

Université de Montréal

**Études Métaboliques des Isoenzymes du Cytochrome P450 exprimées dans les  
ventricules de cœurs humains**

Par

Jade Huguet

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en  
Sciences Pharmaceutiques option Pharmacologie

Octobre, 2015

©, Jade Huguet, 2015

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Études Métaboliques des Isoenzymes du Cytochrome P450 exprimées dans les  
ventricules de cœurs humains**

Présentée par :  
Jade Huguet

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Marc Servant  
Président rapporteur

Dr. Jacques Turgeon  
Directeur de recherche

Dr. Denis Deblois Membre du jury

Dre. Chantale Simard  
Examineur externe

Dr. Marc Servant  
Représentant du doyen

## Résumé

Les isoenzymes du CYP450 sont grandement impliquées dans le métabolisme oxydatif des médicaments et des variations dans leur activité (interactions médicamenteuses, polymorphismes génétiques) peuvent occasionner des changements importants dans les concentrations plasmatiques et tissulaires des médicaments. Le foie régit de façon prédominante les concentrations plasmatiques des médicaments en raison d'une forte concentration des CYP450s dans cet organe. En moyenne, l'élimination d'un médicament par métabolisme représente environ 75% des mécanismes de clairance par rapport à 20% par voie rénale et 10% par la bile sous forme inchangée. Les CYP450s contribuent à environ 75% du métabolisme des médicaments. Il est ainsi logique de s'attarder au comportement et facteurs influençant l'expression et l'activité des CYP450s. L'abondance et la variété des CYP450s exprimés diffèrent entre le foie et les tissus extra-hépatiques. Le rôle de ces isoenzymes dans le devenir extra-hépatique des composés endogènes et exogènes demeure peu étudié malgré leur implication et association reconnue dans certains échecs thérapeutiques, interactions médicamenteuses ou toxicités tissulaires. Le ventricule de cœur humain exprime (ARNm) de façon variable certaines isoenzymes dont le CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 2J2, 3A5 et 4A11. La participation de ces isoenzymes exprimées dans la paroi ventriculaire cardiaque dans le métabolisme des médicaments reste à ce jour inconnue. Établir l'existence d'une participation active de certains CYP450s, étudier leur profil métabolique et leur contribution dans la clairance locale tout en déterminant les facteurs responsables de leur variabilité en terme d'activité et d'expression (ARNm) dans le tissu ventriculaire cardiaque humain représente l'objectif principal des travaux de recherche présentés dans cette thèse. Le premier volet fût le développement de cocktails médicamenteux afin d'optimiser la quantité de résultats à travers l'usage unique d'un tissu avec des substrats sélectifs jumelés à des méthodes analytiques ultra-sensibles et spécifiques (manuscrit 1). Parmi les 9 composés testés, les substrats ébastine et chlorzoxazone, substrats-cibles reconnus des isoenzymes CYP2J2 et CYP2E1 respectivement, ont démontré des activités menant à l'étude approfondie de leur profil métabolique généré par la fraction microsomale de ventricules de cœurs humains

explantés (MCH). Ces travaux ont démontré une cinétique préférentielle et de très haute affinité par les MCH envers la voie d'hydroxylation de l'ébastine décrite par un modèle Michaelis-Menten. Jumelé à des essais d'inhibition, un lien fût établi, pour la toute première fois, entre l'hydroxylation de l'ébastine et l'isoenzyme CYP2J2 (manuscrit 2). L'hydroxylation de l'ébastine par les MCH fût aussi reconnue comme étant hautement variable entre des individus adressés à une transplantation cardiaque présentant des cardiomyopathies potentiellement mortelles n'étant plus maîtrisées par les thérapies ou traitements standards. L'objectif de ce dernier volet était d'étudier des facteurs (extrinsèques et intrinsèques, dont le polymorphisme du CYP2J2\*7) connus chez ces patients et leur implication dans la variabilité de l'expression du CYP2J2 (ARNm) et de son activité enzymatique, déduite par l'étude du comportement métabolique du marqueur ébastine suite à une analyse des paramètres de cinétique enzymatique ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $CL_{int}$ ). Il a été démontré que le sexe, le côté gauche du ventricule, la prise d'amiodarone et le diagnostic clinique d'ischémie sont associés à la variabilité d'expression (ARNm) et d'activité ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $CL_{int}$ ) du CYP2J2 et expliquent environ 20% de la variabilité observée entre les individus. Il s'agit des premiers travaux expliquant une portion de la variabilité associée à l'expression (ARNm) et l'activité du CYP2J2 dans le ventricule du cœur humain (manuscrit 3). Finalement, nos résultats suggèrent que la capacité métabolique du CYP2J2 au sein des MCH est réelle et importante et pourrait participer aux fluctuations locales des concentrations de médicaments. L'extrapolation des résultats obtenus in vitro à l'échelle in vivo (organe entier) a permis de mettre en perspective la contribution métabolique du CYP2J2 dans le contexte locale physiologique du tissu ventriculaire cardiaque étudié.

Nos résultats appuient la proposition que la concentration libre plasmatique ne reflète pas nécessairement la concentration tissulaire efficace puisque des mécanismes locaux de métabolisme enzymatique (CYP2J2) peuvent grandement faire varier la concentration libre au site d'action intracellulaire. Les résultats obtenus répondent à un besoin en recherche de comprendre le comportement et l'ampleur de la participation de différentes isoenzymes du CYP450 connues s'exprimant dans le cœur humain envers le métabolisme de médicaments s'y distribuant et ultimement prédire leurs concentrations intracellulaires.

## **Abstract**

CYP450 isoenzymes are greatly involved in oxidative drug metabolism and changes in their activity (drug interactions, genetic polymorphisms) can cause significant changes in plasma and tissue concentrations of the drugs. The liver predominantly governs plasma concentrations of drugs because of a high concentration of CYP450s. On average, the elimination of a drug through metabolism accounts for about 75% of clearance mechanisms compared to 20% via renal excretion and 10% via the bile excretion. The CYP450s contribute to about 75% of drug metabolism. It is thus logical to study factors influencing the expression and activity of CYP450s. Abundance and variety of expressed CYP450s differ between the liver and extrahepatic tissues. The role of these enzymes endogenous and drugs concentrations in the extrahepatic tissues is poorly studied despite their involvement and association recognized in some treatment failures, drug interactions or tissue toxicity. The ventricles of the human heart express (messenger RNA) variably some isoenzymes including CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 2J2, 3A5 and 4A11. The participation of these isoenzymes expressed in the cardiac ventricular wall in drug metabolism remains unknown to this day. Establishing the existence of an active participation of some CYP450s, their metabolic profile and contribution to the local clearance and determining factors responsible for variability in activity and expression (mRNA) in the cardiac ventricular tissue human is the main objective of the research presented in this thesis. The first module was the development of drug cocktails to maximize the amount of results through the use of low amount of heart tissue with selective substrates matched with highly sensitive and specific analytical methods (manuscript 1). Of the nine compounds tested 2 substrates, ebastine and chlorzoxazone, probe of CYP2E1 and CYP2J2 respectively, have demonstrated activities leading to a thorough study of their metabolic profile generated by the microsomal fraction of the ventricles of explanted human hearts (MCH). This work demonstrated preferential kinetics, described by a Michaelis-Menten model, and very high affinity towards the MCH hydroxylation pathway for ebastine. Combined with inhibition assays, a link was established, for the first time, between the hydroxylation of ebastine and the isoenzyme CYP2J2 (manuscript 2).

Hydroxylation of ebastine by MCH was also recognized as being highly variable between individuals that went through a heart transplant with life-threatening cardiomyopathies that are no longer controlled by standard therapies or treatments. The aim of this last part was to study factors (extrinsic and intrinsic, such as polymorphism of CYP2J2 \* 7) known in these patients and their involvement in the variability of expression (mRNA) and enzymatic activity of CYP2J2 studied through the analysis of the enzyme kinetic profile of ebastine ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $CL_{int}$ ). It has been shown that gender, the left ventricle, use of amiodarone and clinical diagnosis of ischemia were associated with the variability of expression (mRNA) and activity ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $CL_{int}$ ) of CYP2J2 and those factors account for about 20% of the observed variability between individuals. This is the first work to explain a portion of the variability associated with the expression (mRNA) and activity of CYP2J2 in the ventricle of the human heart (manuscript 3). Overall, our results suggested that the metabolic capacity of CYP2J2 by MCH is real and important and could participate in local fluctuations of drug levels. The extrapolation of in vitro results to in vivo scale (whole body) helped to put into perspective the contribution of CYP2J2 in the local physiological context of the cardiac ventricular tissue studied.

Our results support the proposal that the free plasma concentration does not necessarily reflect the effective tissue concentration as local mechanisms, in this case enzymatic metabolism by CYP2J2, could greatly provoke variation in free intracellular concentration at the site of action. The results obtained meet a need in research to understand the behavior and extent of participation of various CYP450 isoenzymes known to be expressed in the human heart on the local metabolism of drugs that are distributed locally and ultimately developing tools to predict the intracellular drug concentrations in the physiological context.

# Table des matières

Chapitre 1 : Introduction .....	1
1.1 Mise en contexte .....	2
1.2 Principes généraux de pharmacocinétique : ADME .....	5
1.3 Concentrations intracellulaires .....	11
1.4 Clairance .....	13
1.4.1 Conceptualisation mathématique de la Clairance .....	14
1.4.2 Additivité des clairances .....	17
1.4.3 Modèle de clairance .....	18
1.4.4 Clairance intrinsèque .....	19
1.4.5 Clairance métabolique .....	23
1.5 Les enzymes du métabolisme des médicaments .....	26
1.5.1 Les Cytochromes P450 .....	26
1.5.2 Localisation des Cytochromes P450 cardiaques .....	30
1.6 Approches expérimentales d'études du métabolisme des médicaments .....	34
1.6.1 Modèles <i>In Vitro</i> .....	34
1.6.2 Métabolisme extrahépatique par les CYP450s .....	35
1.7 CYP450 cardiaques .....	37
CYP1A1 .....	37
CYP2B6 .....	38
CYP2C8 .....	40
CYP2C9 .....	41
CYP2D6 .....	42
CYP2E1 .....	43
CYP2J2 .....	44
CYP3A .....	45
CYP4A11 .....	47
1.8 Les éicosanoïdes .....	48
1.9 Variabilité dans la réponse aux médicaments .....	52
1.9.1 Facteurs Génétiques : Polymorphismes .....	54
1.9.2 Facteurs Non-Génétiques : Physiologiques .....	56

1.9.2.1	Âge.....	56
1.9.2.2	Genre.....	58
1.9.2.3	Ethnicité.....	59
1.9.2.4	Les médicaments comme facteur de variabilité sur le métabolisme des CYP450s.....	62
1.9.3	Facteurs environnementaux.....	63
1.10	Résumé de l'état des connaissances, buts de la thèse.....	64
Section II : Travaux de recherche.....		69
2.	Chapitre 2 – Manuscrit 1.....	70
2.1	Avant-propos.....	71
2.1.1	Introduction.....	71
2.1.2	Statut actuel du manuscrit.....	73
2.2	Manuscrit 1.....	74
2.3	Discussion.....	123
2.3.1	Discussion spécifique : éthoxyrésorufine.....	125
2.3.2	Discussion spécifique : ébastine.....	125
2.3.3	Discussion spécifique : cocktail #2.....	129
3.	Chapitre 3 – Manuscrit 2.....	132
3.1	Avant-propos.....	133
3.1.1	Introduction.....	133
3.1.2	Statut actuel de du manuscrit.....	134
3.2	Manuscrit II.....	135
3.3	Introduction.....	137
3.4	Méthodes.....	139
3.5	Résultats.....	145
3.6	Discussion.....	151
3.7	Références.....	160
3.8	Discussion.....	182
4.	Chapitre 4 – Manuscrit 3.....	199
4.1	Avant-propos.....	200
4.1.1	Introduction.....	200



4.1.2	Statut actuel du manuscrit.....	202
4.2	Manuscrit III.....	203
4.3	Discussion .....	245
Section III : Conclusion .....		248
5.	Chapitre 5.....	249
5.1	Discussion Générale.....	249
5.2	Commentaire général et contribution scientifique .....	256
5.3	Autres travaux scientifiques .....	258
6.	Références.....	259
Annexes.....		i
Annexe 1 : Manuscrit 4.....		ii
Annexe 2: Curriculum vitae.....		iv

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Équations et concepts menant à l'équation de la clairance systémique. ....	15
<b>Tableau 2.</b> Résumé du développement de cocktails et des méthodes analytiques. ....	124
<b>Tableau 3.</b> Paramètres de cinétique enzymatique de l'hydroxylation de l'ébastine avec les MCH .....	184
<b>Tableau 4.</b> Paramètres de cinétique enzymatique de l'hydroxylation de l'ébastine dans trois différentes matrices ; MCH, HLM et rhCYP2J2. ....	187
<b>Tableau 5.</b> Extrapolation <i>in vitro/in vivo</i> de la clairance intrinsèque d'ébastine à partir de la cinétique avec les rhCYP450s selon la méthode d'abondance des CYP450s. ....	197
<b>Tableau 6.</b> Comparaison des méthodes d'extrapolation <i>in vitro/in vivo</i> basées sur la 1) cinétique microsomale versus 2) cinétique/abondance d'isoenzymes recombinantes (rhCYP450). ....	198

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma d'un entérocyte.....	6
<b>Figure 2.</b> Coupe de deux lobules hépatiques (gauche).....	8
<b>Figure 3.</b> Représentation générale de la concentration en fonction de la vitesse d'élimination d'une concentration de médicament suivant une cinétique d'ordre 1 d'un modèle à un compartiment. (image dessinée par Jade Huguet).....	16
<b>Figure 4.</b> Représentation générale de la concentration en fonction de la vitesse d'élimination d'une quantité de médicament.....	16
<b>Figure 5.</b> Intégration des différents modèles et équations de clairance (schéma réalisé par Jade Huguet dont les équations de clairance proviennent de Tozer and Rowland <sup>14</sup> ).22	
<b>Figure 6.</b> Représentation 3D de la structure protéique du CYP2J2 .....	28
<b>Figure 7.</b> Configuration des zones au niveau des ventricules de cœurs humains. ....	30
<b>Figure 8.</b> Représentation schématique des cellules d'une coupe latérale du mur d'un cœur humain.....	31
<b>Figure 9.</b> Représentation schématique d'un cardiomyocyte .....	32
<b>Figure 10.</b> Modèles/matrices pour étudier le métabolisme <i>in vitro</i> . ....	34
<b>Figure 11.</b> Technique d'ultracentrifugation différentielle pour isolation de microsomes de cœurs humains.....	35
<b>Figure 12.</b> Expression relative de l'ARNm de l'isoenzyme CYP2D6, CYP2J2 et CYP2E1 dans les cœurs explantés de 7 patients.....	43
<b>Figure 13.</b> Expression relative d'ARNm de différentes isoenzymes dans les cœurs explantés de 9 patients. ....	47
<b>Figure 14.</b> Expression relative de l'ARNm des CYP3A4 et CYP3A5 (CYP3A/GAPDH) dans le tissu de ventricule de cœurs humains .....	56
<b>Figure 15.</b> Effet de l'âge dans le métabolisme des CYP450s dans les microsomes de foies humains. ....	57
<b>Figure 16.</b> Effet du genre dans le métabolisme des CYP450s dans les microsomes de foies humains. ....	58
<b>Figure 17.</b> Effet de l'ethnicité dans le métabolisme des CYP450s dans les microsomes de foies humains. ....	59

