine subsections ($2^{-\Delta\text{CT}}$) (n=9 subjects).

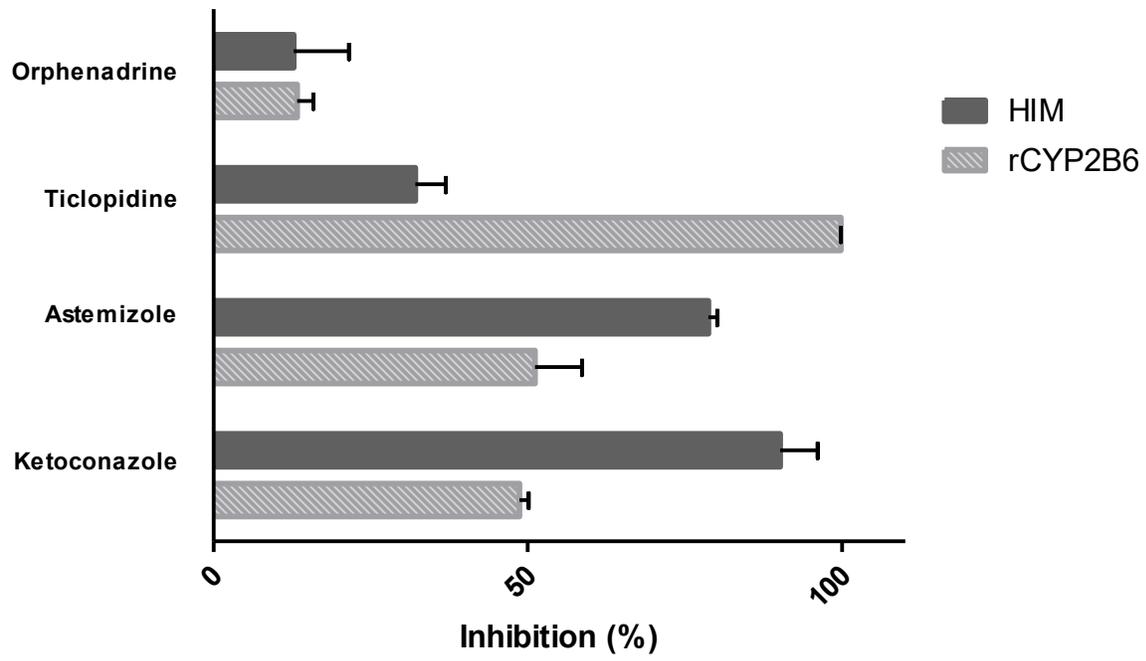
CYP450	D1	D2	D3	D4	Proximal jejunum	Mid-jejunum	Distal jejunum	Proximal ileum	Mid-ileum	Distal ileum
CYP1A1	0.08 ± 0.21	0.07 ± 0.17	0.06 ± 0.16	0.004 ± 0.007	0.04 ± 0.09	0.01 ± 0.04	0.003 ± 0.004	0.002 ± 0.003	0.0003 ± 0.0004	0.001 ± 0.002
CYP1A2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CYP1B1	0.004 ± 0.003	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.002	0.005 ± 0.004	0.003 ± 0.002	0.008 ± 0.006	0.02 ± 0.01	0.013 ± 0.009	0.01 ± 0.01	0.010 ± 0.005
CYP2A6	ND	ND	ND	ND	0.0001 ± 0.0002	0.0002 ± 0.0003	0.0001 ± 0.0002	ND	0.0002 ± 0.0002	0.0002 ± 0.0002
CYP2B6	0.009 ± 0.004	0.006 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.01 ± 0.01	0.008 ± 0.012	0.01 ± 0.01	0.009 ± 0.009	0.04 ± 0.04	0.05 ± 0.02
CYP2C8	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.002	0.003 ± 0.004	0.003 ± 0.004	0.002 ± 0.002	0.004 ± 0.004	0.002 ± 0.002
CYP2C9	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1
CYP2C19	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.12 ± 0.07
CYP2D6	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.003	0.004 ± 0.004	0.006 ± 0.005	0.008 ± 0.007	0.01 ± 0.01	0.008 ± 0.008	0.006 ± 0.004	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02
CYP2E1	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.003	0.002 ± 0.002	0.003 ± 0.002	0.002 ± 0.001
CYP2J2	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.06	0.15 ± 0.06	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.16 ± 0.06
CYP3A4	1.1 ± 1.0	1.1 ± 0.8	1.4 ± 1.1	1.3 ± 0.8	1.9 ± 1.5	2.0 ± 1.8	1.9 ± 1.6	1.9 ± 1.4	1.8 ± 1.8	1.2 ± 0.6
CYP3A5	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.06	0.09 ± 0.09	0.07 ± 0.07	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.03
CYP3A7	ND	ND	0.0002 ± 0.0003	0.0001 ± 0.0001	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.004	ND	ND	0.001 ± 0.003	ND
CYP4A11	0.011 ± 0.009	0.011 ± 0.008	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.009 ± 0.010	0.008 ± 0.009	0.005 ± 0.006	0.003 ± 0.002
CYP4F2	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.11 ± 0.05	0.15 ± 0.08	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.14 ± 0.08	0.15 ± 0.08	0.16 ± 0.06
CYP4F12	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.07	0.08 ± 0.07	0.06 ± 0.04	0.07 ± 0.05	0.10 ± 0.09	0.10 ± 0.09	0.09 ± 0.08	0.09 ± 0.08	0.08 ± 0.05

D: duodenum (D1 to D4 representing 4 different subsection of the duodenum)

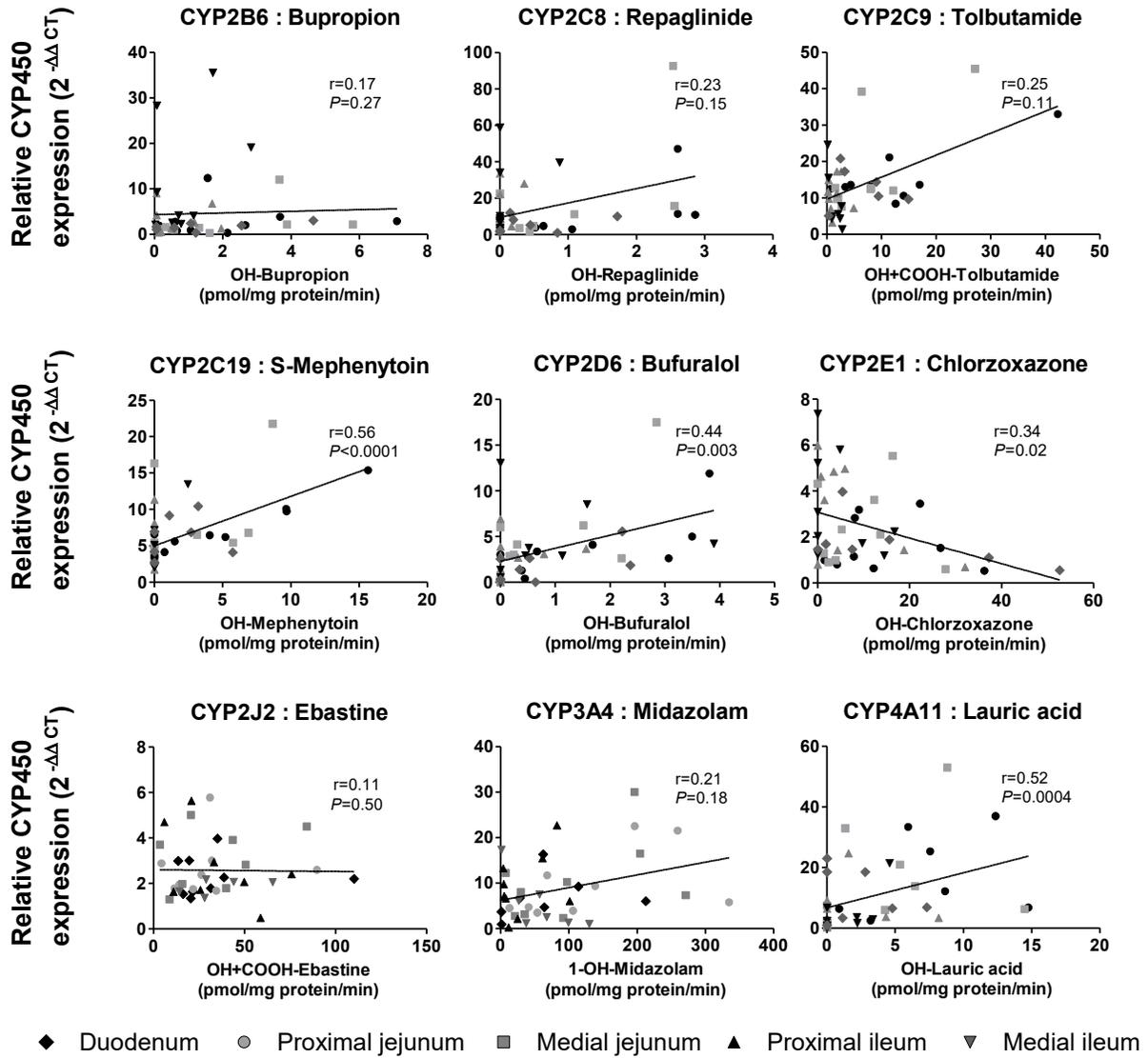
ND: not detectable.

SUPPLEMENTAL FIGURE

Supplemental Figure 1.



Supplemental Figure 2.