<b>Figure 18.</b> Essai de sélectivité du substrat éthoxyrésorufine dans différentes isoenzymes recombinantes humaines. ....	72
<b>Figure 19.</b> Voies métaboliques du substrat ébastine .....	126
<b>Figure 20.</b> Profil de cinétique enzymatique de l'ébastine avec les rhCYP2J2.....	127
<b>Figure 21.</b> Cinétique enzymatique de l'ébastine dans les rhCYP2J2 de 0 à 12 $\mu$ M .....	128
<b>Figure 22.</b> Représentation graphique du Khalf de l'hydroxylation de l'ébastine en fonction de la concentration de rhCYP2J2 .....	129
<b>Figure 23.</b> Activité d'hydroxylation du substrat chlorzoxazone avec les MCH .....	185
<b>Figure 24.</b> Profil d'inhibition de l'hydroxylation du substrat ébastine avec des concentrations ascendantes d'astémizole et de terfénadine dans les rhCYP2J2.....	186
<b>Figure 25.</b> Formation d'EDDP résultant du métabolisme de la R- et S-méthadone dans les isoenzymes recombinantes humaines rhCYP450.....	190
<b>Figure 26.</b> Voies métaboliques connues dépendantes des CYP450s pour la R- et S-méthadone. ....	190
<b>Figure 27.</b> Concentrations (nM) formées suivant des incubations avec 100 $\mu$ L (0,76 mg) d'un pool de 12 échantillons de ventricules gauches de cœurs humains avec cardiomyopathies non-ischémiques de patients de sexe masculin.....	191
<b>Figure 28.</b> Activité d'hydroxylation résiduelle de la R- et S- méthadone avec les HHM du pool de 12 patients .....	192
<b>Figure 29.</b> Corrélation entre l'expression de l'ARNm du CYP2J2 et l'activité d'hydroxylation du substrat ébastine associée avec les MCH .....	201
<b>Figure 30.</b> Expression relative de l'ARNm dans les microsomes de cœurs humains...250	

# Liste et description des articles originaux

Cette thèse de doctorat est réalisée sur les observations et conclusions obtenus lors des travaux décrits dans les articles suivants;

I. Élaboration d'un cocktail de substrats-types ciblant sélectivement les isoenzymes du CYP450 exprimées dans le ventricule humain.

II. Caractérisation de profils métaboliques dans la fraction microsomale de ventricules de cœurs humains.

III. Étude des facteurs prédictifs de la variabilité observée dans la clairance du CYP2J2 dans le ventricule de cœurs humains.

Annexe 1: Article IV. No effects of pantoprazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy subjects

## Liste des abréviations

A :	Adénine
Å :	<u>Ångström</u>
ABC :	<i>ATP-binding cassette</i>
ADME :	Administration, Distribution, Métabolisme et Élimination
Ae :	<i>Amount excreted</i>
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AHO :	Aldéhyde oxydase
AhR :	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i>
AKR :	Aldo-kéto réductase
ASC :	Aire sous la courbe
Asn :	Asparagine
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATP :	Adénosine-5'-triphosphate
ATPase :	Adenosine triphosphatase
C :	Concentration de médicament
cc :	Centimètre cubique
CE:	Carboxyestérase
C $\theta$ :	Concentration initiale de médicament dans le plasma
CL :	Clairance
CL <sub>int</sub>	Clairance intrinsèque
cm <sup>3</sup> :	Centimètre cube
CPR :	CYP450-réductase-NADPH dépendante
CYP450 :	Cytochrome P 450
CYP2J2 :	Cytochrome P 450 2J2
D :	Dose
DSH :	Déshydrogénase
E :	Coefficient d'extraction
<i>E</i> :	Enzyme
EC :	<i>Enzyme commission number</i>
EDDP :	2-éthylidine-1,5-diméthyl-3,3 diphénylpyrrolidine

EET :	Acide Époxyeicosatriénoïques
EROD :	Éthoxyrésorufine-O-dééthylation
ES :	Complexe enzyme-substrat
F :	Biodisponibilité
fu :	fraction libre
FDA	Food and Drug Administration
FMO:	Flavines monooxygénases
g :	Gramme
G :	Guanine
G6PD :	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GSH :	Gluthatione-S-transférase
HAP :	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HETE :	<i>hydroxyeicosatetraenoic acid</i> (Acide Hydroxyéicosatétraoïque)
HHM :	Human Heart Microsomes
HLM :	Human Liver Microsomes
HMGCoA :	Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A
IC :	Intervalle de confiance
Ile :	Isoleucine
IC50 :	Concentration diminuant l'activité enzymatique maximal de 50%
i.v. :	Intraveineux
IVIVE :	<i>In vitro/in vivo</i> extrapolation
k :	Constante associée à la vitesse de réaction (unité de temps <sup>-1</sup> )
K <sup>+</sup> :	Potassium
kb :	Kilobase
kel :	Constante d'élimination
K <sub>m</sub> :	Constante Michaelis-Menten pour un substrat donnée
Ks :	Constante de spécificité du modèle Michaelis-Menten
m :	Pente
MAO:	Monoamines oxydase
MCH :	Microsomes de cœurs humains
Met :	Métabolite

ml :	Millilitre
M-M :	Michaelis-Menten
MS :	<i>Mass spectrometry</i> (Spectrométrie de masse)
N :	Azote
Na <sup>+</sup> :	Sodium
NADP <sup>+</sup> :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
$\alpha$ -NF :	$\alpha$ -naphthoflavone
NF-kB :	Nuclear factor-kappa B
NMC :	Cellules non myocytaires
P450 :	Cytochrome P450
P :	Produit
PB :	Phénobarbital
PBPK :	<i>Physiologically-based pharmacokinetic model</i>
PET :	Tomographie par émission de positron
OD :	Odds Ratio
Q :	Débit
r :	Coefficient de corrélation
rhCYP450 :	Recombinant Humain CYP450
ROS :	<i>Reactive oxygen species</i>
Rx :	Médicament
RS :	Réticulum Sarcoplasmique
S :	Substrat
[S] :	Concentration de substrat
sEH :	Époxyde hydrolase soluble
SNP :	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polymorphisme nucléotidique unique)
SLC :	<i>Solute Carrier</i>
t :	Temps
T :	Thymine
Thr :	Thréonine
TNF :	<i>Tumor necrosis factor</i>



TNP :	Nucléotide triphosphopyridine
$\mu$ :	Micro
$\mu\text{M}$ :	Micromolaire
UGT :	UDP glucuronosyltransférase
UDP :	Uridine diphosphate
v :	Vitesse
V :	Volume
Val :	Valine
Vd :	Volume de distribution
VKORC1 :	Complexe enzymatique vitamine K époxyde réductase
$V_{\text{max}}$ :	Vitesse maximale de réaction
x :	Ordre de réaction
X :	Quantité de médicament

*La science est l'asymptote de la vérité. Elle approche sans cesse et ne touche jamais-*  
*(Victor Hugo. William Shakespeare- L'art et la science)*

# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Dr. Jacques Turgeon pour la confiance que vous m'avez accordée pendant toutes ces années dans votre laboratoire. J'ai appris par des techniques rigoureuses la science véritable prônée par vos compétences exceptionnelles. Jumelé à une équipe dynamique, votre laboratoire est stimulant pour tout étudiant voulant acquérir une identité scientifique. Merci, grâce à votre confiance et sincérité je saurai maintenant faire preuve de l'autonomie scientifique que je recherchais. Je serai toujours reconnaissante de votre encadrement de qualité remarquable.

Je remercie les membres du Jury qui ont pris le temps de lire avec un regard critique cette thèse de doctorat. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier Dr. Véronique Michaud qui a su m'épauler et m'aider à travers toutes les étapes que j'ai pu avoir au cours de mes études. Merci de ta grande disponibilité et ta profonde compréhension de la science. Sois assurée que ma reconnaissance est infinie.

Je veux aussi remercier Mme Fleur Gaudette et M. François Bélanger pour leur contribution à ce projet de recherche ainsi que nos nombreux échanges sur l'irrégularité de certains résultats obtenus durant toutes ces années qui furent l'objet de plusieurs discussions stimulantes. Ce fut une collaboration sympathique pour laquelle je suis très reconnaissante. Fleur, un merci particulier pour ton aide durant ces 7 années de recherche qui sans toi n'auraient été ce qu'elles sont devenues.

Je tiens à remercier la Faculté de Pharmacie ainsi que le centre de Recherche d'avoir fait confiance à mon profil d'étudiante et de m'avoir fourni les outils nécessaires pour réaliser mes recherches dans un environnement stimulant. Je tiens à remercier Chantal Saint-Cyr de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour sa collaboration dans l'obtention des échantillons de cœurs humains.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire Jennifer, Henry, Sarah, Alexia, Catherine pour votre amitié et partage de moments autant scientifiques qu'amusants. Je tiens à remercier particulièrement Sophie et Andréa qui furent mes deux plus grandes supportrices de laboratoire tout au long de ces années. Ces amitiés resteront.

Finalement, je désire souligner mon infinie reconnaissance à ma famille et mes ami(e)s (Audrey, Audrey, Jean-François, Marianne, Éric) proches qui ont su accepter mon choix de persévérer aux études graduées, qui m'ont supportée et épaulée sans condition tout au long de mon cheminement.

## L'avant-propos

L'intestin et le foie représentent les organes principaux exprimant un éventail caractéristique d'enzyme de la grande famille des CYP450s. Selon la pharmacocinétique classique, ces deux barrières physiologiques régissent, avec l'aide des CYP450s, la concentration moyenne d'un médicament retrouvée dans le sang et par le fait même celle associée, de façon conceptuelle, à l'effet sur une cible visée. La notion d'unicité de la cible est généralement un concept théorique qui en pratique se traduit rarement par un seul effet sur une seule cible. Une deuxième notion est le concept d'effet sur la cible. Un effet peut être thérapeutique, neutre ou toxique. Ainsi, l'expression variable des CYP450s au niveau des barrières physiologiques est une cause sous-jacente à la variabilité dans la concentration plasmatique des médicaments.

Ces concepts permettent d'émettre l'hypothèse que chaque cible possède des caractéristiques particulières et distinctes de gestion d'un médicament s'y présentant. Au niveau extra-intestinal et hépatique, l'expression de différentes isoenzymes des CYP450 peut aussi jouer un rôle au niveau des concentrations intra-tissulaires locales d'un médicament. La gestion locale d'un médicament peut s'étendre à tous les organes parce qu'ils possèdent les mêmes composantes primaires (cellules endothéliales, sang afférent et efférent, veines, artères, transporteurs et enzymes). On accorde donc une importance particulière à chaque organe impliqué dans la gestion d'un médicament de façon indépendante à celle du foie et de l'intestin.

Le métabolisme par les isoenzymes exprimés au niveau du tissu ventriculaire du cœur humain représente la pierre angulaire de cette thèse. Le dessein de cette thèse est d'établir l'importance des CYP450s dans la gestion locale des médicaments-substrats au niveau des cellules des ventriculaires cardiaques de patients avec cardiomyopathies. Cette thèse est issue de travaux réalisés dans le cadre d'un programme de recherche financé par les Instituts de Recherche en Santé du Canada, et ce sont étalé de 2010 à 2015. Ce programme de recherche avait pour objectif long terme de caractériser le rôle des différentes isoenzymes exprimés dans le cœur humain, d'identifier les sources sous-

jaçentes à la variabilité dans leur expression et activité chez des patients avec cardiomyopathies sévères et ainsi établir les cibles importantes à prendre en considération lors d'une thérapie personnalisée. Nous pensons que le métabolisme par les CYP450s exprimés par les cellules du cœur, majoritairement les cardiomyocytes, module les concentrations de médicaments intracellulaire et par le fait même l'action de ceux -ci. Cet effet est d'autant plus sérieux lorsque la liaison du médicament est intracellulaire (cytoplasmique), endroit où les CYP450s sont majoritairement exprimés et effectuent leur action de métabolisme. Cette prémisse représentait l'hypothèse centrale du programme de recherche.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse se spécialisent dans une sphère de ce programme de recherche voulant établir 1) la présence significative de métabolisme envers des substrats sélectifs des isoenzymes exprimées au niveau du tissu cardiaque et envers des médicaments à action thérapeutique ou toxique connue se manifestant au niveau du cœur ainsi que 2) l'impact de la variabilité dans l'expression et dans le comportement enzymatique dans le métabolisme de substrat-marqueur de CYP450s. Ce programme fût développé par le Laboratoire du Dr. Jacques Turgeon localisé à l'Hôtel-Dieu (2010-2015) et au nouveau CRCHUM (2015-2016) en collaboration avec la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal. Ces travaux de recherche ont voulu établir la présence et quantifier l'importance du métabolisme par les CYP450s dans les cellules de ventricules de cœurs humains. Un premier volet fût de développer des cocktails médicamenteux afin de maximiser la quantité de résultats à travers l'usage unique d'un tissu. De façon concrète, il s'agissait d'incuber plusieurs substrats médicamenteux 1) démontrés pouvant cibler qu'une seule isoenzyme (sélectivité) en particulier présente dans le tissu cardiaque tout en ayant préalablement établie 2) l'absence d'interaction entre les substrats (inhibition, activation) et ce dans un 3) milieu optimal (effet de tampon). L'utilité principale du développement de ce premier volet était de permettre l'usage concomitant de substrats-sélectifs envers différentes isoenzyme du CYP450s dans des tissus dont la quantité est souvent restreinte ou petite de par leur accessibilité (tissu nécessitant d'être pris en charge lors de transplantation afin de conserver l'intégrité physique des tissus), de par leur petit volume et

majoritairement de par leur faible quantité disponible. Ce premier projet a permis d'explorer la réponse métabolique du tissu cardiaque lorsque mis en présence de différents médicaments substrats-sélectifs des CYP450s. Cette réponse métabolique fût approfondie dans le cadre du deuxième volet de cette thèse qui avait pour objectif principal de d'étudier le profil métabolique complet des substrats-sélectifs étudiés au cours du premier projet, et ce sous forme de cocktail médicamenteux. Finalement, le dernier volet de cette thèse démontre l'influence de facteurs connus (extrinsèques et intrinsèques, dont le polymorphisme du CYP2J2\*7) dans des cœurs explantés de patients avec cardiomyopathies et leurs implications dans la variabilité de l'expression du CYP2J2 et de sons activité enzymatique, déduite par l'étude du comportement métabolique du substrat-marqueur ébastine par l'analyse de ses paramètres de cinétique enzymatique ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) et le paramètre dérivé clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ). Les conclusions de ces travaux de recherche participent à la compréhension des mécanismes sous-jacents à la variabilité métabolique locale au niveau cardiaque et participent à l'essor du domaine de la thérapie personnalisée.