CHAPITRE 3- Expression d'ARN messenger des transporteurs

INTRODUCTION

La variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments est une réalité clinique bien connue. En plus des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, les transporteurs membranaires peuvent aussi contribuer à la variabilité observée dans la réponse aux médicaments. Ces transporteurs peuvent avoir un impact particulièrement important au niveau intestinal en facilitant ou en limitant l'absorption d'un composé. De ce fait, l'absorption intestinale de plusieurs composés est influencée par les transporteurs de médicaments.⁹⁶ La présence de ces derniers à la membrane apicale ou basolatérale, ainsi que la direction du transport (influx ou efflux) déterminera partiellement la quantité de médicament qui sera absorbée à partir de l'intestin grêle. Les transporteurs de médicaments et les enzymes de métabolisme fonctionnent souvent en collaboration. Les transporteurs peuvent ainsi affecter la quantité de médicament qui sera disponible aux enzymes de métabolisme présentes dans l'entérocyte et éventuellement dans l'hépatocyte.⁹²

Les transporteurs membranaires de médicaments influencent les concentrations intracellulaires et plasmatiques de plusieurs composés. Puisqu'ils sont sujets à plusieurs interactions médicamenteuses, de nombreuses études ont investigué la présence des transporteurs dans l'intestin grêle humain.⁹¹ Cependant, très peu d'études ont évalué l'expression de ces transporteurs dans plusieurs sections de l'intestin.⁹¹ Une revue de littérature par Shugarts *et al.* rapporte la présence de plusieurs transporteurs dans l'intestin grêle humain, tels que ABCB1, ABCC1-5, ABCG2, ASBT, CNT1-2, ENT1-2, MCT1, OATP1A2, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, OCT1-3, OCTN1-2 et PEPT1-2.⁹²

Dans ce projet de recherche, l'expression d'ARN messenger de différents transporteurs de médicaments a été étudiée au long de l'intestin grêle à titre exploratoire. L'expression différentielle des transporteurs entre les sous-sections intestinales, ainsi que la variabilité interindividuelle de leur expression ont été évaluées. L'expression relative d'ARNm des transporteurs de la famille ABC (ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCG2) et de la famille SLC (OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, OCT1, OCT2, OCTN1, OCTN2, PEPT1, PEPT2) a été déterminée.

MÉTHODES

Spécimens d'intestins humains

Les intestins de 12 individus éligibles au don d'organes ont été obtenus. Les détails concernant la collection des spécimens se trouvent dans le Chapitre 2 (section *Human intestinal specimens*). Il est à noter que 12 sujets ont été inclus dans cette partie de l'étude plutôt que 9, puisque les valeurs des gènes constitutifs (*housekeeping genes*) de ces échantillons se retrouvaient dans un intervalle normal. Ces 3 individus avaient été exclus de l'étude présentée au Chapitre 2, puisqu'ils présentaient une activité catalytique CYP450 non quantifiable ou non détectable, suggérant une dégradation des protéines CYP450. Puisque seul l'ARNm est étudié dans le présent chapitre et que ces valeurs ne semblent pas affectées, ces sujets ont été inclus. Les informations relatives à chaque donneur non mentionné au Chapitre 2 sont disponibles dans le Tableau I du présent chapitre (p.100). Les informations démographiques pour les autres sujets sont présentées dans le *Table 1* du Chapitre 2 (p.77).

Isolation de l'ARN et préparation d'ADNc

Les méthodes utilisées pour cette section sont détaillées dans le Chapitre 2 (section *Isolation of RNA and preparation of cDNA*).

Analyse RT-qPCR

L'expression relative d'ARN messager pour 15 transporteurs membranaires a été déterminée dans 10 sections de l'intestin grêle. Les expériences de PCR quantitatif en temps réel (RT-qPCR) ont été effectuées avec des sondes TaqMan validées provenant de Applied Biosystems (Foster, CA, USA). Les transporteurs évalués étaient les suivants : ABCB1 (Hs00184491_m1), ABCC1 (Hs01561502_m1), ABCC2 (Hs00166123_m1), ABCC3 (Hs00978473_m1), ABCC4 (Hs00988717_m1), ABCG2 (Hs01053790_m1), OATP1A2 (Hs00245360_m1), OATP1B1 (Hs00272374_m1), OATP1B3 (Hs00251986_m1), OATP2B1 (Hs01030343_m1), OCT1 (Hs00231250_m1), OCT2 (Hs00231269_m1), PEPT1 (Hs00192639_m1) et PEPT2 (Hs00113665_m1). Les gènes RPLPO (Hs99999902_m1) et RPS9 (Hs02339424_g1) ont été validés et utilisés comme gènes constitutifs (*housekeeping genes*).

Le protocole utilisé pour les expériences est indiqué dans le Chapitre 2 (section *RT-qPCR Analysis*).

Analyse statistique

Les résultats de l'expression relative d'ARNm des transporteurs ont été comparés au moyen du test statistique Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaison multiple *post-hoc* Dunn. Une valeur $P < 0.05$ était considérée statistiquement significative. La quantification de l'expression relative des gènes a été calculée avec la formule $2^{-\Delta CT}$.⁹⁸ Les valeurs de $CT \leq 35$ ont été incluses dans

les analyses. Lorsque les valeurs de CT étaient entre 35 et 38, elles étaient jugées non quantifiable (NQ), puisqu'une grande variabilité est associée à ces valeurs. Les CT>38 étaient considérés non détectables (ND). Afin de pouvoir comparer l'expression d'un transporteur entre les sections, le $2^{-\Delta\Delta CT}$ a été calculé avec le calibrateur présenté au Chapitre 2.^{98,99}

RÉSULTATS

L'expression relative d'ARNm des transporteurs pour différentes sections intestinales est illustrée dans la Figure 1 (p.103). Ces graphiques montrent le patron d'expression d'ARNm relatif pour le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Les détails de $2^{-\Delta CT}$ pour chacune des 10 sections sont présentés dans le Tableau II (p.101). Les transporteurs les plus exprimés au long de l'intestin étaient PEPT1>ABCB1>ABCC3~ABCG2. À l'inverse, parmi les transporteurs les moins exprimés au long de l'intestin grêle, on retrouve PEPT2, OCTN1 et OCT2. Ces derniers représentent en moyenne moins de 1% de l'expression relative intestinale des transporteurs étudiés. Les niveaux d'expression intestinale d'ARNm pour les transporteurs OATP1A2, OATP1B1 et OATP1B3 étaient très faibles ou non détectables.

Le Tableau III (p.102) présente les valeurs $2^{-\Delta\Delta CT}$ associées à chacun des transporteurs afin de déterminer si leur expression varie entre les différentes sous-sections intestinales. L'expression d'ARNm des transporteurs suivants avait tendance à augmenter de la partie proximale à la partie distale de l'intestin grêle : ABCB1 (différence de 8,4 fois entre les sections, $P<0,0001$), ABCC1 (2,4 fois, $P=0,002$), ABCG2 (4,9 fois, $P=0,002$), OCT1 (2,2 fois, $P=0,03$) et OCTN1 (6,3 fois, $P=0,0001$). Par contre, l'expression d'ARNm du transporteur PEPT2 avait tendance à diminuer du duodénum vers l'iléon (différence de 2,8 fois entre les sections, tendance décroissante non significative $P=0,08$). L'expression d'ARNm pour les transporteurs ABCC2, ABCC3, ABCC4,

OATP2B1, OCT2, OCTN2 et PEPT1 était relativement constante au long de l'intestin grêle. Aucune différence significative dans leur niveau d'expression n'a été détectée entre les différentes sous-sections intestinales testées.

DISCUSSION

Nos résultats montrent que le patron d'expression des transporteurs les plus exprimés au long de l'intestin grêle était PEPT1>ABCB1>ABCC3~ABCG2. Dans toutes les sections intestinales étudiées, PEPT1 était le plus exprimé et montrait une variabilité interindividuelle dans son niveau d'expression de 6,2 fois en moyenne. Les transporteurs ABCB1, ABCC3 et ABCG2 présentaient des variations interindividuelles moyennes de 9 fois, 3,8 fois et 8,7 fois, respectivement dans toutes les sections. Certains des transporteurs ABC (ABCB1, ABCC1, ABCG2) et SLC (OCT1, OCTN1) étaient exprimés plus fortement en section distale qu'en section proximale de l'intestin grêle.

Les patrons d'expression de transporteurs retrouvés dans la littérature pour l'intestin sont discordants entre les études. Ces différences pourraient être attribuées à l'expression régionale et variable des transporteurs, compliquant la comparaison des valeurs répertoriées. Tucker *et al.* mentionnent que les disparités entre les études sont vraisemblablement causées par les différentes sections (duodénum, jéjunum et iléon) et mesures utilisées (ARNm et protéine) dans chaque projet.¹⁰⁰ La forte expression du transporteur PEPT1 dans l'intestin grêle humain est cependant commune à notre étude, aux études d'expression d'ARNm de Meier *et al.*, Hilgendorf *et al.* et Seithel *et al.*, ainsi qu'aux études protéomiques de Drozdik *et al.* et Gröer *et al.*^{91, 95, 101-103} Les études de Gröer *et al.* et Seithel *et al.* rapportent toutes les deux un patron d'expression similaire pour les transporteurs les plus exprimés : PEPT1, ABCC2, ABCB1, ABCG2, ABCC3.^{95, 103} Les

résultats d'expression d'ARNm de Seithel *et al.* se rapprochent le plus des nôtres, à l'exception de ABCC2, avec le classement suivant : PEPT1>ABCC2>ABCB1>ABCG2>ABCC3>OCTN2>OATP2B1>OCT1.⁹⁵ ABCC2 était le deuxième transporteur le plus exprimé dans plusieurs études (Drozdik *et al.*, Gröer *et al.*, Seithel *et al.*).^{91, 95, 103} Cependant, cela n'a pas été le cas dans notre étude, où ABCC2 était moins exprimé, représentant entre 3,9% et 6,7% de l'expression totale dans l'intestin grêle.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons démontré que l'expression des transporteurs varie au long de l'intestin et que les transporteurs les plus exprimés sont PEPT1, ABCB1, ABCC3 et ABCG2. Des études futures évaluant l'expression protéique absolue des transporteurs, ainsi que leur activité au long de l'intestin permettront une meilleure caractérisation de l'impact du transport intestinal sur l'absorption des médicaments administrés par voie orale.