*The action of a medicine on one organ rather than on another is accounted for on the chemical hypothesis, by assuming the existence of unequal affinities of the medicinal agent for different tissues.*

- Jonathan Pereira, *The Elements of Materia Medica*, **1854**

# **Chapitre 1 : Introduction**



## 1.1 Mise en contexte

Le développement de médicaments efficaces et sécuritaires pour prévenir, traiter ou soulager les symptômes d'une maladie relève d'un effort scientifique considérable. Les différentes causes sous-jacentes à une maladie ainsi que les caractéristiques uniques de chaque individu ont démontré au fil du temps que les réponses thérapeutiques et toxiques d'un individu à un traitement variaient considérablement. Maîtriser l'équilibre idéal entre la sécurité et l'efficacité d'un médicament pour tous les patients est l'objectif ultime lors du développement d'un nouveau médicament. Le taux d'efficacité des médicaments n'atteint que généralement 50-75%<sup>1</sup> pour la majorité des classes thérapeutiques, une déconcertante réalité soutenue par l'important taux d'effets indésirables générés par les quelques milles entités chimiques approuvés par la FDA dont 16% ont une mise en garde de toxicité grave (encadré noir).<sup>1</sup> Les 25 à 50% des patients qui ne répondent pas tel qu'attendu aux thérapies, de façon efficace et sécuritaire, rendent réel le concept de variabilité interindividuelle.<sup>2</sup>

Aux États-Unis, de 1999 à 2006, les taux de mortalité annuels dus à des effets secondaires suivant la prise de médicaments variaient de 0,08 à 0.12 par 100 000 habitants.<sup>3</sup> Les effets secondaires causeraient la mort de plus de 150 000 personnes par année globalement (0.002% de la population mondiale) avec un taux de 2,2 morts / 100 000 habitants, 18% plus élevé que le taux de mortalité relié aux troubles de dépendances aux drogues (1,8 morts / 100 000 habitants).<sup>4</sup> À cela s'ajoute les effets secondaires nécessitant des visites à l'urgence ou des hospitalisations suite à une mauvaise utilisation des médicaments ou à des interactions médicamenteuses. Une étude canadienne a démontré que 12 % des visites à l'urgence étaient reliées à des effets causés par l'utilisation de médicaments.<sup>5</sup> Le plus étonnant des résultats de cette étude est à l'effet que 68% de ces visites auraient pu être évitées par une meilleure gestion d'utilisation des médicaments.<sup>5</sup>

Les facteurs impliqués dans la variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments proviennent de sources intrinsèques (âge, ethnie, dysfonction d'un organe,

maladie, grossesse, genre, génétique, etc) ou extrinsèques (interactions médicamenteuses, environnement, interventions médicales, l'utilisation de drogues ou d'alcool, diète, cigarette, stress et exercice).<sup>2</sup> Ultimement, ces facteurs auront un impact sur le devenir du médicament tout au long de son passage à travers l'organisme. Sachant que les CYP450s contribuent à environ 75%<sup>6</sup> du métabolisme des médicaments et que l'élimination par métabolisme représente environ 75%<sup>6</sup> des mécanismes de clairance par rapport à 20% par voie rénal et 10% par la bile sous forme inchangée, il est logique de s'attarder aux facteurs influençant le premier passage entéro-hépatique qui impliquent les CYP450s. L'abondance et les variétés des CYP450s exprimés dans le foie sont différentes de celles retrouvées dans les tissus extrahépatiques (intestin, rein, cœur, poumons, placenta, etc).<sup>7-10</sup> Une variation dans l'expression locale des CYP450s pourrait influencer la disposition (concentrations locales) et par le fait même l'effet d'un médicament localement.

Par exemple, la transformation d'un médicament en métabolite, parfois toxique, par les CYP450s de manière tissu-spécifique témoignent d'une gestion distincte de celle observée par l'intestin et le foie lors du premier passage entéro-hépatique.<sup>11</sup> Les concentrations générées par le premier passage entéro-hépatique sont quantifiables dans le plasma (serum) de la circulation générale. Par contre, le concept moderne de concentrations libres tissulaires participe au phénomène voulant que les concentrations libres plasmatique soient différentes que les concentrations libres tissulaires, ajoutant au fait que des mécanismes locaux (tissus-spécifiques) participent à la gestion locale des concentrations d'un médicament. Les CYP450s font ainsi parties des agents pouvant gérer localement les concentrations d'un médicament. Par exemple, les médicaments utilisés dans le traitement du VIH ciblent de façon spécifique les cellules PBMC et des études ont démontré que les concentrations intracellulaires étaient parfois plus grandes que dans le plasma.<sup>12</sup> Ceci suggère que des mécanismes, autre que le premier passage hépatique, participent à la gestion locale de médicaments. Les principaux mécanismes sont la perméabilité (transporteurs), la liaison aux protéines et le métabolisme (enzymes). Ainsi, les CYP450s, exprimés localement, deviennent un facteur responsable de l'enjeu voulant que les concentrations plasmatiques soient différentes que les

concentrations tissulaires. De plus, l'expression variable des CYP450s dans les tissus extrahépatiques pourrait être associée à la variabilité dans le devenir local d'un médicament. Ces deux principaux enjeux ont défini la question de recherche : Les isoenzymes de la superfamille des CYP450 dans les cellules du cœur humain participent-elles à une gestion locale des concentrations de composés endogènes ou exogènes (médicaments) et par le fait même à la variabilité associée dans la réponse locale aux médicaments?

Cette question de recherche représente l'objectif global auquel cette thèse souhaite répondre. L'intérêt est majeur considérant que l'arrêt du développement d'un médicament impliquerait les CYP450s à 44% des occasions. Comprendre les sources responsables de la variabilité interindividuelle associée à l'activité des CYP450s sur la réponse des médicaments permettrait de catégoriser les sous-groupes de patients à risque de réagir différemment et ainsi contribuer au développement de thérapies individualisées.

Bref, atteindre, en quantité suffisante, la circulation systémique pour ensuite être diffusé aux entités biologiques cibles afin d'y exercer un effet représente le parcours d'un médicament entravés de barrières physiologiques définissant le rôle protecteur du corps humain face aux corps étrangers. Il est essentiel de comprendre les interactions entre le corps humain et les médicaments pour prévenir et minimiser les effets non recherchés (diminution d'efficacité, toxicité) et optimiser ceux attendus. Cette compréhension débute par l'habileté d'appliquer les concepts fondamentaux de pharmacocinétique.

## 1.2 Principes généraux de pharmacocinétique : ADME

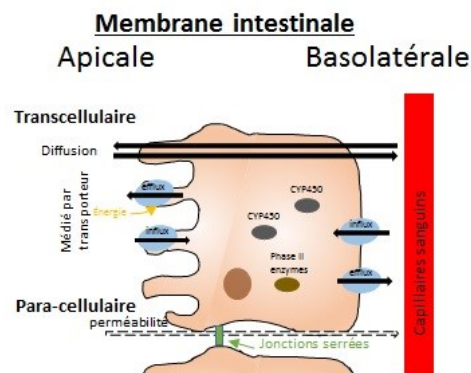
La pharmacocinétique (du grec *pharmakon* ; médicament, *kinêsis* ; vitesse) étudie le mouvement d'un composé<sup>1</sup> à travers les fluides, tissus, et excréta biologiques de l'organisme.<sup>13</sup> Cette évolution du déplacement d'un composé à travers le corps s'exprime mathématiquement afin de décrire quantitativement les processus inter-reliés d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME).<sup>13</sup> La pharmacodynamie décrit l'action d'un composé sur le corps humain. Ultimement, la corrélation des paramètres pharmacocinétiques avec l'effet pharmacologique (pharmacodynamie) permet d'obtenir le profil pharmacologique clinique d'une molécule.<sup>14</sup> Les différentes propriétés physicochimiques d'une forme galénique et d'un principe actif tel que la lipophilicité, le degré d'ionisation en fonction du pH, le poids moléculaire ainsi que la solubilité peuvent aussi influencer les interactions avec les différents milieux/membranes biologiques que le composé devra traverser pour se rendre à la circulation générale et être distribué aux différents organes.<sup>14</sup>

Tout d'abord, l'absorption définit la somme des processus impliqués lors du passage d'un médicament de son site d'administration jusqu'à son apparition dans la circulation générale.<sup>14</sup> Un médicament est généralement quantifié dans le plasma qui est obtenu par prélèvement sanguin. Lorsqu'administré de façon entérique (orale, sublinguale ou rectale) un médicament sera premièrement exposé à l'appareil digestif (tractus gastro-intestinal).<sup>14</sup> Celui-ci regroupe l'œsophage, l'estomac et l'intestin (grêle, colon et rectum). Tout le long du tractus gastro-intestinal, un gradient de pH favorise le fonctionnement optimal de la flore conservant ainsi l'homéostasie cellulaire des muqueuses de la paroi.<sup>15</sup> L'estomac, ayant un pH variant de 1,5 à 5, dégrade les éléments ingérés par l'activité des sucs gastriques actifs à pH acide (enzymes, bactéries, acide chlorhydrique).<sup>15</sup> Une molécule ayant résisté au passage gastrique sera d'abord déversée dans la partie débutante de l'intestin grêle, le duodénum, suivi du jéjunum (pH 7-8).<sup>15</sup> La paroi de la lumière intestinale (paroi apicale), conçue en forme de villosités,

---

<sup>1</sup> Un composé, substance ou molécule, dans le contexte de cette thèse, réfère à toute molécule endogène synthétisée par l'organisme ou exogène dont les médicaments (substance possédant des propriétés thérapeutiques ou prophylactiques, destinées à guérir, à soulager ou à prévenir des maladies chez l'humain).

expose la bordure en brosse des entérocytes (microvillosités).<sup>16</sup> L'intestin grêle est le lieu où la majorité des médicaments sont absorbés grâce à la très grande surface de contact des médicaments avec la paroi intestinale.<sup>17</sup> Les entérocytes expriment des transporteurs membranaires sur le pourtour de leur membrane apicale et basolatérale, responsables du transport d'influx et d'efflux des médicaments.<sup>18</sup> La présence d'enzymes de métabolisme de phases I et II à l'intérieur de l'entérocyte participent aussi au processus d'absorption d'élimination des médicaments (Figure 1). L'interaction des médicaments avec les protéines de transport ou de métabolisme est entre autres favorisée par les propriétés physicochimiques de la molécule. Un médicament très hydrosoluble ne pourra pas diffuser librement au travers des membranes cellulaires formées d'une bicouche phospholipidique ce qui en fera un substrat potentiel pour les transporteurs membranaires.<sup>19</sup> À l'inverse, un médicament liposoluble pourra diffuser librement à travers les membranes cellulaires.<sup>19</sup>



**Figure 1.** Schéma d'un entérocyte avec ses microvillosités exposant les différents mécanismes (transporteurs et enzymes) impliqués lors du passage du côté apical à basolatéral et vice versa. (Image réalisée par Jade Huguet)

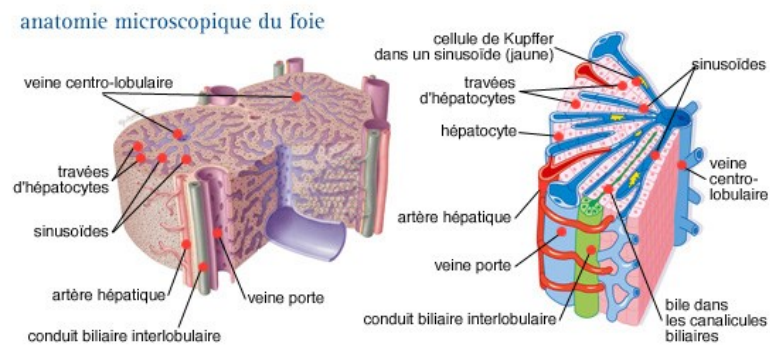
En général, les deux superfamilles de transporteurs membranaires les plus impliquées dans le passage transmembranaire des médicaments sont les transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et SLC (*solute carrier*).<sup>20,21</sup> Les transporteurs de la famille ABC sont des transporteurs primaires ou directs de par l'utilisation d'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP).<sup>20</sup> Ces transporteurs peuvent fonctionner contre un gradient de concentrations.<sup>22</sup> Inversement, la famille des transporteurs SLC sont des transporteurs actifs secondaires (uniport/symport/antiport) ou indirects n'utilisant pas directement l'ATP.<sup>23</sup> Les transporteurs SLC et ABC sont

majoritairement exprimés sur les membranes des entérocytes, des hépatocytes, des cellules du tubule rénal proximal, des capillaires du cerveau au niveau de la barrière hématoencéphalique ainsi qu'au niveau des cardiomyocytes.<sup>23,24</sup>

Le métabolisme des médicaments, quant à lui, est généralement divisé en deux phases distinctes initialement décrites en 1930 par le chercheur R.T. Williams.<sup>25</sup> La phase I, irréversible, est caractérisée par une capacité de réaction d'oxydation, réduction, ou hydrolyse (estérase et amylase) des composés par l'ajout d'un groupement fonctionnel (réactif et/ou polaire).<sup>26</sup> Les réactions de phase I sont majoritairement effectuées par les CYP450s suivies des flavines monooxygénases (FMO), des monoamines oxydases (MAO), des carboxyestérases (CE), des aldéhyde oxydases (AHO), de la glutathione-S-transférase (GSH) et des déshydrogénase (DSH).<sup>27</sup> La phase II, réversible, conjugue le groupement fonctionnel initialement ajouté lors de la phase I ou tout autre groupement fonctionnel déjà présent avec un composé endogène par réaction de glucuronidation, d'acétylation ou de sulfatation ce qui rend la molécule, dès lors plus polaire, moins toxique et active pour l'organisme facilitant d'autant plus son élimination.<sup>28</sup> Une description détaillée des enzymes de métabolisme est effectuée à la section 1.5 de l'introduction. Les enzymes participent, entre autres, à la détoxification du corps humain exposé à des corps étrangers.

Les médicaments non modifiés suite à leur passage à travers les cellules épithéliales de l'intestin passeront vers les capillaires sanguins adjacents pour circuler dans la veine porte jusqu'au foie.<sup>29</sup> Arrivé au foie, le médicament circulant dans le sang veineux portal (80%), mélangé au sang artériel (20%) de l'artère hépatique, progresse dans les sinusoides (

**Figure 2).**<sup>29</sup>



**Figure 2.** Coupe de deux lobules hépatiques (gauche). Vue anatomique d'une moitié d'acinus hépatique détaillant la triade portale (veine porte, artère hépatique et conduit biliaire) (droite). (Reproduit avec permission du site web d'ARCAGY, Oncologie médicale Hôpital de l'Hôtel Dieu, Paris<sup>30</sup>)

Ce réseau de vaisseaux sanguins est formé de cellules endothéliales fenêtrées favorisant une grande perméabilité entre le sang circulant et les hépatocytes.<sup>31</sup> Le médicament peut alors se distribuer dans l'hépatocyte ou continuer son chemin vers la veine hépatique. La distribution d'un médicament dans l'hépatocyte résulte des mêmes mécanismes de transport et de métabolisme enzymatique que dans l'entérocyte. À l'intérieur de l'hépatocyte, le médicament peut, là aussi, être transformé en composé plus polaire par les enzymes de phases I et II.<sup>32,33</sup> Par la suite, le médicament, transformé ou non, transfère soit dans les sinusoides où il circulera vers la veine hépatique ou se déverse dans le canal biliaire pour retourner dans l'intestin. Ce transfert du médicament s'effectue, encore une fois, par diffusion passive ou avec des transporteurs membranaires situés sur la membrane basolatérale ou apicale (canaliculaire) des hépatocytes.<sup>32</sup> De la veine hépatique, le médicament passe dans la circulation cœur-

poumon pour ensuite être distribué, par la circulation générale, aux différentes entités biologiques (poumons, reins, viscères, gras, muscles, cœur et autres). Ainsi, la quantité de médicament atteignant la circulation générale ayant préalablement passée à travers la barrière intestinale et hépatique est définie par l'effet de premier passage entéro-hépatique. Le processus d'absorption des composés administrés par voie autre qu'entérique (pulmonaire, percutanée, parentérale ou locale) peut aussi provoquer une perte quant à la quantité administrée versus celle quantifiée dans la circulation sanguine (plasma) à cause des membranes biologiques à travers lesquelles le médicament doit traverser sans pour autant traverser l'intestin et le foie.

La quantification des concentrations plasmatique (circulantes) d'un médicament est la méthode la plus utilisée en pharmacologie clinique pour évaluer la pharmacocinétique d'un médicament. Il implique que le corps humain distribue de façon homogène le médicament à travers les différents tissus et par la quantification des concentrations plasmatiques, il est possible de dériver les paramètres cinétiques d'un médicament et ainsi déterminer son profil de distribution et d'élimination ainsi que son profil de toxicité. Le projet de recherche présentée dans cette thèse fait appel au concept controversé, nouveau et complexe que les concentrations plasmatiques ne sont pas toujours le reflet de celle tissulaire dont les mécanismes régissant leur distribution locale sont les même que dans l'intestin et au foie mais les joueurs sont exprimés en quantité variable et souvent différente que ceux reconnus être exprimés lors du premier passage hépatique.

La biodisponibilité (F) représente la vitesse et l'étendue de la dose administrée atteignant la circulation générale et permet d'interpréter les phénomènes associés à la différence entre la quantité administrée par rapport à celle quantifiée dans la circulation générale.<sup>14</sup> Lors d'une administration orale, la fraction délivrée de la forme galénique qui se solubilise dans la lumière intestinale (f), la fraction absorbée par l'entérocyte ( $f_{\text{intestin}}$ ) et la fraction déversée dans la veine hépatique ( $f_{\text{foie}}$ ) sont trois points de contrôle pouvant influencer la biodisponibilité selon l'équation  $F=f*f_{\text{intestin}}*f_{\text{foie}}$ .<sup>14</sup> Par exemple, un composé s'étant dissous dans le milieu intestinal à 100%, peut être absorbé et transféré sans métabolisme par les entérocytes à 50% ( $f_{\text{intestin}}=0.5$ ) alors qu'au foie il



peut être quasi totalement éliminé via la bile sous forme inchangé dont seulement 10 % de la dose absorbée (0.5) sera déversée dans la veine porte ( $f_{\text{foie}}=0.1$ ), donnant une biodisponibilité globale de  $F=0.05$  (5%).

Afin de calculer la biodisponibilité, l'aire sous la courbe (ASC) est le paramètre essentiel devant être calculé. L'addition des surfaces sous le tracé d'une courbe représentant les concentrations en fonction du temps entre chaque intervalle de temps définie permet le calcul de l'ASC selon la formule générale suivante:

$$ASC = \sum \frac{(C_i + C_{i-1})}{2} \times (t_i - t_{i-1}) = \int_0^{\infty} C \cdot dt$$

Moyenne des concentrations
Intervalle de temps

L'ASC représente la concentration moyenne de médicament exposée à l'organisme dans un intervalle de temps donné.<sup>14</sup> Ainsi, la biodisponibilité absolue est obtenue par le ratio de l'ASC d'un médicament administré par voie extravasculaire sur l'ASC intraveineux de ce même médicament à la même dose.<sup>14</sup> Un ratio inférieur à l'unité suggère qu'une partie du médicament n'atteint pas la circulation systémique et est éliminée en cours de route. L'enjeu des compagnies pharmaceutiques développant des composés administrés oralement est de contrôler la biodisponibilité permettant ultimement d'obtenir des concentrations plasmatiques optimales pour l'atteinte d'un effet recherché.

Une fois rendu dans la circulation générale, le médicament poursuit sa route en étant distribué dans les organes et tissus du corps humain. La distribution se décrit par le transfert réversible d'un médicament entre la circulation systémique (site de prélèvement) et le reste de l'espace corporel disponible.<sup>13,14</sup> [ENREF 2](#) La distribution des médicaments est représentée mathématiquement par le paramètre du volume de distribution (Vd). Ce paramètre permet d'évaluer le volume apparent (non réel) dans lequel une dose d'un médicament devrait se dissoudre selon une concentration plasmatique mesurée. Suite à une administration intraveineuse rapide (bolus), il est possible de calculer ce paramètre en divisant la dose administrée (D) par la

concentration initiale dans le plasma ( $C_0$ ) dérivée de l'équation  $Vd = D/C_0$ .<sup>14</sup> Plus la concentration mesurée dans le plasma est petite, plus le volume sera grand, c'est-à-dire, plus le médicament se distribue ailleurs que dans le plasma.

Ultimement, le médicament sera éliminé de l'organisme. L'élimination décrit la perte irréversible d'un médicament de façon inchangée (excrétion) ou par biotransformation (métabolisme).<sup>14</sup> Tous ces phénomènes impliquent l'extraction irréversible des composés inchangés ou modifiés par métabolisme à travers différents éléments cellulaires en fonction du débit sanguin. Ainsi, l'efficacité d'un organe à extraire un médicament permet de définir le concept de clairance (CL).

### 1.3 Concentrations intracellulaires

En pharmacologie clinique, la mesure des concentrations circulantes représente la capacité générale du corps à gérer la dose administrée. Le corps représentant le compartiment général est mis en relation avec les concentrations circulantes et le profil d'exposition par rapport au temps (PK : concentration-temps) et par rapport à l'effet (PD : concentration-effet) est établi. La gestion des concentrations circulantes, particulièrement leur élimination est un indice du corps à se détoxifier. La clairance totale est le paramètre mathématique permettant caractériser la variation des concentrations circulantes à l'échelle globale du corps humain. Les variations d'exposition systémique (aire sous la courbe), sont critiques en pharmacologie clinique car elles prédisposent à des changements dans la prédiction des effets attendus. Ce concept est appuyé par les principes que la réponse pharmacologique soit proportionnelle aux concentrations au site d'action étant elles-mêmes proportionnelles à l'effet recherché.<sup>14,34-36</sup> Deuxième principe, les concentrations plasmatiques déterminent l'intervalle posologique créé par l'administration de dose définie de médicament.<sup>37,38</sup> Ainsi, la relation entre les concentrations plasmatiques et l'effet recherché est depuis longtemps l'indicateur classique en pharmacologie clinique démontre généralement une bonne corrélation.<sup>37</sup> Ce phénomène décrit le concept d'homogénéité cinétique, dont le corps humain représente le compartiment où se distribue le médicament et guide les assumptions émises en pharmacologie clinique. À noter que les concentrations circulantes

peuvent être liées ou non à des protéines plasmatiques et se sont les concentrations libres qui diffusent à travers les membranes, transportées, métabolisées ou qui sont susceptibles de se lier à des récepteurs générant un effet.<sup>14</sup>

De récentes recherches ont mis à l'épreuve ce concept bien établi d'homogénéité cinétique lorsqu'il fut démontré qu'un manque de corrélation pouvait exister entre les concentrations plasmatiques et l'effet observé suggérant que les concentrations au site d'action ne soit pas toujours corrélées avec les concentrations plasmatiques.<sup>39,40</sup> Ainsi, le paramètre  $K_p$  (coefficient de partition) fut introduit<sup>41</sup>, soit le ratio entre les concentrations tissulaires et plasmatiques, afin de catégoriser les médicaments potentiellement susceptibles de contrevenir au principe classique de pharmacologie clinique, i.e., que les concentrations plasmatiques dictent les concentrations tissulaires et par le fait même l'effet du médicament.<sup>42</sup> Le concept que les concentrations tissulaires peuvent être différentes que celles plasmatiques fut l'objet de plusieurs recherches mais la découverte que les mêmes protéines de transports et de métabolisme étaient exprimées au niveau tissulaire favorisait l'hypothèse que de façon tissu-spécifique une gestion locale du médicament pouvait avoir lieu, d'autant plus que les concentrations tissulaires avaient également été démontrées être occasionnellement plus grande que dans la circulation générale.<sup>43</sup> Iwatsubo et collègues et Turncliff et collègues ont travaillé à démontrer un ratio de concentrations intracellulaires/extracellulaires plus grand que 1.<sup>44,45</sup> Cusato *et collègues*, a travaillé sur les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et a démontré un ratio PBMC/plasma supérieur à 1 (~2.59).<sup>46</sup>

Parmi les enzymes reconnus être exprimés dans des tissus extrahépatiques, les enzymes du CYP450 furent localisées, elles aussi, au niveau des poumons, des reins, du cerveau et plusieurs autres tissus.<sup>11,47</sup> Par ailleurs, plus de 30% des cibles thérapeutiques sont intracellulaires et de celles-ci, 1.9% sont représentées par les CYP450.<sup>48</sup> Comprendre le comportement des CYP450 au niveau intracellulaire dans les tissus extrahépatiques représente ainsi une avenue pertinente en recherche et fut une des raisons du développement de l'hypothèse de recherche de cette thèse de doctorat.

[ENREF 38](#) Ainsi, démontrer au niveau intracellulaire l'implication des CYP450

comme joueur dans le devenir local d'un médicament au niveau *in vivo* est l'objectif ultime du projet recherche global joignant ce projet de thèse de doctorat. Évidemment, mesurer de façon précise, chez l'humain, la concentration intracellulaire en temps réel est irréalisable dans le contexte actuel. Ainsi, *in vitro*, avec des modèles d'extrapolations *in vivo*, il serait possible de démontrer leur implication locale. Ainsi, cette thèse se concentre particulièrement sur le tissu cardiaque, des ventricules (cellules de la paroi musculaire du myocarde) et considère le compartiment ventriculaire (gauche ou droit) comme une entité similairement capable de gérer des concentrations de médicaments que le corps humain entier. Ainsi chaque cellule de la paroi myocardique qui expriment des CYP450 pourrait être doté d'une capacité métabolique et par le fait même de clairance.

## 1.4 Clairance

La clairance est un concept qui a évolué depuis près de 100 ans en étant tout d'abord introduit pendant la première Guerre Mondiale où des chercheurs de l'Université de Stanford à San Francisco ont étudié l'excrétion de l'urée par le rein.<sup>49</sup> À cette époque, le terme clairance n'existait pas mais le concept d'élimination par le rein d'un composé organique, comme l'urée, fût étudié afin de comparer la variabilité entre les individus.<sup>49</sup> Une première tentative de calculer la fonction éliminatoire du rein fût d'utiliser le ratio du nombre de gramme d'urée dans l'urine en 1 heure par le nombre de gramme d'urée dans 100 centimètre cubique (cc) de sang (équivalent à 100 ml).<sup>49</sup> Ce modèle rudimentaire fût suivi par de nombreuses études sur la clairance de l'urée par Eggert Möller.<sup>50</sup> Vers 1928, une formule plus élaborée basée sur le volume urinaire a servi comme modèle jusqu'en 1948. Au même moment, la compréhension de la cinétique de substances administrées dans le corps humain faisait un pas de géant avec les recherches de Teorell.<sup>51</sup> Ce n'est qu'en 1948 que Lewis a décrit une première formule de clairance hépatique fractionnaire, qu'il raffina en 1950 afin d'être utilisée comme outil de prédiction d'élimination de composés lors de maladies hépatiques.<sup>52,53</sup> Bien qu'utile, le modèle de Lewis n'était pas parfait. Il décrivait un ratio d'extraction et non une capacité exprimée sous forme de débit (volume / temps). En 1949, Dr. Friedrich Hartmut Dost publie un article où il définit une loi d'élimination générale (Die Clearance<sup>54</sup>) et en 1953

son traité décrira pour la première fois le terme pharmacocinétique (p.244 de son traité le 'blood level' [Der Blutspiegel]).<sup>55-57</sup> La séparation linguistique et géographique de Dost et Lewis permis au Dr. Hoenig et Schück de combiner leurs travaux et de définir pour la première fois la clairance comme le ratio de la dose (D) sur l'aire sous la courbe ( $CL=D/ASC$ ).<sup>55</sup> Il s'agissait pour la première fois d'avoir une méthode de calcul de la clairance sans pour autant avoir accès à la bile afin de quantifier ce que le foie excréta. D'ailleurs, tel que déjà soulevé en 1950, il ne s'agissait pas seulement de pouvoir quantifier ce qui était excrété dans la bile mais aussi de pouvoir calculer l'élimination du composé par métabolisme.<sup>53</sup>

Tout au long du développement des concepts de clairance la définition de celle-ci est toujours restée la même; volume virtuel de sang complètement épuré d'un composé pendant un intervalle de temps.<sup>14</sup> Une étude mathématique plus rigoureuse fût de mise afin d'établir des équations mathématiques pour décrire différents phénomènes de clairance et approfondir ce concept. C'est ce que plusieurs chercheurs ont fait entre les années 1960 et 80.<sup>58</sup> Il fût donc possible de décrire, par un modèle mathématique, le concept de clairance d'un organe ou réservoir perfusé par le sang, défini antérieurement par Dost et Lewis.<sup>59</sup>

#### **1.4.1 Conceptualisation mathématique de la Clairance**

La subtilité existante dans l'équation de la clairance est représentée par le quotient entre une vitesse de disparition d'une quantité (unité : masse) et la vitesse de disparition d'une concentration (unité : masse / volume). Le rapport entre une quantité et une concentration crée la caractéristique unique du paramètre de clairance, soit de quantifier l'efficacité d'épuration d'une entité biologique de par ses unités de débit. Ainsi, il s'agit de l'unique paramètre représentant la capacité d'une entité biologique (organe, corps humain) d'épurer un volume de sang d'une quantité définie d'un composé durant un intervalle de temps donné. Une entité biologique, perfusée par un volume constant, extrait une quantité de médicament définie à chaque intervalle de temps.<sup>55,59</sup> Initialement, la clairance urinaire fût utilisée pour développer les modèles de

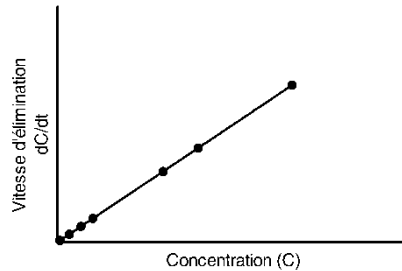
clairances.<sup>60-64</sup> La simplicité de l'équation de clairance abrite différents concepts détaillé dans le tableau suivant.