Tableau I : Caractéristiques démographiques des donneurs

Sujet	Sexe	Âge (années)	IMC (kg/m ²)	Cause du décès	Fumeur	Comorbidités
IN010	F	53	34,0	Accident vasculaire cérébral	Oui	Asthme
IN011	M	15	27,1	Trauma crânien	Oui	Aucune
IN012	M	42	26,1	Trauma crânien	Oui	Aucune

Tableau II : Expression d'ARNm de 15 transporteurs membranaires du duodénum à l'iléon (2^{-ΔCT}) (n=12)

	D1	D2	D3	D4	Jéjunum proximal	Jéjunum médial	Jéjunum distal	Iléon proximal	Iléon médial	Iléon distal
ABCB1	0.08 ± 0.05	0.08 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2
ABCC1	0.012 ± 0.005	0.012 ± 0.004	0.013 ± 0.003	0.012 ± 0.005	0.011 ± 0.004	0.015 ± 0.007	0.018 ± 0.008	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
ABCC2	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.06 ± 0.06	0.07 ± 0.07	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.03 ± 0.02
ABCC3	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.05	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.07 ± 0.02
ABCC4	0.010 ± 0.005	0.009 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.008 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.012 ± 0.006	0.014 ± 0.006	0.013 ± 0.007	0.02 ± 0.01	0.012 ± 0.005
ABCG2	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.04	0.09 ± 0.07	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.12 ± 0.06
OATP1A2	0.0003 ± 0.0005	0.0002 ± 0.0003	ND	0.0002 ± 0.0003	0.0001 ± 0.0003	0.0002 ± 0.0002	0.0004 ± 0.0005	0.0005 ± 0.0005	0.0002 ± 0.0003	0.0003 ± 0.0003
OATP1B1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OATP1B3	0.0003 ± 0.0004	0.0002 ± 0.0002	0.0001 ± 0.0002	0.0003 ± 0.0005	0.0002 ± 0.0004	0.0001 ± 0.0002	0.0001 ± 0.0002	0.0003 ± 0.0003	0.0004 ± 0.0004	0.0009 ± 0.0006
OATP2B1	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.02
OCT.1	0.009 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.003	0.010 ± 0.004	0.011 ± 0.005	0.01 ± 0.01	0.014 ± 0.006	0.015 ± 0.007	0.014 ± 0.005
OCT.2	0.002 ± 0.002	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.003
OCTN1	0.005 ± 0.005	0.006 ± 0.009	0.005 ± 0.006	0.003 ± 0.002	0.006 ± 0.003	0.007 ± 0.006	0.008 ± 0.007	0.008 ± 0.005	0.01 ± 0.01	0.014 ± 0.006
OCTN2	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02
PEPT1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.1
PEPT2	0.006 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.004 ± 0.002	0.005 ± 0.006	0.004 ± 0.002	0.004 ± 0.002	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.002

ND: non détectable.

Tableau III : Expression relative d'ARNm de 15 transporteurs membranaires du duodénum à l'iléon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (n=12)

	D1	D2	D3	D4	Jéjunum proximal	Jéjunum médial	Jéjunum distal	Iléon proximal	Iléon médial	Iléon distal	Valeur P
ABCB1	1.6 ± 1.3	1.6 ± 0.9	2.0 ± 1.1	2.0 ± 0.8	2.7 ± 1.8	3.6 ± 2.5	3.9 ± 2.9	4.2 ± 2.5	5.7 ± 3.9	6.1 ± 2.7	<0.0001
ABCC1	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.5	1.0 ± 0.5	1.3 ± 0.6	1.2 ± 0.4	0.002
ABCC2	1.7 ± 1.4	2.2 ± 1.4	2.5 ± 1.4	3.0 ± 2.4	5.0 ± 5.8	6.2 ± 5.8	5.5 ± 4.8	4.9 ± 4.5	4.2 ± 3.6	2.7 ± 1.7	0.11
ABCC3	2.2 ± 0.7	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.6	2.0 ± 0.7	2.2 ± 1.0	2.5 ± 1.4	1.9 ± 0.9	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.8	2.1 ± 0.6	0.26
ABCC4	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.06
ABCG2	1.0 ± 0.6	1.1 ± 0.7	1.2 ± 0.8	1.4 ± 1.1	2.1 ± 1.5	2.5 ± 1.9	2.8 ± 2.3	2.8 ± 2.1	3.1 ± 2.3	2.8 ± 1.2	0.002
OATP1A2	0.8 ± 1.2	0.5 ± 0.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OATP1B1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OATP1B3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OATP2B1	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.6	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.5	1.1 ± 0.7	1.0 ± 0.4	0.31
OCT.1	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.7	1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.7	1.8 ± 0.8	1.5 ± 0.5	0.03
OCT.2	0.9 ± 0.7	0.8 ± 0.5	0.9 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.6	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.6	1.0 ± 0.6	1.6 ± 1.4	0.71
OCTN1	1.8 ± 2.1	2.5 ± 3.5	2.0 ± 2.2	1.7 ± 1.3	1.9 ± 1.2	2.2 ± 2.1	2.9 ± 2.6	2.9 ± 1.8	4.2 ± 3.1	5.0 ± 2.5	0.0001
OCTN2	2.4 ± 1.9	3.0 ± 3.3	2.5 ± 2.2	2.0 ± 0.7	2.4 ± 1.1	2.2 ± 1.6	2.5 ± 1.4	2.4 ± 1.0	2.3 ± 1.2	2.4 ± 0.8	0.97
PEPT1	4.5 ± 3.3	4.1 ± 2.2	4.4 ± 2.7	4.3 ± 1.9	6.0 ± 3.5	5.8 ± 4.7	5.7 ± 4.2	5.4 ± 3.6	6.0 ± 4.7	5.7 ± 2.3	0.63
PEPT2	7.8 ± 3.8	5.9 ± 2.6	5.8 ± 2.6	5.0 ± 2.7	4.8 ± 2.4	3.7 ± 2.0	4.6 ± 2.1	4.4 ± 1.7	3.8 ± 1.4	3.7 ± 1.6	0.08

ND: non détectable.

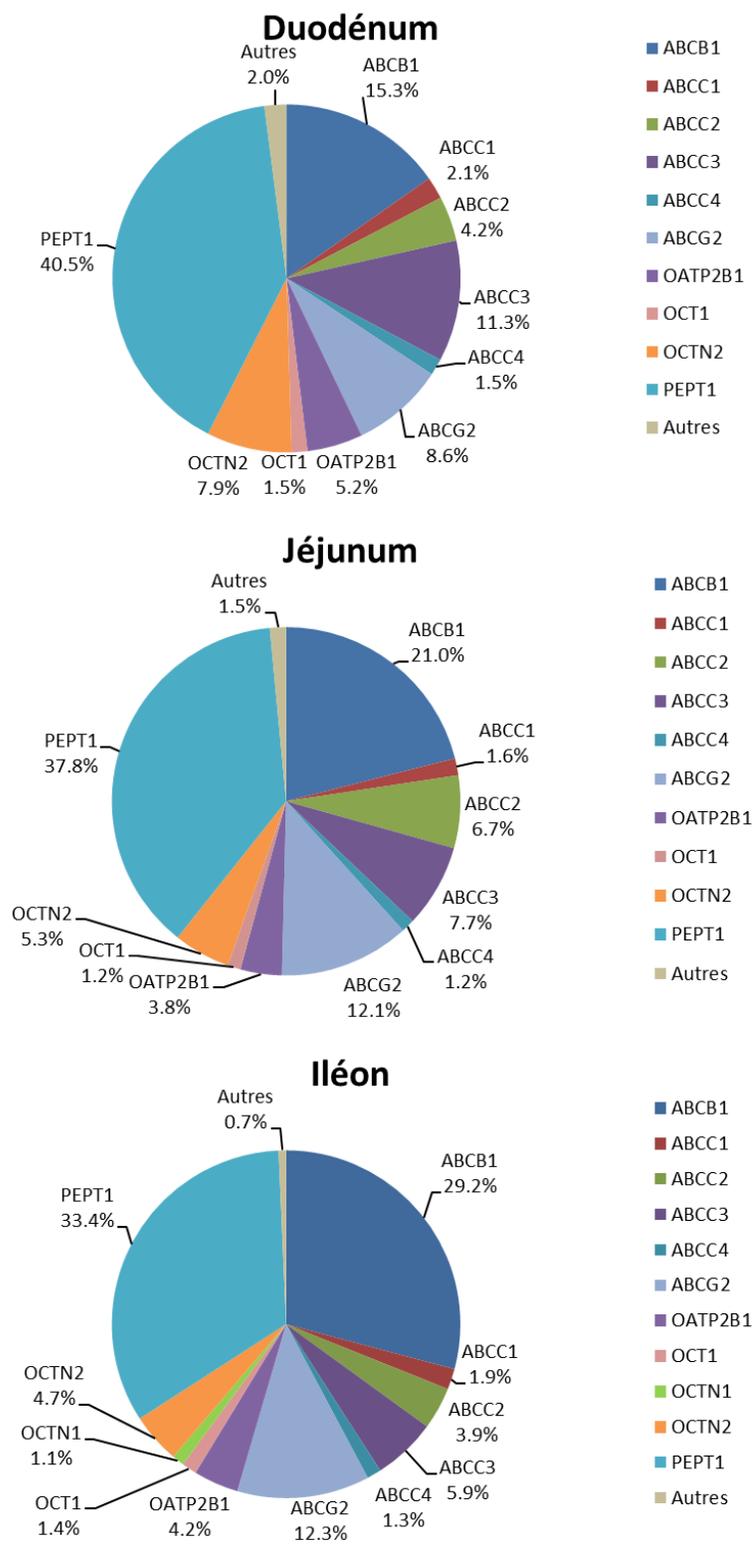


Figure 1 : Patron d'expression d'ARNm des transporteurs dans l'intestin grêle. Autres : OCT2, OCTN1 (duodénum et jéjunum) et PEPT2. OATP1A2, OATP1B1 et OATP1B3 n'étaient pas exprimés dans aucune des sections.