**Tableau 1.** Équations et concepts menant à l'équation de la clairance systémique.

Concentration (C)	Quantité (X)
$C_{in} \xrightarrow{k} C_{out}$ (Eq. 1) <sup>14</sup>	$X_{in} \xrightarrow{k} X_{out}$ (Eq. 2) <sup>14</sup>
Modèles mathématique de la vitesse de réaction ( <i>rate law</i> )	
Postula 1 : Loi de la conservation de la masse <sup>65</sup> Postulat 2: équilibre dynamique de la perfusion (ratio entre out/in est constant), loi d'action de masse <sup>66</sup>	
$vitesse\ de\ réaction = \frac{\Delta C}{\Delta t} = k \times C^x$ (Eq. 3) <sup>67</sup>	$vitesse\ de\ réaction = \frac{\Delta X}{\Delta t} = k \times X^x$ (Eq. 4) <sup>67</sup>
Le modèle de clairance a été développé en postulant que la cinétique d'un bolus i.v. suivait une cinétique d'ordre 1. L'inconvénient de cette méthode est que si l'intervalle de temps change, la pente peut changer. Il sera donc plus utile de calculer la vitesse instantanée, i.e., lorsque l'intervalle de temps $t$ tend vers 0 ( $\Delta t \rightarrow 0$ ). La pente deviendra alors la vitesse instantanée exprimée par $dC/dt$ au lieu de $\Delta C / \Delta t$ . Compte tenu qu'il serait impossible de mesurer des intervalles de temps infinitésimalement petit, l'équation de la vitesse de réaction, étant une dérivée, est intégrée pour exprimer la concentration en fonction du temps sous forme de fonction exponentielle.	
Dérivée <sup>14</sup> $v = \frac{dC}{dt} = k \times C^x$ (Eq. 5) <sup>14</sup> (x: ordre de reaction)	$v = \frac{dX}{dt} = k \times X^x$ (Eq. 6) <sup>14</sup> (x: ordre de reaction)
Intégrale <sup>14</sup> : $\int_{C_0}^{C_t} \frac{1}{C} \times dC = -k \int_{t=0}^t dt$ (Eq. 7) <sup>14</sup>	$\int_{X_0}^{X_t} \frac{1}{X} \times dX = -k \int_{t=0}^t dt$ (Eq. 8) <sup>14</sup>
Fonction exponentielle <sup>14</sup> : $C = C_0 e^{kt}$ (Eq. 9) <sup>14</sup>	$X = X_0 e^{kt}$ (Eq. 10) <sup>14</sup>
Postulat 3 : Modèle utilisé (physiologique : entité organe ou corps humain) système fermée où le débit de perfusion est constant (débit perfusant est d'ordre 0). <sup>14</sup>	
$X [masse] / V [volume] = C [masse/volume]$ (Eq. 11) <sup>14</sup> Quantité varie de façon proportionnelle aux concentrations	

### CONCEPT

**Plus la concentration/quantité augmente plus la vitesse d'élimination augmente et vice-versa. La vitesse de réaction est directement proportionnelle à la concentration/quantité.**



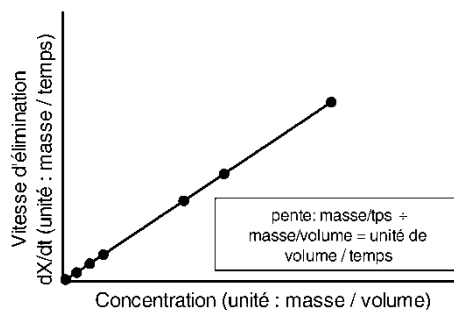
**Figure 3.** Représentation générale de la concentration en fonction de la vitesse d'élimination d'une concentration de médicament suivant une cinétique d'ordre 1 d'un modèle à un compartiment. (image dessinée par Jade Huguet).

Postulat 4 : la quantité de médicament se distribue de façon instantanée dans l'entité biologique<sup>14</sup>

Association d'une concentration à une quantité par l'équation :

$$\text{vitesse d'élimination de } X = \frac{dX}{dt} = k \times X = k \times C \times V = kV \times C \text{ (Eq. 12)}^{14}$$

Compte tenu que V est constant (postulat 3),  $kV$  (pente) est une constante à unité de débit (volume/temps) caractérisant la vitesse de changement d'une quantité en fonction d'une concentration. Fonction cinétique d'ordre 1 (Figure X).



**Figure 4.** Représentation générale de la concentration en fonction de la vitesse d'élimination d'une quantité de médicament suivant une cinétique d'ordre 1 (image dessinée par Jade Huguet).

Cette approche a permis de mathématiser le paramètre de clairance équivalant à la pente ( $kV = \text{clairance}$ ). La clairance est donc représentée par un facteur de proportion entre la vitesse d'élimination (unité : masse / temps) d'un composé et sa concentration (unité : masse / volume)  $v/C = kV$ . À l'instant  $t$ , la capacité d'une entité à éliminer un médicament est définie par l'équation suivante :

$$\text{Clairance}_{(0-t)} = \frac{\left(\frac{dX}{dt}\right)}{C_t} \quad (\text{Eq. 13})^{14}$$

Cette équation différentielle permet de déterminer la clairance instantanée. Encore une fois, il serait impossible de prendre des échantillons à des temps infinitésimalement petit. Ainsi, l'intégrale de  $dX/dt$  et  $C_t$  en fonction du temps, de zéro à l'infini, permet de calculer la capacité globale d'une entité biologique à extraire le médicament selon l'équation:

$$CL = \frac{\int_0^{\infty} \frac{dX}{dt} \times dt}{\int_0^{\infty} C_t \times dt} \quad (\text{Eq. 14})^{14}$$

L'intégration à l'infini de cette équation permet d'obtenir, au numérateur, la quantité totale administrée (dose), et au dénominateur, l'aire sous la courbe (AUC).

$$\text{Clairance} = \frac{\text{Dose}}{\text{AUC}} \quad (\text{Eq. 15})^{14}$$

### 1.4.2 Additivité des clairances

Sachant que différents organes sont dotés d'une capacité éliminatoire, soit par métabolisme où excrétion, le calcul de clairance totale ne permettait pas de distinguer la proportion de chacun. C'est alors que des modèles mathématiques plus rigoureux sont apparus afin de détailler les différentes clairances associées aux différents organes/phénomènes (métaboliques et transporteurs) impliqués dans l'élimination d'un composé. Le concept d'additivité des clairances est fondé sur le fait que les organes épurateurs sont connectés en parallèle.<sup>14</sup>

$$\frac{dX/dt}{c} \text{ total} = \frac{dX/dt}{c} \text{ hépatique} + \frac{dX/dt}{c} \text{ rénale} + \frac{dX/dt}{c} \text{ autre} \quad (\text{Eq. 16})$$

$$\text{Clairance}_{\text{tot}} = \text{Clairance}_{\text{hép}} + \text{Clairance}_{\text{rén}} + \text{Clairance}_{\text{autres (extrahépatiques)}} \quad (\text{Eq. 17})$$



Chaque organe possède son modèle de clairance individualisé et caractéristique. Ce genre de modèle permet de mettre en relation des paramètres physiologiques avec des équations mathématiques de clairance d'un organe.

### 1.4.3 Modèle de clairance

Le modèle de clairance le plus reconnu et utilisé est le modèle 'well-stirred'.<sup>59</sup> L'équation de ce modèle fût présentée par James Gillette et instaurée par Malcolm Rowland en 1973.<sup>59,68</sup> Ce modèle inclus des paramètres mathématiques décrivant et mettant en relation la perfusion d'un organe, la clairance intrinsèque de cet organe et la fixation aux protéines du sang dans une même équation (Eq. 18).<sup>59</sup> De cette façon la capacité épuratrice d'un organe est calculable et mise en proportion avec la clairance totale du corps humain permettant de déterminer les principaux organes responsables de l'élimination d'un médicament. L'équation 18<sup>59</sup> décrit le modèle classique 'well-stirred':

$$CL_{Totale} = Q * E = Q * \frac{f_u * CL_{int}}{Q + f_u * CL_{int}} \text{ (Eq. 18)}^{14}$$

Ce modèle assume que le débit perfusant un organe est constant et que les concentrations libres<sup>40</sup> de médicaments qui diffusent dans l'organe le font de manière instantanée<sup>14</sup> et libre<sup>69</sup> atteignant un équilibre très rapidement.<sup>14</sup> De la même façon que décrit plus haut (Eq. 12), la vitesse de passage d'un médicament dans le corps humain ou dans un organe (compartiment) suit la loi de vitesse d'élimination préalablement définie par  $v = kV * C$ . De façon simple, les concentrations entrantes dans un compartiment le font à une certaine vitesse qui dépend du débit de perfusion de l'organe (Q), de sa propre capacité intrinsèque à éliminer ( $CL_{int}$ ) et de la liaison aux protéines du sang ( $f_u$ ).<sup>14</sup> La constante  $kV$  représente un débit (unité : volume / temps). Le débit de perfusion d'un organe (Q) représente la valeur maximale à laquelle un médicament peut traverser un organe, permettant d'introduire l'équation  $Q = CL/E$  (Eq. 19).<sup>14</sup> Ainsi, le débit d'épuration d'un organe est représenté par une fraction du débit total  $Q * E = CL$ . Cette fraction fût modélisé selon les lois ci-hauts mentionnées et permettent de quantifier cette fraction d'épuration selon l'équation 18.

Une importante notion est le concept d'épuration. Par exemple, un médicament qui s'élimine du foie, c'est-à-dire qui entre par la veine porte ou l'artère hépatique, qui circule dans les sinusoides est considéré être éliminé si 1) il est transformé en métabolite, 2) éliminé par la bile. Ceci implique que la portion de médicament qui traverse le foie sans subir aucun changement et continue dans la circulation systémique ne fait pas partie de la portion éliminée.<sup>14</sup> À l'inverse, d'autres organes fermés (aucune sortie extérieure à la circulation sanguine) auxquels la formule de clairance totale pourraient s'appliquer doit préciser que la portion qui retourne dans la circulation sanguine sous forme inchangée n'est pas considérée 'éliminée'. Compte tenu que ces organes n'ont pas de sortie extérieure à la circulation sanguine (cerveau, cœur, muscles, peau, etc), seule une transformation métabolique est considérée éliminatoire. Par contre, la vitesse d'entrée et de sortie n'impliquant pas de phénomène de transformation (métabolisme), comme les mécanismes saturables de transport (transporteurs membranaires), est quand même caractérisé par ces différents processus impliqués pouvant définir la clairance intrinsèque d'un organe, qui dans ce cas-ci serait plus précisément une capacité de gestion des concentrations locales plus tôt que d'épuration si aucune transformation (métabolisme) y est impliquée.<sup>70</sup>

Bref, l'exposition des cellules d'un organe 'fermé' peut être gérée par un premier facteur limitant, les barrières à l'entrée (transporteurs), suivi du deuxième étant sa capacité interne à gérer le médicament qui inclue la transformation (métabolisme) et la sortie de la cellule (transporteur ou diffusion libre). Toutes ces composantes définissent la clairance intrinsèque de l'organe qui jumelé au débit perfusant vont définir la clairance totale de l'organe ou du corps humain en tant qu'entité.

La section suivante détaille comment l'équation de clairance intrinsèque fût obtenue et de quelle manière elle s'applique dans un contexte de laboratoire *in vitro*.

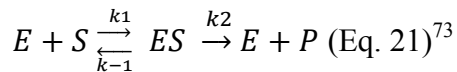
#### 1.4.4 Clairance intrinsèque

La clairance intrinsèque est associée à la capacité inhérente d'un organe à gérer les concentrations circulante d'un médicament. Cette gestion peut être effectuée par plusieurs composantes dont les enzymes de métabolisme et les transporteurs

membranaires d'influx et d'efflux.<sup>71</sup> L'activité de ces composantes se calcul par la régression non-linéaire de l'équation initialement modélisé par Victor Henri et Adrian Brown vers 1902, mais expérimentalement appliquée par Leonor Michaelis et Maud Leonora Menten.<sup>72</sup> La vitesse globale de réaction d'une enzyme ou d'un transporteur est décrite mathématiquement par l'ancienne équation :

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_{s+} + [S]} \text{ (Eq. 20)}^{73}$$

Par exemple, la réaction simple entre une enzyme (E) et un substrat (S) gérée par des constantes de réaction k se définit selon le modèle de réaction simple à un substrat.<sup>73</sup>



Selon le postulat qu'à l'équilibre, les constantes sont équivalentes, il est permis de déterminer la constante globale d'équilibre ( $K_m$ ) par le ratio des constantes de chacune des réactions selon<sup>74</sup>,

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{\text{constante de dissociation d'ES}}{\text{constante d'association d'ES}} \text{ (Eq. 22)}^{74}$$

Selon le modèle de Michaelis et Menten, la constante  $k_2 \ll k_{-1}$ , donc  $K_s = k_{-1}/k_1$ . Évidemment, cette équation émet les postulats retrouvés dans le modèle de clairance totale, soit que la formation du complexe binaire enzyme-substrat (ES) équivaut à sa séparation ( $k_1 = k_{-1} + k_2$ ) et que l'état d'équilibre est atteint rapidement permettant de stipuler qu'à ce moment-là,  $dc/dt = 0$ . Ainsi, la proportionnalité s'écrit;

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \text{ (Eq. 23)}^{74}$$

Suivant une transformation mathématique on obtient l'équation

$$v = \frac{V_{max}[S]}{k_m + [S]} \text{ (Eq. 24)}^{75}$$

Ce n'est qu'en 1925 qu'Haldane et Briggs ont permuté  $K_s$  dans l'équation d'Henri-Michaelis-Menten par  $K_m$ .<sup>75</sup> Cette équation souligne le concept de saturabilité associé à l'activité des composantes soient enzymatique ou de transport.<sup>75</sup> À faible concentration de substrat ( $[S] \ll K_m$ ), l'équation se simplifie à  $v = V_{max} * [S]/K_m$  (EQ. 24), qui est

similaire à une équation de vitesse d'ordre 1 de style  $v=dS/dt = k*S^1$  où  $k$  est la constante  $V_{max}/K_m$ . De façon inverse, lorsque  $[S] \gg K_m$ , la vitesse de réaction est équivalente à la constante  $V_{max}$ , et suit une cinétique d'ordre zéro où  $v= dS/dt=kS^0= k$  et où  $k = V_{max}$ .<sup>73,76</sup>

En situation physiologique, où  $S \ll K_m$ , l'équation 24 se simplifie à  $v = \frac{V_{max}[S]}{k_m}$  (Eq. 23)

Tel que décrit plus, la vitesse d'activité d'une enzyme ou d'un transporteur est régit selon la loi de vitesse de réaction stipulant que  $v = k * S$ . Ainsi, en situation physiologique, isoler la constante  $k$  de l'équation 23 revient à stipuler que  $v = k * S = \frac{V_{max}[S]}{k_m}$  où  $k = \frac{V_{max}}{k_m} = \frac{v}{S}$ , où  $k$  représente la clairance intrinsèque de l'entité biologique étudiée, soit  $CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$  (Eq.25).<sup>76,77</sup>

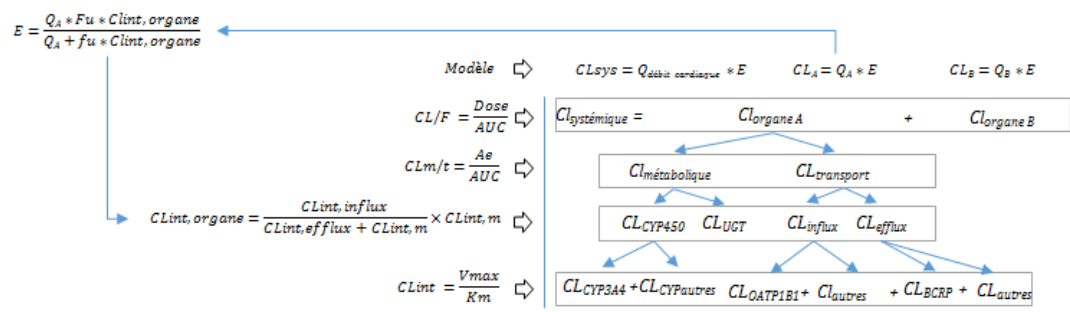
Chacune des composantes, enzymatique ou de transport peut être décrit par l'équation 24 de façon expérimentale en exposant l'enzyme ou le transporteur à des concentrations croissantes d'un médicament et calculer son activité sous forme soit de formation de métabolisme ou sous forme de transport en fonction du temps. La courbe obtenue permettra de dériver les paramètres  $V_{max}$  (vitesse maximale de réaction) et  $K_m$  (concentrations nécessaire pour atteindre 50% du  $V_{max}$ ).