CHAPITRE 4- Discussion et conclusion

1. Discussion générale

1.1 ARN messenger

Les résultats d'expression d'ARN messenger obtenus dans notre étude sont cohérents avec ceux de la littérature concernant l'intestin grêle humain. L'étude de Bièche *et al.*, effectuée dans un *pool* de jéjunum et iléon provenant de 5 sujets, a rapporté le patron d'expression suivant : CYP3A4>CYP3A5>CYP2J2>CYP2C19>CYP2C9.¹⁰⁴ Les isoenzymes CYP450 les plus exprimées dans nos échantillons étaient les mêmes, malgré le fait qu'elles n'étaient pas classées dans le même ordre (CYP3A4>>CYP2C9>CYP2C19>CYP2J2>>CYP3A5). Étant donné l'expression régionale des CYP450, cette différence de classement peut s'expliquer par l'utilisation d'un *pool* dans leur étude, comparativement à des sections distinctes dans la nôtre.

Les données obtenues par RT-qPCR ont également permis de noter plusieurs tendances au niveau de l'expression d'ARN messenger des isoenzymes CYP450. Malgré la présence d'une importante variabilité interindividuelle, les CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2J2 étaient les plus exprimés dans tous les spécimens testés. Les CYP4F2, CYP4F12 et CYP3A5 étaient exprimés à un niveau intermédiaire et représentaient entre 1 et 5% du contenu total en CYP450 des échantillons. Les autres CYP450 testés étaient soit faiblement exprimés (<1%), non quantifiables ou non détectables (Figure 1 du Chapitre 2, p.84). Nos résultats de RT-qPCR ont démontré que les isoformes CYP1B1, CYP2B6, CYP2J2 et CYP4F2 augmentent significativement vers les sections distales. À l'inverse, les CYP1A1 et CYP2C19 diminuent de manière significative au long de l'intestin grêle. L'expression des isoenzymes CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5 et CYP4F12 reste constante dans les différentes sections (*Table 2* du Chapitre 2, p.78).

1.2 Protéines

Des méthodes de quantification absolue (AQUA) de protéines par LC-MS/MS sont présentement en cours de développement dans notre laboratoire afin d'étudier le niveau d'expression protéique de diverses isoenzymes du CYP450. La méthode AQUA permet la quantification des protéines en mesurant des peptides spécifiques obtenus par digestion avec la trypsine. Des peptides radiomarqués sont utilisés comme standard interne. L'analyse protéomique permet une quantification plus précise et reproductible que les méthodes traditionnelles telles que le Western Blot et l'immunohistochimie quantitative.¹⁰⁵ Ces données permettront d'enrichir nos analyses et d'effectuer des corrélations ARNm-protéine, ainsi que protéine-activité.

Nos résultats de RT-qPCR s'approchent davantage de ceux obtenus par deux études mesurant l'expression protéique.^{21, 105} Paine *et al.* ont mesuré par Western Blot l'expression protéique des isoenzymes CYP450 dans les microsomes provenant de la section proximale (duodénum et jéjunum proximal) de l'intestin grêle de 31 sujets.²¹ Ils ont rapporté un patron d'expression protéique CYP3A>CYP2C9>CYP2C19>CYP2J2>CYP2D6, ainsi qu'une importante variabilité interindividuelle.²¹ Dans leurs échantillons, les CYP3A et CYP2C9 représentaient environ 80% et 15% de l'expression de CYP450 intestinale, respectivement, alors qu'ils représentaient entre 54-61% et 12-18% dans notre étude.²¹ Ces différences peuvent être expliquées par la quantification d'isoenzymes supplémentaires dans notre étude, notamment les CYP4F2 et CYP4F12, représentant collectivement 7-8% des CYP450 intestinaux. Leurs données montrent également une expression faible ou indétectable des CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8 et CYP2E1.²¹ Ces résultats sont en accord avec les nôtres, puisque nous n'avons pas détecté d'expression d'ARNm pour les CYP1A2 et CYP2A6. Les CYP2B6, CYP2C8 et CYP2E1 étaient faiblement exprimés. L'étude protéomique de Gröer *et al.* est en accord avec le patron

d'expression d'ARNm des CYP450 déterminé dans notre étude (CYP3A4>CYP2C9>CYP2C19).¹⁰⁵

En résumé, le classement général des isoenzymes les plus exprimées au niveau intestinal dans les études de Paine *et al.* (2006), Gröer *et al.* (2014) et Miyauchi *et al.* (2016) était CYP3A4>CYP2C9>CYP2C19>CYP2J2 et les isoenzymes CYP2B6, CYP2C8 et CYP2E1 étaient non détectées.^{21, 105, 106} L'étude de Gröer *et al.* a également décelé une grande variabilité dans l'expression protéique du CYP2D6.¹⁰⁵

1.3 Activité des isoenzymes CYP450

Notre étude a démontré une activité plus élevée pour les CYP3A4 (V_{\max} = 9,4–598 pmol/mg protéine/min), CYP2J2 (V_{\max} = 5,2–154 pmol/mg protéine/min) et CYP2C9 (V_{\max} = 4,4–64 pmol/mg protéine/min). Nous avons également noté une variabilité de 26 fois dans l'activité du CYP3A4, 8 fois pour le CYP2J2 et 62 fois pour le CYP2C9. Similairement, Obach *et al.* avaient rapporté une variabilité de 7 fois dans l'activité du CYP3A4 (n=10),¹⁷ tandis que Galetin *et al.* ont décelé une variabilité entre 7 et 168 fois dans le métabolisme médié par le CYP3A4 (substrats : midazolam, testostérone et vérapamil).²² Une variabilité interindividuelle de plus de 20 fois a également été observée dans leur étude pour le métabolisme médié par le CYP2C9.²²

Nos résultats ont montré une diminution significative de l'activité au long de l'intestin pour les substrats associés à l'activité des CYP2C8, CYP2C9 et CYP2C19. Seule une tendance descendante a pu être observée pour les CYP2B6, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 et CYP4A11 à cause de la présence d'une grande variabilité interindividuelle. Les activités les plus élevées se trouvaient dans les sections proximales : jéjunum proximal \geq duodénum \sim jéjunum médial > iléon proximal \sim iléon médial (Figure 2 et Table 3 du Chapitre 2, p.85 et p.79). Le CYP2J2 était la seule

isoenzyme investiguée à démontrer une activité constante au long de l'intestin grêle humain, une observation corroborée par l'étude de Zeldin *et al.*¹⁰⁷ Les isoenzymes ayant les plus hautes activités dans notre étude sont les CYP3A4 (midazolam), CYP2J2 (ébastine) et CYP2C9 (tolbutamide).

La formation du 1'-hydroxymidazolam (CYP3A4) mesurée dans notre étude se trouve dans le même ordre de grandeur que celui de Galetin *et al.*, tandis que le métabolisme du tolbutamide (CYP2C9) est 7 fois plus élevé dans nos échantillons et celui de la S-méphénytoïne (CYP2C19) y est 17 fois plus élevé.²² Comme l'étude de Galetin *et al.* utilise un *pool* de l'intestin grêle entier provenant de 10 donneurs, il est raisonnable de supposer que nos activités plus élevées seraient dues à la diminution de l'activité en section distale que Galetin *et al.* ne pouvaient pas discerner.²² Nos valeurs de V_{\max} pour la formation de la 4-hydroxyméphénytoïne se retrouvent dans le haut de l'intervalle rapporté par Obach *et al.*¹⁷ Comme ils ont obtenu l'intestin grêle de 10 donneurs et l'ont séparé en 6 sections pour ensuite isoler les entérocytes par élution, ils ont été en mesure d'obtenir un profil complet du métabolisme de la S-méphénytoïne, tel qu'est le cas pour notre étude.¹⁷

Les écarts entre les valeurs de V_{\max} pour les différentes études pourraient être expliqués par la méthode d'extraction des microsomes (élution ou grattage de la muqueuse), ainsi que par l'utilisation de toute la longueur de l'intestin grêle, comparativement à l'utilisation de sections distinctes. Comme l'activité de certains CYP450 tend à diminuer dans les sections distales, la préparation de microsomes avec la longueur totale pourrait résulter en une activité moyenne moindre que celle qui serait observée dans la section proximale seulement.

Nos valeurs de K_m se retrouvent dans un intervalle de ± 2 fois les valeurs rapportées pour le foie lorsque les mêmes substrats-marqueurs étaient utilisés (tolbutamide, S-méphénytoïne et

midazolam). Les valeurs de K_m hépatiques rapportées dans la littérature et les valeurs de K_m intestinales obtenues dans notre étude sont présentées dans le Tableau I. Galetin *et al.* ont observé une variation de ± 2 fois entre les valeurs de K_m hépatiques et intestinaux, ce qui se retrouve au même niveau que les différences dans notre étude.²² Puisque le CYP2J2 est considéré comme une isoenzyme extrahépatique, les valeurs de K_m dans les HLM ne seront pas présentées pour l'ébastine. Cependant, un K_m moyen de 2,6 μM a été obtenu par Hashizume *et al.* dans les microsomes d'intestin humain.⁷⁴

Tableau I : Valeurs de K_m hépatiques (HLM) retrouvées dans la littérature et valeurs de K_m intestinales de notre étude

Substrat (Enzyme)	K_m HLM* (μM)	K_m HIM (μM)
Tolbutamide (CYP2C9)	~240	179
S-Méphénytoïne (CYP2C19)	~40	31
Midazolam (CYP3A4)	~2,5	3,3

* Les valeurs de K_m présentées proviennent des études de Walsky *et al.* (2004), Galetin *et al.* (2006) et Gao *et al.* (2016).

Deux méthodes d'extraction des entérocytes sont mentionnées dans la littérature pour la préparation des microsomes. La méthode de grattage de la muqueuse est très utilisée, mais comporte quelques lacunes. En effet, cette méthode résulte en un mélange de cellules provenant des villosités et des cryptes, réduisant ainsi l'activité (V_{\max}) en diluant la concentration de CYP450.^{22, 108, 109} La méthode d'élution s'effectue à l'aide de divers composés chimiques permettant d'obtenir une isolation spécifique des entérocytes. L'activité résultante est plus élevée que celle associée au grattage de la muqueuse, puisque seuls les entérocytes sont utilisés.^{22, 110} Cependant, la méthode de grattage reste le meilleur choix pour cette étude, puisque la conservation des échantillons ne permettait pas d'assurer l'intégrité des cellules résultantes lors de la méthode d'élution.