Dans un milieu physiologique complexe où autant les enzymes que les transporteurs peuvent interagir dans la gestion des concentrations, la notion de clairance intrinsèque de l'organe fût introduite afin de déterminer quelle composante représentait le facteur limitant responsable de la clairance intrinsèque globale de l'organe. Sugiyama et ses collègues ont développé une équation qui regroupe les deux composante.<sup>20</sup>

$$CL_{int,organe} = \frac{CL_{int,influx}}{CL_{int,efflux}+CL_{int,m}} \times CL_{int,m} \text{ (Eq. 25)}^{20,78,79}$$

Le modèle Michaelis-Menten est un modèle simple qui ne prend pas en considération l'inhibition potentielle par le produit ou simplement la présence d'intermédiaires (métabolisme séquentiel), car  $k_2 \ll k_1$  donc  $K_m = k_1/k_2$ .<sup>74</sup> Les modèles de cinétique à

profil allostérique (avec courbe sigmoïdale) ou de coopérativité sont différents que celui décrit par l'équation 24. De plus, la présence de métabolites séquentiels complexifie le modèle de réaction simple à un substrat. Un exemple de profil d'allostérie impliquant un métabolisme *séquentiel* sera présenté dans la discussion générale du chapitre 2 (section 2.3) où, pour la première fois, on démontre que le substrat ébastine est hydroxylé par l'isoenzyme CYP2J2 de façon *allostérique*. Comprendre les processus biologiques et y intégrer les concepts de clairance permet de développer des outils puissants de prédiction du comportement d'un composé dans l'organisme. Le modèle intégré de tous les concepts de clairance est présenté à la Figure 5.



**Figure 5.** Intégration des différents modèles et équations de clairance (schéma réalisé par Jade Huguet dont les équations de clairance proviennent de Tozer and Rowland<sup>14</sup>).

Le concept de clairance, bien qu'étudié depuis longtemps, reste un principe complexe et unique qui nécessite une complète intégration de la physiologie humaine ainsi que de la pharmacocinétique pour en comprendre la grande utilité. Ultiment, la clairance permet de calculer la dose pour un individu ayant une capacité connue à éliminer un médicament. De plus, elle permet d'interpréter en termes physiologiques l'impact des organes éliminatoires lors de changements au niveau du débit sanguin, d'activité enzymatique ou du transport des médicaments. La clairance permet aussi d'adapter une posologie chez des patients souffrant d'insuffisance rénale ou hépatique reflétée par des modifications de débits sanguins

### 1.4.5 Clairance métabolique

La clairance métabolique établit la contribution enzymatique à la clairance totale systémique d'un médicament.<sup>59</sup> En pharmacologie clinique, une voie d'élimination participant à  $\geq 25$  % de la clairance systémique totale d'un médicament est considérée significative.<sup>80</sup>

*In vivo*, il est possible de déterminer la contribution des voies métaboliques en récupérant l'urine d'un individu et en y quantifiant les métabolites. Le ratio entre la quantité excrétée d'un métabolite dans l'urine (*Amount excreted* :  $A_e$ ) et l'ASC du médicament-mère définit la clairance métabolique ( $CL_{met} = A_{e, met} / ASC_{Rx, mère}$ ).<sup>80</sup>

Déterminer les voies métaboliques majeures contribuant au métabolisme d'un médicament est un prérequis dans le développement d'un médicament.<sup>80</sup> Par définition, la clairance d'un organe ne peut dépasser son propre débit.<sup>14</sup> De ce fait, selon l'équation  $CL = Q * E$ , la capacité maximale à épurer complètement le corps humain complet d'un médicament ne peut être plus rapide que le débit le plus élevé du corps humain, i.e., le débit cardiaque ( $\sim 5,6$  L /min<sup>81</sup>). Ce chiffre pourrait être atteint par l'addition des clairances de tous les organes du corps humain. À eux seuls, le foie et les reins peuvent contribuer au maximum à 50% du débit cardiaque.

*100% Débit cardiaque (5,6 L/min) = 30 % Débit hépatique (1,5 L/min) + 20 % Débit rénal (1,1 L/min) + 50% Débit des autres organes*

Ainsi, lorsque la clairance systémique totale est plus grande que la clairance hépatique, il est suggéré que des organes extrahépatiques sont impliqués dans l'élimination du médicament.<sup>82</sup> Par exemple, en 1990, la clairance de la morphine a été décrite avec une composante extrahépatique à plus de 30%.<sup>83,84</sup> Le propofol a aussi une contribution métabolique (glucuronidation) extrahépatique-rénale de plus de 37% par rapport à celle du foie qui est de 60%.<sup>85</sup> Plus récemment, il a été démontré que le métabolisme extrahépatique est responsable à plus de 90% de la clairance totale de l'inhibiteur de la

tyrosine kinase de nouvelle génération, afatinib, approuvé par la FDA comme agent pharmacologique contre le cancer du rein avec métastase.<sup>86,87</sup>

Au niveau cardiaque, une clairance métabolique est possible par la présence d'isoenzymes du CYP450 (ARNm).<sup>88,89</sup> La circulation coronarienne contribue à environ 3-5% du débit cardiaque (~0,2-0,3 ml/min).<sup>90</sup> Le cœur en tant qu'organe gestionnaire des concentrations locales par métabolisme ne peut donc contribuer à plus de 3-5% de la clairance systémique totale. Il est logique de croire que la clairance d'un médicament due à un métabolisme local cardiaque ne serait pas sujette à provoquer un impact majeur sur la clairance totale. Par contre, l'enjeu ciblé par ce projet de recherche est d'établir la contribution au niveau local et intracellulaire de composantes enzymatiques exprimées dans le tissu de cœurs humains.

Cet enjeu s'explique avec le modèle *well-stirred*. Un composé dont la clairance intrinsèque serait beaucoup plus petite que le débit coronarien verrait sa clairance coronarienne dépendante de la capacité enzymatique locale ( $CL_{\text{coronarienne}} = CL_{\text{int,cardiaque}} * f_u$ ) car  $\frac{f_u * Cl_{int}}{Q \gg \gg f_u * Cl_{int}}$ .

Une isoenzyme du CYP450 participant à plus de 25 % de la voie métabolique d'un substrat dans une cellule cardiaque pourrait de manière significative être impliqué dans le métabolisme local de ce substrat. Les concentrations nécessaires pour atteindre le  $K_m$  de cette isoenzyme pourraient être similaires à celles nécessaires pour provoquer d'autres effets intracellulaires (plus néfaste, par exemple la concentration nécessaire pour inhiber un canal potassique et provoquer un changement dans la repolarisation cardiaque). Ceci intensifierait l'implication de cette isoenzyme dans le devenir local d'un médicament et une variation dans la capacité enzymatique de cette isoenzyme pourrait faire varier les concentrations libres du médicament à l'intérieur de la cellule de manière très significative. Cet enjeu est au centre même de l'hypothèse de recherche de ce projet de doctorat cherchant à étudier la participation à une gestion locale des concentrations de composés endogènes ou exogènes (médicaments) et par le fait même à

la variabilité associée dans la réponse aux médicaments des isoenzymes de la superfamille des CYP450 exprimées dans les cellules du cœur humain.

D'ailleurs ce projet ciblera l'isoenzyme CYP2J2 qui est exprimée de façon prédominante au niveau du tissu cardiaque (ventricule).<sup>91</sup> Un médicament substrat du CYP2J2 et distribué au cœur par la circulation coronarienne est susceptible d'être métabolisé dans les cellules cardiaques. Une diminution de la capacité enzymatique du CYP2J2 pourrait favoriser l'augmentation des concentrations libres du médicament et augmenter son action physiologique intracellulaire. De ce fait, une variation de l'expression de cette isoenzyme peut autant influencer les concentrations endogènes locales de composés reconnus être métabolisé par le CYP2J2 tel que l'acide arachidonique dont les métabolites possèdent des propriétés vasoactives importantes.<sup>92,93</sup>



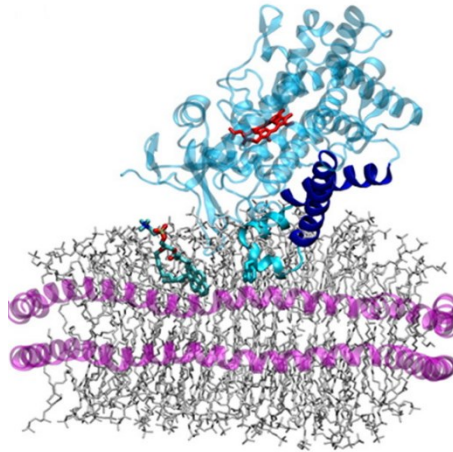
## 1.5 Les enzymes du métabolisme des médicaments

Parmi les différentes enzymes dotées d'une fonction oxydoréductase, les FMO (flavine monooxygénase), les AKR (réductase aldo-kéto) et les MAO (monoamines oxydases) participent à des réactions métaboliques de composés chimiques, mais on retrouve en tête de liste la famille des CYP450s qui exécutent plus de 90% des réactions enzymatiques.<sup>94</sup> Cinq isoenzymes du CYP450 sont responsables d'environ 75% du métabolisme des médicaments (sur le marché ou en développement, n=860 composés, 4192 réactions métaboliques) dont le CYP3A4 (27%), 2D6 (13%), 2C9 (10%), 2C19 (9%), 1A2 (9%).<sup>94</sup> Pour leur part, les isoenzymes 1A1 (5%), 1B1 (1%), 2A6 (2%), 2B6 (4%), 2C8 (5%), 2E1 (3 %) et 3A5 (6%) contribuent à 26% du métabolisme enzymatique des médicaments.<sup>94</sup> Quant aux composés endogènes subissant une oxydo-réduction par les CYP450s (95%), une répartition plus équitable est observée entre les différentes isoenzymes où le CYP3A4 compte pour 20% et les isoenzymes 1A1 (7%), 1B1 (3%), 2A6 (4%), 2B6 (5%), 2C8 (4%), 2E1 (5%) et 3A5 (4%) catalysent 32% des réactions.<sup>94</sup> À noter que les CYP2J2, 4A11 et 4F2 ne sont pas inclus dans ces statistiques et que 11 % des réactions sont catalysées par d'autres CYP450s. Cette récente vue d'ensemble renforce la grande implication des CYP450s dans le métabolisme des médicaments et des composés endogènes. Ces isoenzymes sont exprimées dans les organes extrahépatiques suggérant une contribution extrahépatique dans le métabolisme.<sup>47,95-97</sup>

### 1.5.1 Les Cytochromes P450

Le 20<sup>e</sup> siècle, période déterminante de notre ère, accumule les observations réalisées par des dizaines de scientifiques à travers le monde, autant *in vitro* qu'*in vivo*, sur la transformation de la structure chimique de molécules qui deviennent alors plus hydrosolubles. Ce phénomène biologique observé chez tous les organismes (micro-organismes, plantes, animaux et humain) contribue à la découverte des enzymes *cytochrome P450* qui révolutionnera la pharmacologie clinique après la Deuxième Guerre mondiale. En 1948, Walter C. Schneider poursuit les travaux de Kennedy et Lehninger en isolant, à l'aide de la première technique d'ultracentrifugation

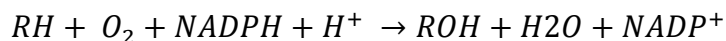
différentielle, des fractions cellulaires actives autres que mitochondriales dans des foies de rats où l'on y avait déjà identifié les enzymes déshydrogénases, cytochromes oxydases et cytochromes *c* responsables de l'oxydation d'acides gras.<sup>98-101</sup> D'ailleurs, il était fascinant à cette époque d'observer l'oxydation d'un acide gras à un endroit aussi peu réactif qu'une extrémité méthyl.<sup>102</sup> Bien que découvert en 1943 par Albert Claude, le réticulum endoplasmique (RE) isolé sous forme de 'microsomes' ne fut identifié comme lieu d'activité enzymatique qu'en 1954 par Cooper.<sup>103,104</sup> [ENREF 31](#) En 1955, Axelrod et ses collègues isolent des microsomes du foie, des poumon, du diaphragme, des muscles, des reins et du cerveau d'un lapin et y observent une activité enzymatique de déméthylation de l'éphédrine en formaldéhyde et noréphédrine à l'aide de cofacteurs.<sup>105</sup> Les essais enzymatiques ont vite fait d'identifier une dépendance au cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP), antérieurement appelé TNP pour nucléotide triphosphopyridine. Au même moment, la n-déméthylation de la méthadone et la conversion de la codéine en morphine étaient étudiées dans les mêmes coupes de foie de lapin par l'équipe d'Axelrod.<sup>106,107</sup> Trois ans plus tard, en 1958, Garfinkel<sup>108</sup> et Klindeberg<sup>109</sup> observent que l'activité enzymatique microsomale isolée de foie de lapin provient d'une enzyme qui possède un pigment (*P*) et qui lorsque lié au monoxyde de carbone (CO) est capable d'absorber la lumière à une longueur d'onde de 450 nm. Omura et Sato ont par la suite déterminé que ce pigment était l'hème B confirmant que cette hémoprotéine était un *cytochrome* (*CYP* : se rapporte à des enzymes avec un noyau porphyrine complexé à un atome métallique de fer ou de cuivre).<sup>110-112</sup> [ENREF 34](#) Le terme *Cytochrome P 450* (CYP450) a donc vu le jour. Des années de découvertes majeures entre 1950 et 1980 ont permis de comprendre cette fascinante enzyme si bien structurée pour effectuer son rôle d'agent oxydatif (Figure 6).



**Figure 6.** Représentation 3D de la structure protéique du CYP2J2 inséré dans des nanodisques en pyrène (PYR-ND). (Image licenciée par Elsevier # 1982084, incluant droit de traduction: McDougale DR, Baylon JL, Meling DD, Kambalyal A, Grinkova YV, Hammernik J, Tajkhorshid E, and Das A (2015) Incorporation of charged residues in the CYP2J2 F-G loop disrupts CYP2J2–lipid bilayer interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**:2460-2470.<sup>113</sup>

Le rôle principal du *Cytochrome P 450* est de dégrader par oxydation (hydroxylation, époxydation entre autres) des composés afin de les rendre plus hydrosolubles par l'incorporation d'un oxygène (fonction oxydase). La capacité de l'élément fer du *Cytochrome P 450* à lier l'oxygène atmosphérique (O<sub>2</sub>) lui donne aussi un rôle d'oxygénase. Le *Cytochrome P 450* est donc une enzyme à fonction mixte d'oxydase-oxygénase. La portion protéine du CYP450 est liée au fer par le soufre d'une cystéine, acide aminé hautement conservé entre les espèces.<sup>114</sup> Le CYP450 possède ainsi deux structures soit la portion hémique (porphyrine-fer) et la portion protéique d'où son appellation d'hémoprotéine ou métalloenzyme. Le CYP450 est lié à la membrane du réticulum endoplasmique lisse par une queue NH<sub>2</sub>.<sup>115</sup> De façon intrinsèque, le CYP450 n'est pas actif seul d'où son appellation d'apoprotéine (protéine fonctionnelle avec cofacteur). Le CYP450 microsomal fonctionne à l'aide du cofacteur NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui, oxydé par la CYP450-réductase-NADPH dépendante (CPR), transfère deux électrons au complexe CYP450. L'objectif ultime de ce manège est d'oxyder un substrat pour le rendre plus polaire augmentant sa capacité à se dissoudre dans l'eau ou dans les liquides polaires facilitant son élimination par l'organisme à travers les fluides polaires biologiques (urine et bile).<sup>116</sup>

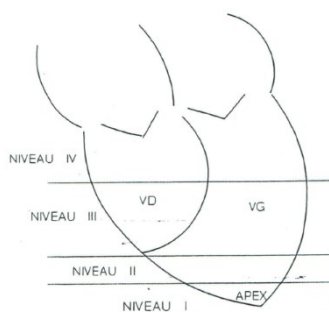
À l'état basal lorsqu'aucun substrat est lié, le fer du *Cytochrome P 450* est présent sous la forme d'oxyde de fer (oxyde ferrique ;  $Fe^{3+}$ ) de par sa liaison à l'oxygène de l'eau.<sup>117</sup> La propriété oxydoréductrice de ce complexe est le phénomène clef pour l'oxydation des substrats. Brièvement et simplement, les étapes du cycle d'oxydation d'un substrat par l'anneau porphyrine (hème) du CYP450 débute par la liaison du substrat (-RH) à l'apoprotéine (substrat/inhibiteur de type I) ou au fer (substrat/inhibiteur de type II) de l'hème déplaçant l'eau et formant un complexe enzyme-substrat (ES). La machine se met donc en branle et l'oxyde ferrique ( $Fe^{3+}$ ; 3 états d'oxydation) accepte un électron fourni par l'oxydation du NADPH. Le fer est donc réduit ( $Fe^{2+}$ ) le rendant maintenant disponible pour lier l'oxygène atmosphérique ( $O_2$ ), qui en soit est un agent oxydant mais qui sans l'aide d'un catalyseur prendrait des millions d'années à oxyder une molécule. Une fois lié au dioxygène, l'oxygène terminal est réduit par un autre électron fourni par l'oxydation du NADPH. S'ensuivent deux *protonations* par deux hydrogènes sur ce même oxygène et du clivage hétérolytique des deux oxygènes libérant une molécule d'eau. L'hème est alors sous sa forme très instable d'oxoferryl qui se lie très rapidement et de façon séquentielle avec 1) l'hydrogène du substrat laissant le substrat seul et 2) avec le substrat ce qui en fin de compte troque le substrat -RH en -ROH.<sup>26,116,117</sup> L'incorporation d'un seul oxygène provenant de l'oxygène atmosphérique qualifie l'enzyme de monooxygénase. L'équation<sup>118</sup> globale de cette réaction d'oxydoréduction est :



La conformation protéique du CYP450, définissant sa sélectivité envers les substrats, a vite fait de révéler une très grande diversité inter-espèces et intra-espèces.<sup>102,119,120</sup> [ENREF 39](#) La principale observation de cette variabilité fut démontrée lorsqu'un même composé administré chez différents individus résultait en des profils métaboliques distincts.<sup>121</sup> Cette variabilité interindividuelle chez l'humain a incité les chercheurs à se pencher sur les mécanismes sous-jacents à cette variabilité interindividuelle.<sup>122,123</sup>

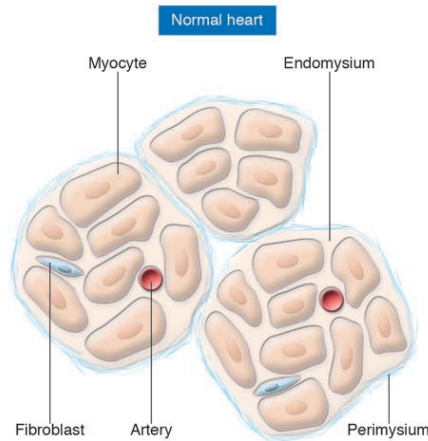
## 1.5.2 Localisation des Cytochromes P450 cardiaques

Mes travaux de recherche se basent sur l'activité observée dans le tissu ventriculaire cardiaque chez l'humain. Tout d'abord, les échantillons ont été prélevés de l'apex (base) jusqu'à la zone niveau IV sous les oreillettes Figure 7.



**Figure 7.** Configuration des zones au niveau des ventricules de cœurs humains. (Propriété du Réseau d'Échange de Tissus et Échantillons Biologiques RETEB de l'Institut de Cardiologie de Montréal)

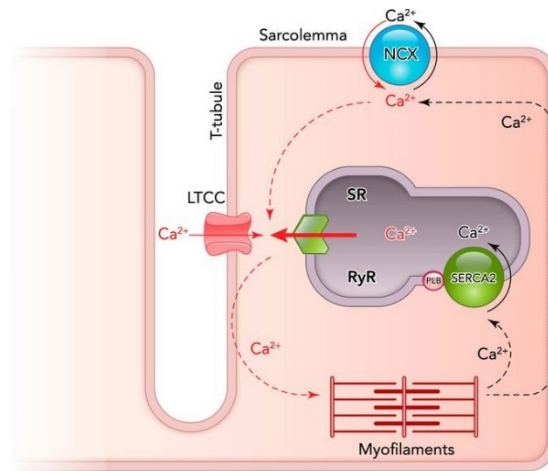
Le tissu ventriculaire regroupe des cellules myocytaires (cardiomyocytes) et des cellules non myocytaires (NMC) jointes par une matrice extracellulaire (Figure 8).<sup>124,125</sup> Parmi les cellules NMC, on retrouve les cellules endothéliales qui tapissent les artères et les veines coronaires, et l'endocarde qui tapisse les cavités internes des ventricules et des oreillettes, les cellules musculaires lisses vasculaires adjacentes aux cellules endothéliales, les fibroblastes localisés dans l'endomysium, les péricytes, les mastocytes et les macrophages.<sup>124,126,127</sup> [ENREF 4 71](#) Toutes ces composantes interagissent entre elles à l'aide de facteurs de croissance, de cytokines, de protéines ou de molécules vasoactives.<sup>126,128</sup> La communication est d'autant plus sollicitée lors de maladies cardiaques ou de blessures comme un épisode d'ischémie ou d'insuffisance cardiaque.<sup>129</sup> Les cardiomyocytes constituent la majorité de la masse du cœur en termes de densité mais représentent uniquement 30% du nombre de cellules cardiaques alors que les NMC représentent 70% de ces dernières.<sup>125,127,130</sup>



**Figure 8.** Représentation schématique des cellules d'une coupe latérale du mur d'un cœur humain.<sup>131</sup>  
 (Licence de rééditez dans une thèse/dissertation # 3666640202814 fournie par Copyright Clearance Center)

En 1989, l'équipe de Brown et Black ont découvert la topologie de la membrane du réticulum endoplasmique (microsomale) où les isoenzymes du CYP450 exprimées chez les mammifères s'y rattachent.<sup>132</sup> La protéine du CYP450 y est rattachée par le bout NH<sub>2</sub>-terminal par un ou deux segments transmembranaires constituant environ 50 résidus d'acides aminés et le reste de la protéine, dont la partie héminique, serait exposée sur le côté cytosolique ou intra-membranaire de la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 6). Deux réticulums endoplasmiques sont exprimés dans la majorité des cellules eucaryotes dont les réticula endoplasmiques lisse et rugueux.<sup>133,134</sup> {Porter, 1945 #2089} Les cardiomyocytes expriment eux aussi ces deux organelles. Compte tenu de la nature musculaire des cardiomyocytes, le réticulum endoplasmique lisse est plus spécialisé en étant un lieu d'entreposage du calcium (Ca<sup>2+</sup>) et se nomme réticulum sarcoplasmique (RS) (Figure 9).<sup>135</sup> Il n'y a aucune évidence à ce jour, selon nos connaissances, que le RS exprime des CYP450s à sa membrane. Par contre, compte tenu que la protéine du CYP450 est reconnue comme étant attachée majoritairement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique lisse, il est suggéré qu'au niveau cardiaque les CYP450s soient exprimés au niveau de la membrane du RS. D'ailleurs, il a été démontré que certaines isoenzymes sont exprimées sur la membrane du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique.<sup>136</sup> De plus, il a été suggéré que certains mécanismes physiologiques co-localiseraient la protéine du CYP450 sur la membrane

du réticulum sarcoplasmique et le canal  $\text{Ca}^{2+}$ -sensible à la ryanodine (SERCA2, Figure 9).<sup>137</sup>



**Figure 9.** Représentation schématique d'un cardiomyocyte et du transport du calcium lors du phénomène d'excitation-contraction du muscle. (D'après Shiels et collègues. Physiology. 2014 Vol. 29 no. 6, 456-469 dont aucune permission est nécessaire pour la représentation dans cette thèse selon le centre Copyright Clearance Center Rightslink.<sup>138</sup>) Légende : LTCC : canal L-type  $\text{Ca}^{2+}$ , NCX : échangeur  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ , RyR : récepteur ryanodine, SERCA2 : Sarcoplasmic Reticulum SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SR : réticulum sarcoplasmique.

La technique d'ultracentrifugation différentielle permet d'isoler de manière sélective selon le poids et la densité des organelles cellulaires les organelles voulus. Au niveau du tissu ventriculaire cardiaque humain utilisé dans mes études doctorales (niveau I à IV), la présence de cellules musculaires lisses, endothéliales, cardiomyocytes et fibroblastes signifie que l'isolation de la fraction microsomale renferme le réticulum endoplasmique/sarcoplasmique de toutes ces cellules confondues.

### **Localisation des CYP450s dans le tissu cardiaque vs cardiomyocytes :**

Chez la souris, la présence d'isoenzyme du CYP450 2J2 dans les cardiomyocytes a été observée par immunohistochimie.<sup>139</sup> Chez le rat, l'isoenzyme CYP2J3 a aussi été identifiée par immunohistochimie dans les myocytes d'oreillettes et de ventricules de cœur.<sup>140</sup> De façon moins prononcée, le CYP2J3 a aussi été détecté dans les cellules endothéliales de l'endocarde.<sup>140</sup> Fait intéressant, le muscle squelettique de l'épaule ou du quadriceps chez l'humain exprime l'isoenzyme CYP2J2 de façon prédominante.<sup>88</sup> En

2004, les isoenzymes CYP2J2 et CYP2C8 et 2C9 ont été observées par la technique d'immunohistochimie dans le tissu myocardique de deux échantillons de cœurs humains sur trois.<sup>141</sup> En 2007, l'équipe de DeLozier *et collègues* démontre la présence de l'isoenzyme CYP2J2 et 2C8 dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales de cœurs humains. Finalement, notre laboratoire a observé en 2010 la présence (ARNm) d'isoenzymes du CYP2C et 2J2 dans les cardiomyocytes de ventricule de cœurs humains.<sup>91</sup> Il a été récemment démontré que l'ARNm de l'isoenzyme du CYP2J2 s'exprime en même quantité dans le tissu cardiaque et les cardiomyocytes.<sup>142</sup>

L'utilisation de la fraction microsomale reflète l'activité des isoenzymes exprimées dans le réticulum endoplasmique/sarcoplasmique du tissu ventriculaire cardiaque humain. Cette fraction telle que mentionnée plus tôt a été isolée selon la technique d'ultracentrifugation différentielle adaptée pour le tissu ventriculaire cardiaque humain dans notre laboratoire.<sup>91</sup> Une brève description des isoenzymes quantifiées dans le ventricule de cœurs humains est présentée à la section 1.7.

### **Différence entre ventricule droit et ventricule gauche**

Le CYP2J2 est plus présent en ARNm dans le ventricule gauche que dans le ventricule droit selon Michaud et collègues<sup>91</sup> malgré des études précédentes effectuées par Thum et Borlack qui ont démontré que le ventricule droit exprimait plus d'ARNm de certains CYP450 que le ventricule gauche.<sup>9</sup>

De plus, les dysfonctions ventriculaire favorisent le développement d'arythmies.<sup>143</sup> Ceci pourrait suggérer que des changements morphologiques du ventricule gauche ou des variations d'états pro-inflammatoires suite à ces dysfonctions ventriculaires pourraient contrôler de manière différente l'expression des gènes et des protéines fonctionnelles des CYP450s par rapport au ventricule droit. Les présents travaux de recherche vont exposer les résultats obtenus d'expression d'ARNm du CYP2J2 entre le ventricule droit et le ventricule gauche de patients souffrant de cardiomyopathies sévères.

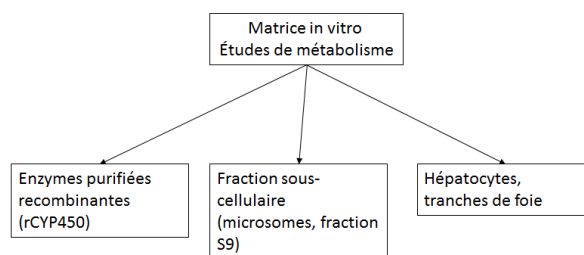


## 1.6 Approches expérimentales d'études du métabolisme des médicaments

L'identification des voies métaboliques impliquées dans la biotransformation des médicaments est essentielle dans le développement des médicaments. Certaines des principales raisons pour effectuer des études métaboliques des médicaments sont d'identifier, de caractériser et de quantifier les métabolites formés, la vitesse et les voies métaboliques empruntées par lesquelles ils sont formés, d'identifier leurs actions pharmacologiques afin d'établir un profil d'efficacité et d'usage sécuritaire du médicament mère et de ses métabolites. Déterminer ces paramètres est d'autant plus important lorsqu'un médicament est éliminé par voies métaboliques particulières non exprimées au niveau du foie, et donc non perceptibles par des études de pharmacocinétique conventionnelle.