La réalisation d'incubations contrôles sans NADPH pour chaque expérience confirme que l'activité observée est NADPH-dépendante. Nous avons effectué des tests d'inhibition afin de confirmer la spécificité des voies métaboliques étudiées (Figure 3 du Chapitre 2, p.86). Les tests d'inhibition ont été concluants pour les voies métaboliques associées aux CYP2C9 (73% d'inhibition avec sulfaphénazole), CYP2J2 (76% d'inhibition avec astémizole) et CYP3A4 (98% d'inhibition avec kétoconazole). Seule une faible inhibition (34%) de la formation de la 6-hydroxychlorzoxazone a été obtenue lors de la co-incubation avec l'inhibiteur diéthylthiocarbamate spécifique au CYP2E1. Il serait possible que d'autres isoenzymes soient impliquées dans le métabolisme de la chlorzoxazone, telles que les CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6 et CYP3A4.¹¹¹ Comme le CYP3A4 est la forme majoritaire retrouvée dans l'intestin, il est possible de supposer que le métabolisme intestinal de la chlorzoxazone pourrait être médié par le CYP3A4. Cependant, puisque les tests cinétiques avec cette isoenzyme étaient limités par la solubilité du substrat, il est impossible de comparer une valeur de K_m avec celles retrouvées dans la littérature pour diverses isoenzymes recombinantes. La formation d'hydroxybupropion dans l'intestin s'est montrée non spécifique au CYP2B6. En effet, nos tests d'inhibitions avec la ticlopidine (inhibiteur CYP2B6) ont montré une diminution de la formation de ce métabolite de 32% et 99% dans les microsomes d'intestin et dans les enzymes recombinantes CYP2B6, respectivement. À l'opposé, les incubations avec l'astémizole (inhibiteur CYP2J2) et le kétoconazole (inhibiteur CYP3A4) ont diminué l'activité de 79% et 90% dans les microsomes d'intestin, respectivement (*Supplemental Figure 1*, Chapitre 2, p.91). Cela suggère que les voies de métabolisme significatives pourraient différer entre le foie et l'intestin. Les CYP2J2 et CYP3A4 seraient potentiellement impliqués dans le métabolisme intestinal du bupropion, tandis que le CYP2B6 catalyserait majoritairement cette réaction dans le foie.

1.4 Corrélations ARN messenger, activité et génotype des CYP450

Des tests statistiques de corrélation de Spearman entre l'ARN messenger et l'activité des CYP450 ont été effectués (*Supplemental Figure 2*, Chapitre 2, p.92). Les CYP2C19, CYP2D6 et CYP4A11 ont démontré une corrélation modérée entre l'expression d'ARN messenger et l'activité associée (r_s 0,40-0,59). Les CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 corrélaient faiblement (r_s 0,20-0,39), tandis qu'une corrélation très faible résultait des données obtenues pour les CYP2B6 et CYP2J2 ($r_s < 0,19$). Il a été rapporté dans la littérature que les corrélations ARNm-activité ne sont pas toujours concluantes, puisque de nombreux facteurs, tels que les polymorphismes génétiques, les modifications post-transcriptionnelles, translationnelles et la dégradation des protéines entrent en ligne de compte.^{56, 112}

Des tests *t* ont été réalisés afin d'étudier les différences associées au génotype pour l'activité et l'expression d'ARNm des CYP450 (Figure 4 du Chapitre 2 et Figure 1 de l'Annexe 1, p.87 et p.ii). Les tests statistiques n'ont pas pu déceler une différence significative entre les groupes pour les variants génétiques de chacune des isoenzymes. Cela peut s'expliquer par le nombre restreint de patients associé à chaque génotype, ainsi que par l'importante variabilité interindividuelle à l'intérieur même des groupes. La littérature indique que le *CYP2C9*3* résulte en une clairance intrinsèque des substrats de cette isoenzyme 50% inférieure chez les hétérozygotes *CYP2C9*1/*3* comparativement au génotype sauvage.⁴⁸ Le manque de différence statistiquement significative dans notre étude peut être due à l'importante variabilité interindividuelle à l'intérieur de chacun des groupes ou à l'effet d'autres covariables, telles que l'induction ou l'inhibition du CYP2C9. Le variant *CYP2J2*7* a précédemment été associé à une expression protéique diminuée d'environ 50%, ainsi qu'à une activité catalytique plus faible.^{69, 70} Au contraire, le métabolisme de l'ébastine était augmenté pour notre sujet *CYP2J2*7*. Cependant,

puisque'il n'y a qu'un seul sujet dans ce groupe, il nous est impossible de conclure sur l'influence du *CYP2J2**7 dans notre étude. La littérature rapporte que le variant *CYP3A4**22 est associé à une diminution de l'expression protéique et de l'activité médiée par le CYP3A4.^{77, 113} La formation de 1-hydroxymidazolam semble plus basse pour notre sujet *CYP3A4**22, mais il nous est impossible de conclure sur l'effet de ce polymorphisme génétique considérant le fait qu'il n'y ait qu'un seul individu dans ce groupe.

1.5 Comparaisons avec le foie

1.5.1 ARN messenger

Bièche *et al.* (2007) ont rapporté que les ARNm les plus exprimés dans le foie étaient ceux des CYP2E1, CYP2C9, CYP2C8 et CYP3A4.¹⁰⁴ Temesvári *et al.* (2012) ont trouvé un patron d'expression d'ARNm hépatique légèrement différent, avec CYP3A4~CYP2C9>CYP2D6>CYP2C19>CYP2B6.⁵⁶ Les isoenzymes intestinales les plus exprimées dans notre étude suggèrent que les patrons d'expression diffèrent entre le foie et l'intestin grêle (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2J2). Les corrélations ARN messenger et activité dans l'étude de Temesvári *et al.* se sont révélées concluantes, ce qui pourrait s'expliquer par l'importante activité des CYP450 au niveau hépatique.⁵⁶

1.5.2 Protéines

De Waziers *et al.* (1990) ont étudié l'expression protéique de diverses isoenzymes CYP450 dans plusieurs organes dont le foie et 3 sections de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon). Ils ont rapporté que l'intestin exprime 10% des niveaux hépatiques de CYP2C8-10, 20% pour le CYP2D6 et 50% pour le CYP3A4, faisant de l'intestin l'organe exprimant le plus ces isoenzymes après le foie.¹¹⁴ Les résultats de la méta-analyse de Achour *et al.* (2014) ont permis d'établir un

classement de l'expression hépatique des CYP450 comme suit : CYP3A4, CYP2E1, CYP2C9, CYP2C8, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C19, CYP2J2.¹¹⁵ Leur étude protéomique a donné des résultats similaires, avec le classement suivant : CYP3A4, CYP2C9, CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6, CYP2J2.¹¹⁶

En quantité de protéines, le CYP3A4 occupe une plus grande place dans l'intestin que dans le foie, relativement aux autres enzymes (82% vs 40%).²¹ Le CYP2C9 occupe la deuxième place pour les deux organes avec une proportion similaire (15 à 20%). Cependant, la quantification absolue montre que le CYP2C9 et le CYP2C19 sont 10 fois plus exprimés dans le foie que dans l'intestin grêle.²¹ Dans notre étude sur les différentes sections de l'intestin grêle, l'expression d'ARNm montre que le CYP3A4 représente 54-61%, tandis que le CYP2C9 occupe 12-18%.

1.5.3 Activité des isoenzymes CYP450

Au fil des années, plusieurs études ont évalué les profils cinétiques des substrats marqueurs des CYP450 au niveau hépatique. Les études de Gao *et al.*, Walsky *et al.* et Galetin *et al.* ont rapporté des valeurs de K_m entre 73-81 μM pour bupropion (CYP2B6),^{35, 117} 147-333 μM pour tolbutamide (CYP2C9),^{22, 35, 117} 30-57 μM pour S-méphénytoïne (CYP2C19),^{22, 117} 5,5 μM pour bufuralol (CYP2D6),²² 53-74 μM pour chlorzoxazone (CYP2E1)^{35, 117} et 1,9-3,3 μM pour midazolam (CYP3A4).^{22, 35, 117} Ces valeurs sont similaires à celles retrouvées dans l'intestin pour notre étude pour les substrats tolbutamide, S-méphénytoïne et midazolam. Les valeurs de K_m obtenues pour le bupropion dans nos échantillons se trouvaient en moyenne entre 803-1127 μM (contrairement à ~ 80 μM dans le foie),^{35, 117} suggérant que le CYP2B6 n'est pas l'enzyme majoritaire impliquée dans la formation de l'hydroxybupropion dans l'intestin (*Table 4* du Chapitre 2, p.80).

En ce qui concerne le degré d'activité des isoenzymes CYP450 au niveau hépatique, les valeurs retrouvées dans la littérature pour le bupropion,^{35, 117, 118} le tolbutamide,^{22, 35, 56, 117, 118} la S-méphénytoïne,^{22, 56, 117} le bufuralol,²² la chlorzoxazone,^{35, 117, 118} et le midazolam^{22, 35, 56, 117, 118} sont rapportées dans le Tableau II et comparées aux valeurs obtenues dans notre étude pour le jéjunum proximal. Les valeurs intestinales d'activité des CYP450 sont en moyenne un ordre de grandeur inférieures aux valeurs hépatiques.

Tableau II : Activité des isoenzymes CYP450 hépatiques et intestinales

Substrat (Enzyme)	Activité HLM littérature (pmol/mg protéine/min)	Activité HIM projet (pmol/mg protéine/min)*
Bupropion (CYP2B6)	47-413	2,2 (0,13-7,1)
Tolbutamide (CYP2C9)	218-450	13 (0,7-42)
S-Méphénytoïne (CYP2C19)	25-58	5,2 (0-16)
Bufuralol (CYP2D6)	90	1,5 (0-3,8)
Chlorzoxazone (CYP2E1)	487-2360	14 (1,5-33)
Midazolam (CYP3A4)	108-2700	135 (13-335)

* Les données de notre projet sont présentées en tant que moyenne (minimum-maximum) pour le jéjunum proximal.

Une large variabilité interindividuelle est également retrouvée au niveau du foie dans l'étude de Gao *et al.*, avec 26 fois pour l'activité du CYP2B6, 6 fois pour le CYP2C9, 12 fois pour le CYP2E1 et 73 fois pour le CYP3A4.³⁵ Ces résultats montrent que le métabolisme médié par les CYP450 présente une importante variabilité à la fois au niveau hépatique et intestinal.

L'étude de Galetin *et al.* permet de comparer les valeurs obtenues entre l'intestin et le foie. Ils ont rapporté une clairance intestinale 50 fois inférieure pour le midazolam comparativement à la clairance hépatique. Ils ont également remarqué une différence de 40 fois pour le métabolisme de la S-méphénytoïne et 11 fois pour le bufuralol. Malgré l'activité plus faible au niveau intestinal, les valeurs obtenues restaient cohérentes avec celles obtenues dans le foie, c'est-à-dire que les enzymes les plus actives dans le foie étaient également plus actives dans l'intestin grêle.²² Nos

valeurs de clairance intrinsèque intestinale sont inférieures à celles de la littérature d'environ 18 fois pour le CYP2C9 et le CYP2C19, tandis qu'elle est environ 4 fois moindre pour le CYP3A4.²² Paine *et al.* ont rapporté une activité intestinale du CYP2C9 environ 4 fois inférieure à l'activité hépatique, tandis que le CYP2C19 serait 8 fois moins actif.²¹ Madani *et al.* ont indiqué que le métabolisme médié par le CYP2D6 dans le jéjunum de 5 sujets correspondrait à environ 8% de l'activité rapportée dans le foie.¹¹⁹ Il est difficile de conclure sur ces valeurs, puisque nos données sont comparées à celles d'autres études. De ce fait, plusieurs facteurs de variabilité peuvent entrer en ligne de compte. Cependant, nos résultats de clairance intrinsèque se retrouvent environ un ordre de grandeur inférieur à ceux rapportés dans la littérature pour le foie, tel qu'indiqué dans le Tableau III.

Tableau III : CL_{int} des substrats tolbutamide, S-méphénytoïne et midazolam dans les microsomes de foie (HLM) et d'intestin grêle (HIM)

Substrat (Enzyme)	CL_{int} moyenne ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protéine)		
	HLM littérature*	HIM littérature**	HIM projet***
Tolbutamide (CYP2C9)	~1,4	~0,004	0,165 (0,013-0,675)
S-Méphénytoïne (CYP2C19)	~1,2	~0,07	0,326 (0,056-0,943)
Ébastine (CYP2J2)	-	9,7	59 (15-209)
Midazolam (CYP3A4)	~630	~22	52 (3-111)

* Les valeurs de CL_{int} hépatiques présentées proviennent des études de Walsky *et al.* (2004), Galetin *et al.* (2006) et Gao *et al.* (2016).

** Les valeurs de CL_{int} intestinales présentées proviennent des études de Hashizume *et al.* (2001), Galetin *et al.* (2006) et Obach *et al.* (2001).

*** Les valeurs de CL_{int} minimales et maximales sont présentées pour notre étude.

En résumé, les résultats de notre étude sont généralement en accord avec ceux rapportés dans la littérature. En effet, nous avons retrouvé des classements de l'expression et de l'activité des isoenzymes CYP450 similaires aux études précédentes, ainsi qu'une importante variabilité entre les sujets. Les données obtenues sur plusieurs isoenzymes dans diverses sections intestinales permettront une meilleure caractérisation du métabolisme intestinal régional, ainsi que l'évaluation de l'ampleur de la variabilité interindividuelle.

2. Conclusion générale

Les données obtenues dans le cadre de ce projet permettront une meilleure caractérisation du métabolisme intestinal, ainsi qu'une meilleure compréhension de l'effet de premier passage intestinal. De plus, nos résultats permettront de mieux prédire la variabilité dans la biodisponibilité des médicaments, ainsi que de mieux expliquer les interactions médicamenteuses causées par leur métabolisme intestinal. Des modèles de pharmacocinétique plus réalistes pourront être développés et les formulations pourront être ajustées afin d'optimiser l'absorption et la biodisponibilité des médicaments.

Comparativement aux études précédentes effectuées sur les enzymes de métabolisme au niveau intestinal, le devis de cette étude permet d'étudier à la fois la variabilité interindividuelle et la variabilité entre les sections de l'intestin grêle pour un même individu. Par ailleurs, l'analyse de l'expression d'ARNm, du génotype et de l'activité des CYP450 sur les mêmes sujets dans plusieurs sections permettent d'effectuer plusieurs tests statistiques afin d'identifier des tendances et corrélations significatives.

Certains facteurs tels que la diète pouvant influencer l'expression et l'activité des CYP450 intestinaux n'ont pas été évalués dans le cadre de cette étude. De plus, la microflore intestinale pourrait potentiellement contribuer à la variabilité dans le métabolisme intestinal des médicaments. Le métabolisme relié à la microflore intestinale n'a pas pu être pris en compte pour ce projet, puisque les intestins ont été nettoyés afin de favoriser la conservation des tissus et minimiser la dégradation enzymatique des CYP450. Le microbiome est important pour l'homéostasie intestinale, mais également au niveau de la bioactivation pour quelques xénobiotiques (p. ex. lovastatine et sulfasalazine) dans la lumière intestinale. Des études futures effectuant un

prélèvement de la microflore avant le nettoyage des échantillons seraient nécessaires afin de caractériser les enzymes bactériennes présentes et évaluer leur activité potentielle pour le métabolisme des médicaments. Les données ainsi obtenues constitueraient un avancement des connaissances au niveau du partenariat hôte-microbiome. Des expériences sur l'effet du microbiome intestinal seraient complémentaires à ce projet et permettraient d'avoir une vue d'ensemble de la biotransformation des molécules dans l'intestin grêle humain.

Les perspectives dans le domaine du métabolisme intestinal concernent entre autres la quantification des protéines avec les échantillons récoltés durant mon projet, afin de voir les corrélations ARNm/protéine, ainsi que les corrélations protéine/activité. En complément aux données de ce projet, des études futures évaluant l'activité des différents transporteurs dans l'intestin grêle et l'impact du microbiome permettraient d'obtenir de meilleures prédictions pharmacocinétiques en incorporant les dimensions les plus importantes reliées à l'absorption et au métabolisme intestinal.

Sources documentaires

1. Aulton ME. Aulton's pharmaceuticals : the design and manufacture of medicines. 3rd ed. Edinburgh ; Toronto: Churchill Livingstone Elsevier; 2007. x, 717 p. p.
2. Pond SM, Tozer TN. First-pass elimination. Basic concepts and clinical consequences. Clin Pharmacokinet. 1984;9(1):1-25.
3. Fleisher D, Li C, Zhou Y, Pao LH, Karim A. Drug, Meal and Formulation Interactions Influencing Drug Absorption After Oral Administration. Clin Pharmacokinet. 1999;36(3):233-54.
4. Gorski J. The effect of age, sex, and rifampin administration on intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2003;74(3):275-87.
5. Rios-Santos F, Magno LAV. Pharmacogenetics and Metabolism: Past, Present and Future. 2012. In: Topics on Drug Metabolism [Internet]. InTech. Available from: <https://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/pharmacogenetics-and-metabolism-past-present-and-future->.
6. Ortiz de Montellano PR. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. Fourth edition ed. Switzerland: Springer International Publishing; 2015. 912 p.
7. El-Kattan A, Varma M. Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability. 2012. In: Topics on Drug Metabolism [Internet]. InTech. Available from: <https://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/oral-absorption-intestinal-metabolism-and-human-oral-bioavailability>.
8. Gavhane YN, Yadav AV. Loss of orally administered drugs in GI tract. Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society. 2012;20(4):331-44.
9. Widmaier EP, Raff H, Strang KT, Vander AJ. Physiologie humaine : les mécanismes du fonctionnement de l'organisme : Vander, Sherman, Luciano. 5e éd. française / ed. Montréal, Paris: Chenelière éducation ; Maloine; 2009. xxiii, 888 p. p.
10. Porter CJH, Charman WN. Uptake of drugs into the intestinal lymphatics after oral administration. Advanced Drug Delivery Reviews. 1997;25(1):71-89.
11. Yamada T, Alpers DH. Textbook of gastroenterology. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Blackwell Pub.,; 2009. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781444303254> Accès réservé UdeM.
12. Lin JH, Chiba M, Baillie TA. Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? Pharmacological Reviews. 1999;51(2):135-57.
13. Doherty MM, Charman WN. The mucosa of the small intestine: How clinically relevant as an organ of drug metabolism. Clin Pharmacokinet. 2002;41(4):235-53.
14. Gerbe F, Legraverend C, Jay P. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. Cell Mol Life Sci. 2012;69(17):2907-17.
15. Kaminsky LS, Zhang QY. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2003;31(12):1520-5.
16. Pereira de Sousa I, Bernkop-Schnurch A. Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome it. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2014;192:301-9.

17. Obach RSZ, Q.-Y.; Dunbar, D.; Kaminsky, L.S. Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome P450s. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2001;29(3):347-52.
18. Lewis DF. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*. 2004;5(3):305-18.
19. Stanley LA. *Pharmacognosy*. 2017. In: *Pharmacognosy* [Internet]. Elsevier; [527-45].
20. Meyer MR, Schutz A, Maurer HH. Contribution of human esterases to the metabolism of selected drugs of abuse. *Toxicol Lett*. 2015;232(1):159-66.
21. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(5):880-6.
22. Galetin A, Houston JB. Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318(3):1220-9.
23. King RS. Historical Perspective. 2009. In: *Drug Metabolism Handbook: Concepts and Applications* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.
24. Danielson PB. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Current drug metabolism*. 2002;3(6):561-97.
25. California-Irvine Uo. Cytochrome P450 Irvine2017 [Available from: <http://faculty.sites.uci.edu/poulos/cytochrome-p450/>].
26. Kawashima A, Satta Y. Substrate-dependent evolution of cytochrome P450: rapid turnover of the detoxification-type and conservation of the biosynthesis-type. *PloS one*. 2014;9(6):e100059.
27. Guengerich FP. Kinetic deuterium isotope effects in cytochrome P450 oxidation reactions. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals*. 2013;56(9-10):428-31.
28. Guengerich FP. Mechanisms of Cytochrome P450 Substrate Oxidation: MiniReview. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2007;21(4):163-8.
29. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 1998;35(5):361-90.
30. Thorn CF, Lamba JK, Lamba V, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP2B6. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010;20(8):520-3.
31. CYP2B6 cytochrome P450 family 2 subfamily B member 6 [Homo sapiens (human)] [updated 2017-06-11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1555>].
32. Ilic K, Hawke RL, Thirumaran RK, Schuetz EG, Hull JH, Kashuba AD, et al. The influence of sex, ethnicity, and CYP2B6 genotype on bupropion metabolism as an index of hepatic CYP2B6 activity in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(3):575-81.
33. Zanger UM, Klein K, Saussele T, Bliedernicht J, Hofmann MH, Schwab M. Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics*. 2007;8(7):743-59.
34. Zhang H, Sridar C, Kanaan C, Amunugama H, Ballou DP, Hollenberg PF. Polymorphic variants of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6.4-CYP2B6.9) exhibit altered rates of metabolism for bupropion and efavirenz: a charge-reversal mutation in the K139E variant (CYP2B6.8) impairs formation of a functional cytochrome p450-reductase complex. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011;338(3):803-9.

35. Gao N, Tian X, Fang Y, Zhou J, Zhang H, Wen Q, et al. Gene polymorphisms and contents of cytochrome P450s have only limited effects on metabolic activities in human liver microsomes. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2016;92:86-97.
36. Hesse LM, He P, Krishnaswamy S, Hao Q, Hogan K, von Moltke LL, et al. Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. *Pharmacogenetics*. 2004;14:225-38.
37. Hofmann MH, Bliedernicht JK, Klein K, Saussele T, Schaeffeler E, Schwab M, et al. Aberrant splicing caused by single nucleotide polymorphism c.516G>T [Q172H], a marker of CYP2B6*6, is responsible for decreased expression and activity of CYP2B6 in liver. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2008;325(1):284-92.
38. Wang H, Thompkins LS. CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme. 2008.
39. Coles R, Kharasch ED. Stereoselective metabolism of bupropion by cytochrome P4502B6 (CYP2B6) and human liver microsomes. *Pharmaceutical research*. 2008;25(6):1405-11.
40. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug metabolism reviews*. 2002;34(1-2):83-448.
41. Administration USFD. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers 2016 [updated 2016-09-27. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/druginteractions/abeling/ucm093664.htm#table1>.
42. Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2005;77(5):341-52.
43. Aquilante CL, Niemi M, Gong L, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(12):721-8.
44. CYP2C8 cytochrome P450 family 2 subfamily C member 8 [Homo sapiens (human)] [updated 2017-07-07. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1558>.
45. Yu L, Shi D, Ma L, Zhou Q, Zeng S. Influence of CYP2C8 polymorphisms on the hydroxylation metabolism of paclitaxel, repaglinide and ibuprofen enantiomers in vitro. *Biopharm Drug Dispos*. 2013;34(5):278-87.
46. Backman JT, Filppula AM, Niemi M, Neuvonen PJ. Role of Cytochrome P450 2C8 in Drug Metabolism and Interactions. *Pharmacol Rev*. 2016;68(1):168-241.
47. Sall C, Houston JB, Galetin A. A comprehensive assessment of repaglinide metabolic pathways: impact of choice of in vitro system and relative enzyme contribution to in vitro clearance. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012;40(7):1279-89.
48. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, et al. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010;20(4):277-81.
49. CYP2C9 cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9 [Homo sapiens (human)] [updated 2017-07-07. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1559>.
50. Yasar U, Lundgren S, Eliasson E, Bennet A, de Faire U, Rane A. Linkage between the CYP2C8 and CYP2C9 genetic polymorphisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;299:25-8.

51. Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2005;77(1):1-16.
52. Rettie AE, Jones JP. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005;45:477-94.
53. Lee CR, Pieper JA, Hinderliter AL, Frye RF, Blaisdell JA, Goldstein JA. Tolbutamide, Flurbiprofen, and Losartan as Probes of CYP2C9 Activity in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2003;43(1):84-91.
54. Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot JS, Thorn CF, Altman RB, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012;22(2):159-65.
55. CYP2C19 cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19 [Homo sapiens (human)] [updated 2017-07-07. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>.
56. Temesvari M, Kobori L, Paulik J, Sarvary E, Belic A, Monostory K. Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2012;341(1):294-305.
57. Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot J-S, Thorn CF, Altman RB, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012;22(2):159-65.
58. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The pharmacogenomics journal*. 2005;5(1):6-13.
59. Haufroid V, Hantson P. CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amfetamines, opioid analgesics and antidepressants. *Clinical toxicology*. 2015;53(6):501-10.
60. Ingelman-Sundberg M. CYP2D6 allele nomenclature 2016 [updated 2016-01-19. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>.
61. Zhou SF. Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance Part I. *Clinical Pharmacokinetics*. 2009;48(11):689-723.
62. Koh KH, Pan X, Shen HW, Arnold SL, Yu AM, Gonzalez FJ, et al. Altered expression of small heterodimer partner governs cytochrome P450 (CYP) 2D6 induction during pregnancy in CYP2D6-humanized mice. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(6):3105-13.
63. CYP2E1 cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1 [Homo sapiens (human)] [updated 2017-06-27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1571>.
64. Sheng YJ, Wu G, He HY, Chen W, Zou YS, Li Q, et al. The association between CYP2E1 polymorphisms and hepatotoxicity due to anti-tuberculosis drugs: a meta-analysis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;24:34-40.
65. Ingelman-Sundberg M. CYP2E1 allele nomenclature 2014 [updated 21-01-2014. Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>.
66. Benowitz NL, Peng M, Jacob P, 3rd. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2003;74(5):468-74.
67. Hukkanen J, Jacob Iii P, Peng M, Dempsey D, Benowitz NL. Effects of nicotine on cytochrome P450 2A6 and 2E1 activities. *British journal of clinical pharmacology*. 2010;69(2):152-9.

68. Mishin VM, Rosman AS, Basu P, Kessova I, Oneta CM, Lieber CS. Chlorzoxazone pharmacokinetics as a marker of hepatic cytochrome P4502E1 in humans. *Am J Gastroenterol*. 1998;93(11):2154-61.
69. Murray M. CYP2J2 - regulation, function and polymorphism. *Drug metabolism reviews*. 2016;48(3):351-68.
70. Berlin DS, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2: CYP2J2. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(5):308-11.
71. CYP2J2 cytochrome P450 family 2 subfamily J member 2 [Homo sapiens (human)] [updated 2017-06-04. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1573>.
72. Evangelista EA, Kaspera R, Mokadam NA, Jones JP, 3rd, Totah RA. Activity, inhibition, and induction of cytochrome P450 2J2 in adult human primary cardiomyocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(12):2087-94.
73. Karkhanis A, Hong Y, Chan ECY. Inhibition and inactivation of human CYP2J2: Implications in cardiac pathophysiology and opportunities in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2017;135:12-21.
74. Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, et al. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *Pharmacol Exp Therap*. 2001;300(2).
75. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. *Frontiers in genetics*. 2013;4:12.
76. Gomez A, Ingelman-Sundberg M. Epigenetic and microRNA-dependent control of cytochrome P450 expression: a gap between DNA and protein. *Pharmacogenomics*. 2009;10(7):1067-76.
77. Okubo M, Murayama N, Shimizu M, Shimada T, Guengerich FP, Yamazaki H. The CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. *J Toxicol Sci*. 2013;38(3):349-54.
78. Thummel KE, Kunze KL, Shen DD. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997;27:99-127.
79. Hall SD, Thummel KE, Watkins PB, Lown KS, Benet LZ, Paine MF, et al. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1999;27(2):161-6.
80. Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice-drug interactions. *J Clin Pharmacol*. 1998;46:101-10.
81. Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012;22(7):555-8.
82. Saito T, Honda M, Takahashi M, Tsukada C, Ito M, Katono Y, et al. Functional characterization of 10 CYP4A11 allelic variants to evaluate the effect of genotype on arachidonic acid omega-hydroxylation. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2015;30(1):119-22.
83. CYP4A11 cytochrome P450 family 4 subfamily A member 11 [Homo sapiens (human)] [updated 2017-06-04. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1579>.
84. Kim D, Cha GS, Nagy LD, Yun CH, Guengerich FP. Kinetic analysis of lauric acid hydroxylation by human cytochrome P450 4A11. *Biochemistry*. 2014;53(39):6161-72.

85. Lin JH, Lu AY. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2001;41:535-67.
86. Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: The Xenobiotic-Sensing Receptors. NIH-PA Author Manuscript. 2007;72(3):231-46.
87. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. *Biologie moléculaire de la cellule*. 3ème édition ed. Paris: De Boeck & Larcier; 2005. 973 p.
88. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(1):29-44.
89. Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nature Reviews*. 2010;9.
90. Florence AT, Attwood D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Great Britain: Pharmaceutical Press; 2011. 510 p.
91. Drozdik M, Groer C, Penski J, Lapczuk J, Ostrowski M, Lai Y, et al. Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. *Molecular pharmaceutics*. 2014;11(10):3547-55.
92. Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical research*. 2009;26(9):2039-54.
93. Zdanowicz MM. Chapter 5: Pharmacogenomics and Drug Transport/Efflux. In: *Pharmacists ASoH-S, editor. Concepts in Pharmacogenomics*. Bethesda, Maryland 2010. p. 414.
94. Wu W, Dnyanmote AV, Nigam SK. Remote communication through solute carriers and ATP binding cassette drug transporter pathways: an update on the remote sensing and signaling hypothesis. *Molecular pharmacology*. 2011;79(5):795-805.
95. Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, Bjorquist A, Ungell AL. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2006;28(4):291-9.
96. Russel FGM. Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. 2010:27-49.
97. Paine MF, Ludington SS, Chen ML, Stewart PW, Huang SM, Watkins PB. Do men and women differ in proximal small intestinal CYP3A or P-glycoprotein expression? *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2005;33(3):426-33.
98. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
99. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
100. Tucker TG, Milne AM, Fournel-Gigleux S, Fenner KS, Coughtrie MW. Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(2):279-85.
101. Meier Y, Eloranta JJ, Darimont J, Ismail MG, Hiller C, Fried M, et al. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007;35(4):590-4.
102. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2007;35(8):1333-40.

103. Groer C, Bruck S, Lai Y, Paulick A, Busemann A, Heidecke CD, et al. LC-MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013;85:253-61.
104. Bieche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, et al. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenetics and genomics*. 2007;17(9):731-42.
105. Groer C, Busch D, Patrzyk M, Beyer K, Busemann A, Heidecke CD, et al. Absolute protein quantification of clinically relevant cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases by mass spectrometry-based targeted proteomics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014;100:393-401.
106. Miyauchi E, Tachikawa M, Decleves X, Uchida Y, Bouillot JL, Poitou C, et al. Quantitative Atlas of Cytochrome P450, UDP-Glucuronosyltransferase, and Transporter Proteins in Jejunum of Morbidly Obese Subjects. *Molecular pharmaceutics*. 2016;13(8):2631-40.
107. Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, et al. CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Molecular pharmacology*. 1997;51(6):931-43.
108. von Richter O, Burk O, Fromm MF, Thon KP, Eichelbaum M, Kivisto KT. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2004;75(3):172-83.
109. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;283(3):1552-62.
110. Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1999;27(7):804-9.
111. Shimada T, Tsumura F, Yamazaki H. Prediction of Human Liver Microsomal Oxidations of 7-Ethoxycoumarin and Chlorzoxazone with Kinetic Parameters of Recombinant Cytochrome P-450 Enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1999;27(11):1274-80.
112. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):227-32.
113. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *The pharmacogenomics journal*. 2011;11(4):274-86.
114. de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1990;253(1):387-94.
115. Achour B, Barber J, Rostami-Hodjegan A. Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes and their intercorrelations: a meta-analysis. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2014;42(8):1349-56.
116. Achour B, Russell MR, Barber J, Rostami-Hodjegan A. Simultaneous quantification of the abundance of several cytochrome P450 and uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase enzymes in human liver microsomes using multiplexed targeted proteomics. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2014;42(4):500-10.

117. Walsky RL, Obach, R.S. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2004;32(6):647-60.
118. Zhang H, Gao N, Tian X, Liu T, Fang Y, Zhou J, et al. Content and activity of human liver microsomal protein and prediction of individual hepatic clearance in vivo. *Scientific reports*. 2015;5:17671.
119. Madani S, Paine MF, Lewis L, Thummel KE, Shen DD. Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines. *Pharmaceutical research*. 1999;16(8):1199-205.

Annexes

Annexe 1- Figure supplémentaire

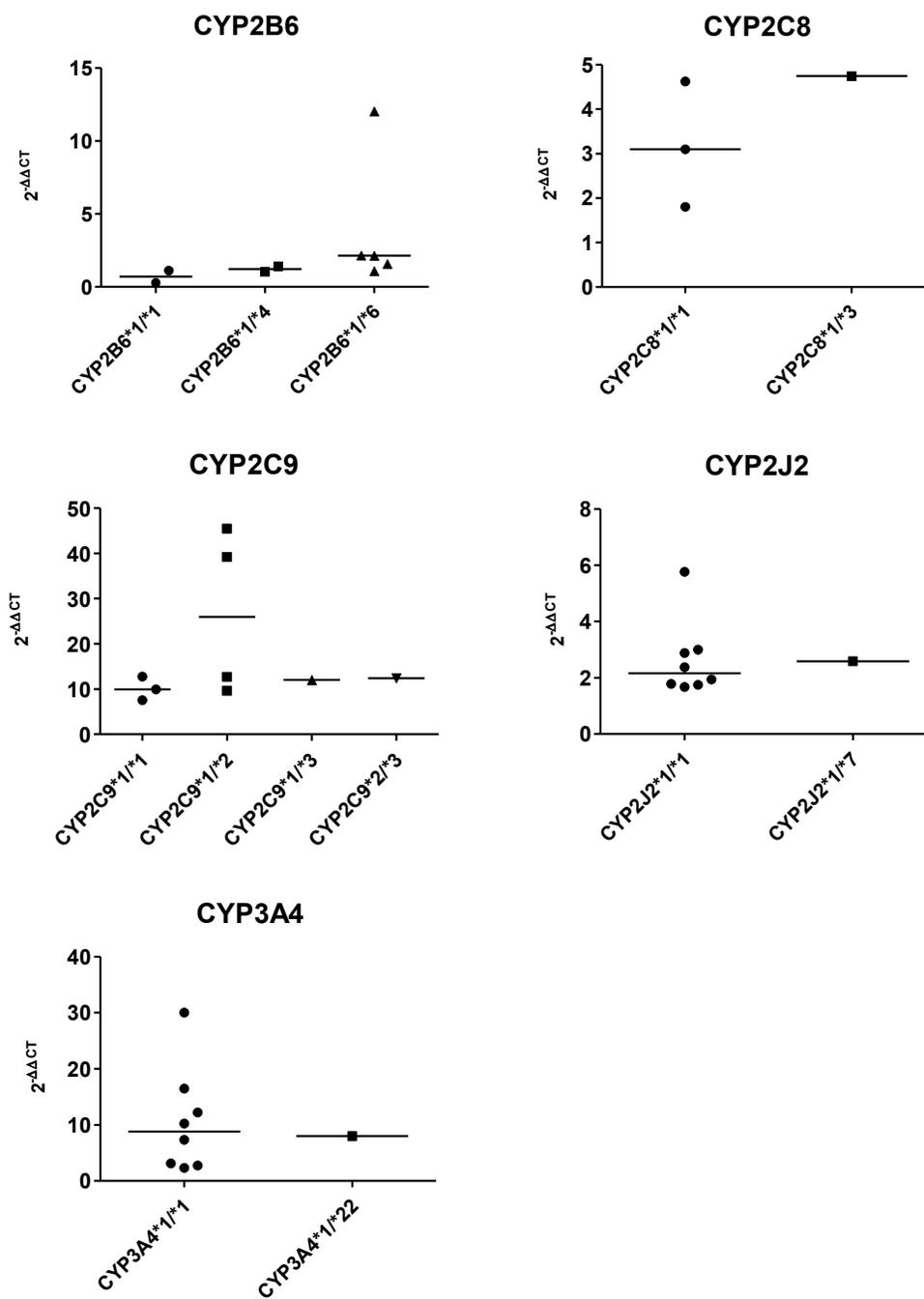


Figure 1 : ARNm en fonction du génotype

Annexe 2- Liste de contributions

Publications :

- Clermont V, Grangeon A, Bélanger F, Gaudette F, Michaud V. CYP450 mRNA expression and *in vitro* activities in human small intestine, article en préparation
- Clermont, V., Grangeon, A., Gaudette, F., Barama, A., & Michaud, V. (2017, February). Characterization of CYP450 drug metabolism enzymes activities in human small intestine. In *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (Vol. 101, No. S 1, pp. S60-S61). 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley-Blackwell. (*Abstract*)

Présentations orales :

- Clermont V, Michaud V. Évaluation et caractérisation des enzymes de métabolisme CYP450 dans l'intestin grêle humain, Séminaire des étudiants de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Montréal, 22 novembre 2016

Présentations par affiche :

- Clermont V, Grangeon A, Gaudette F, Barama A, Michaud V. Expression et activité métabolique des CYP450 dans l'intestin grêle chez l'humain, 19ème Congrès des étudiants, stagiaires et résidents du Centre de Recherche du CHUM, 4 mai 2017, Montréal
- Clermont V, Grangeon A, Gaudette F, Barama A, Michaud V. Characterization of CYP450 drug metabolism enzymes activities in human small intestine, ASCPT 2017 Annual Meeting, 15-18 mars 2017, Washington, DC.
- Grangeon A, Clermont V, Barama A, Gaudette F, Turgeon J, Michaud V. Simultaneous absolute protein quantification method of 14 CYP450 enzymes in human intestine by mass spectrometry-based targeted proteomics, ASCPT 2017 Annual Meeting, 15-18 mars 2017, Washington, DC.
- Clermont V, Grangeon A, Gaudette F, Barama A, Michaud V. Caractérisation des enzymes de métabolisme CYP450 dans l'intestin grêle humain, 7ème journée scientifique du CRCHUM, 20 octobre 2016, Montréal
- Clermont V, Grangeon A, Gaudette F, Barama A, Michaud V. Évaluation et caractérisation des enzymes de métabolisme des médicaments CYP450s exprimées au long de l'intestin grêle chez l'humain, 18ème Congrès des étudiants, stagiaires et résidents du Centre de Recherche du CHUM, 4 mai 2016, Montréal
- Clermont V, Leclair G, Forest J-M, Compatibilité calcium-phosphore dans des solutions d'alimentation parentérale en pédiatrie, Congrès de l'Association des pharmaciens des établissements de santé du Québec, 16 avril 2015, Québec

- M-E. Leclaire, S. Zarra, V. Clermont, I. Marcotte, G. Leclair, Biorelevant membranes as in vitro models for the evaluation of drug permeability, Canadian Society of Pharmaceutical Science (CSPS) conférence conjointe avec le Canadian Chapter of the Controlled Release Society (CC-CRS), 10-13 juin 2014, Montréal