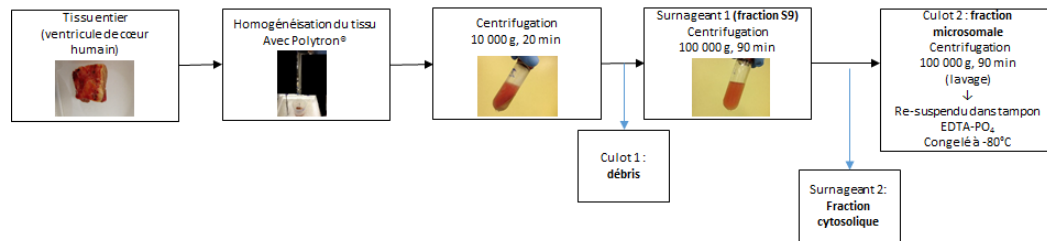
### 1.6.1 Modèles *In Vitro*

Les modèles généralement utilisés *in vitro* sont présentés à la Figure 10.<sup>144</sup> Les modèles utilisés dans mes travaux de recherches sont les modèles d'isoenzymes recombinantes humaines (rhCYP450) et de la fraction sous-cellulaire microsomale : microsomes de foies (*HLM* : *Human Liver Microsomes*) et de cœurs humains (MCH; microsomes de cœurs humains; *HHM*; *Human Heart Microsomes*).



**Figure 10.** Modèles/matrices pour étudier le métabolisme *in vitro*.

Les microsomes de cœurs humains sont isolés par la technique d'ultracentrifugation différentielle développée par la Dre Véronique Michaud dans mon laboratoire d'accueil (**Figure 11**).<sup>91</sup> Les microsomes sont isolés en fonction du coefficient de sédimentation ( $10^2$  à  $10^4$ ) et de la densité ( $1.1-1.3 \text{ g/cm}^3$ ) de la composante sous-cellulaire.



**Figure 11.** Technique d’ultracentrifugation différentielle pour isolation de microsomes de cœurs humains.<sup>91</sup>

### 1.6.2 Métabolisme extrahépatique par les CYP450s

La notion de métabolisme (Grec ; métabole signifiant ‘ changement, transformation’) fut effleurée par le médecin arabe Ibn al-Nafis citant *‘the body and its parts are in a continuous state of dissolution and nourishment, so they are inevitably undergoing permanent change.’*<sup>145</sup> La définition officielle de métabolisme depuis le début de l’ère moderne décrit toutes les réactions chimiques se produisant dans les cellules vivantes de l’organisme constituées de deux catégories; l’anabolisme et le catabolisme. Rapidement la notion d’enzyme fut liée au métabolisme durant le 18<sup>ième</sup> siècle, moment où le terme enzyme (grec ἐνζυμων: ἐν ‘dans’ et ζυμων ‘levain’) fut déterminé par William Kuhne en 1876.<sup>146</sup> Durant la même période, le métabolisme des xénobiotiques (grec : xenos ‘étrangé’ et bios ‘vie’) a fait son apparition chez l’humain par l’étude de la transformation de l’acide benzoïque en acide hippurique.<sup>147,148</sup>

L’importance du métabolisme extrahépatique était encore peu mise de l’avant dû à la très grande capacité métabolique du foie largement documentée depuis plus de 50 ans. Néanmoins, sa reconnaissance a été effectuée simultanément lorsque d’autres organes que le foie furent identifiés capables de réactions enzymatiques.<sup>149</sup> L’arrivée des techniques d’homogénéisation (1930)<sup>150</sup> et de centrifugation différentielle (1940-49)<sup>151-153</sup> permettant d’isoler les sources sous-cellulaires et par le fait même le type de réaction ont marqué l’essor des recherches sur le métabolisme des xénobiotiques et des composés endogènes autant au niveau du foie que dans les organes extrahépatiques. Des études *in vivo* et *in vitro* se sont dès lors chevauchées chez différentes espèces animales et chez

l'homme. Le métabolisme extrahépatique a été traité une première fois avec l'étude du métabolisme de l'alcool chez l'humain.<sup>154</sup> Beaucoup plus tard, les années 70 marquent les premières études *in vitro* chez l'animal démontrant l'apport des poumons et des reins par rapport au foie dans le métabolisme dépendant des CYP450s, des N-acétyltransférase, de l'UDP-glucuronyltransférase et plusieurs autres enzymes chez les rats, les lapins, les souris, les hamsters et les cochons d'Inde.<sup>155</sup> La faible sensibilité des méthodes de dosages de l'époque a limité les chercheurs à observer une activité métabolique dans les tissus extrahépatiques. Il était par contre déjà établi qu'une grande diversité d'expressions des CYP450s entre les espèces et entre les tissus hépatiques et extrahépatiques existait.<sup>155</sup>

Chez l'humain les premiers termes d'élimination extrahépatique ont été mis en évidence par l'étude de la pharmacocinétique de la morphine dont la clairance non-hépatique représentait 40% de la clairance totale ( $CL_{\text{totale}} > CL_{\text{hépatique}}$ ) suggérant que l'élimination n'était pas uniquement gérée par le foie.<sup>84</sup> Le principe, devenue populaire, veut que si la clairance hépatique est plus petite que la clairance totale, des mécanismes d'élimination extrahépatiques peuvent être impliqués.<sup>86</sup>

Murray et son équipe ont localisé pour la première fois en 1988 des CYP450s dans différents tissus extrahépatiques chez l'humain dont le petit intestin, les cellules myéloïdes de la moelle épinière et les mastocytes.<sup>96</sup> Durant cette même période, l'équipe du chercheur Fred Peter Guengerich purifiait 6 différentes isoenzymes du CYP450 chez 4 donneurs de foie.<sup>156</sup> L'identification de CYP450s dans le cœur humain fut pour la première fois établie par l'équipe de Zeldin en 1996. Cette équipe a observé une forte expression de l'isoenzyme CYP2J2 (SW2-17) dans un pool de tissus de cœurs humains.<sup>157</sup> Les isoenzymes CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 et 4B1 furent par la suite identifiées de façon prédominante dans le ventricule de cœurs humains droit tandis que le CYP2E1 était exprimé dans toutes les régions du cœur.<sup>9</sup> Cependant, ce n'est qu'en 2002 que Thum et Borlack ont démontré l'expression d'ARNm du CYP2J2 dans le ventricule gauche de cœurs humains.<sup>158</sup>

## 1.7 CYP450 cardiaques

Dans le cœur humain, au niveau des ventricules, l'expression relative de certaines CYP450 a été démontrée par Michaud et collègues Figure 30.<sup>91</sup> De celles-ci, l'isoenzyme CYP2J2 et CYP2E1 sont les plus exprimées en quantité relative d'ARNmessenger.

### CYP1A1

Le cytochrome 1A1 (EC 1.14.14.1 famille 1, sous-famille A, polypeptide 1) est encodé par le gène *CYP1A1* sur le chromosome 15q24.1. L'isoenzyme 1A1 du cytochrome P450 n'est que très peu ou pas du tout exprimée de façon constitutive au niveau du foie, considérée même comme enzyme extrahépatique. Son expression au niveau des poumons, des lymphocytes, du placenta, de la peau, du cœur ainsi qu'au niveau des cellules cancéreuses est largement documentée.<sup>91,159-164</sup> Il est donc stratégique de cibler cette isoenzyme au niveau extrahépatique afin de contrôler les concentrations de médicaments localement. [ENREF 25](#) [ENREF 25](#) [ENREF 25](#) [ENREF 25](#) D'ailleurs, c'est la stratégie adoptée pour certains nouveaux médicaments contre le cancer tel que le nouvel agent pharmacologique aminoflavone (en phase II du développement clinique) qui cible les cellules cancéreuses.<sup>165</sup> L'aminoflavone doit être métabolisée par le CYP1A1 ainsi que par SULT1A1 (sulfotransférase) afin d'exercer son action apoptotique dans les cellules cancéreuses.<sup>165</sup> D'ailleurs, l'isoenzyme CYP1A1 est très influente dans le métabolisme des composés pro-carcinogènes compte tenu de sa capacité à métaboliser des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tel que le benzopyrène retrouvé entre autres dans la fumée de cigarette ou dans l'échappement de véhicules au diesel. La bioactivation des HAPs par le CYP1A1 favorise la formation de phénols et d'époxydes, considérés toxiques de par leur capacité à s'insérer dans l'ADN et créer des mutations.<sup>166,167</sup> [ENREF 23](#) Le CYP1A1 est aussi doté d'activité métabolique envers les composés halogénés ainsi que les amines aromatiques.

Par ailleurs, l'isoenzyme CYP1A1 est hautement inductible par ses propres substrats, via le récepteur nucléaire (AhR; aryl hydrocarbon receptor).<sup>168</sup> Une surexpression du CYP1A1 favorise la formation de composés réactifs toxiques d'où son rôle dans le

risque de développement de cancers.<sup>167,169</sup> D'ailleurs, des polymorphismes associés à l'isoenzyme CYP1A1 sont associés à des différences d'activité dans le métabolisme du benzopyrène.<sup>170</sup> Trois importants polymorphismes nucléotidiques uniques (SNP) parmi les 10 identifiés affectent l'activité de l'enzyme : le *CYP1A1*\*2 (Ile<sup>462</sup>Val) et le *CYP1A1*\*4 (Thr<sup>461</sup>Asn). Les polymorphismes \*2 et \*4 ont une capacité métabolique (CL<sub>int</sub>) de 18 et de 40 fois plus élevée que l'isoenzyme sauvage (CYP1A1\*1) dans la O-déméthylation de l'éthoxyrésorufine.<sup>171</sup> Étant donné son potentiel activateur de pro-carcinogènes, les individus exprimant un variant du CYP1A1 pourraient avoir un risque accru à certains types de cancer.<sup>172,173</sup> L'isoenzyme CYP1A1 est la troisième enzyme la plus exprimée au niveau cardiaque<sup>91</sup> avec une très grande variabilité d'expression de l'ARNm (> 1000 fois).

L'acide arachidonique est aussi métabolisé par l'isoenzyme CYP1A1 dû à sa forme planaire qui s'agence bien avec la petite pochette de liaison du CYP1A1.<sup>174</sup> Le métabolite majoritaire est le 14,15-EET, une molécule lipidique active pro-angiogénique et proliférative.<sup>175,176</sup> La quantité de 14,15-EET est augmentée de façon significative dans les cellules cancéreuses du cancer du sein.<sup>177</sup> L'impact clinique de ce phénomène reste malgré tout négligeable étant donné que la vitesse de transformation de l'AA en 14,15-EET par les rhCYP1A1 représente 0.33% de celle du substrat marqueur éthoxyrésorufine en résorufine.<sup>178</sup>

## **CYP2B6**

Le cytochrome 2B6 (famille 2, sous-famille B, polypeptide 6, 48kDa, 491 acides aminés) est encodé par le gène *CYP2B6* sur le chromosome 19q13.2. L'ADN de cette isoenzyme, surnommée à l'époque cytochrome PB (phénobarbital), a pour la première fois été cloné dans la membrane de microsomes de foie humain en 1985 par l'équipe du professeur Phillips à Londres.<sup>179,180</sup> Les premières techniques d'identification de cette protéine à l'aide d'anticorps, plus ou moins sélectifs, n'ont pas permis de révéler la vraie contribution du CYP2B6 à l'éventail des CYP450s retrouvés dans le foie humain.<sup>180</sup> L'expression relative de la protéine CYP2B6 dans le foie humain ne fait pas consensus, encore aujourd'hui, dû à sa très grande variabilité d'expression. L'expression du

CYP2B6 varie de 2 à 10 % au niveau du foie et même parfois rapportée en dessous du 1%.<sup>180</sup> Dépendamment des donneurs choisis, il peut y avoir des variations entre les individus allant jusqu'à 150 fois (1 – 148 pmol/mg protéines) dans le foie humain.<sup>181-183</sup> D'ailleurs, cette isoenzyme possède le plus de polymorphismes génétiques avec plus de 100<sup>184</sup> polymorphismes nucléotidiques (*SNP*) connus dont les plus importants sont associés à une diminution ou perte complète de l'activité enzymatique tel que le CYP2B6\*6 (516G>T; 785A>G) qui a une fréquence de 14-27% chez les Caucasiens.<sup>185</sup>

Le CYP2B6 se retrouve uniformément exprimé à travers les zones 1, 2 et 3 d'un acinus hépatique.<sup>186</sup> Bien que variable, la contribution du CYP2B6 est non négligeable vu sa capacité à métaboliser environ 8-10%<sup>187</sup> des médicaments utilisés en cliniques dont certains agissent au niveau du système nerveux central tels que le bupropion, la kétamine, la méthadone, la sertraline, le propofol et d'autres au niveau du rein tel que l'ifosfamide.<sup>188-190</sup> Ajouté au fait que l'on retrouve le CYP2B6 dans différents tissus extrahépatiques (rein, cerveau, intestin, peau, cœur, poumon)<sup>47,91,180,191,192</sup>, il est suggéré que cette isoenzyme soit susceptible d'être impliquée dans des interactions médicamenteuses. D'ailleurs, chez des patients atteints du VIH ainsi que de tuberculose, la clairance (CL/F) de l'efavirenz, un substrat du CYP2B6, était plus faible chez ceux ayant le génotype CYP2B6\*6.<sup>193</sup> De plus, il a été suggéré que le CYP2B6 est responsable de toxicité locale au niveau du cerveau et du rein.<sup>194,195</sup> De façon endogène, le CYP2B6 n'oxyde pas l'acide arachidonique de façon significative, mais possède la capacité de former des métabolites hydroxylés en position oméga/oméga-1 ( $\omega/\omega-1$ ).<sup>196</sup> Ceci corrèle bien avec le fait que les substrats du CYP2B6 sont en général de petites molécules hydrophobiques.<sup>189</sup> Au niveau cardiaque, la transcription du gène CYP2B6 est peu abondante en comparaison avec d'autres isoenzymes. Par contre, son rôle d'enzyme de métabolisme au niveau cardiaque reste à être déterminé compte tenu de sa capacité à métaboliser des composés qui possèdent des toxicités cardiaques. Par exemple, la méthadone est un composé chiral dont la R-méthadone est le principal composé actif.<sup>197</sup> La méthadone est un composé capable de bloquer le canal  $I_{Kr}$  (hERG; présenté plus loin dans la thèse) dans les cardiomyocytes et donc, possède un potentiel d'engendrer un prolongement de l'intervalle QT (à l'ECG) et ultimement des torsades de pointes.<sup>197</sup>

Cette capacité à bloquer le canal  $I_{Kr}$  est plus grande pour l'énantiomère S-méthadone ( $IC_{50} = 2 \mu M$ ) que pour le R-méthadone ( $IC_{50} = 7 \mu M$ ). De plus, l'isoenzyme CYP2B6 catalyse la réaction d'hydroxylation de la méthadone. Une mutation de l'isoenzyme diminuant son activité pourrait favoriser l'accumulation de la méthadone. Étant donné que l'isoenzyme CYP2B6 est présente au niveau du tissu ventriculaire cardiaque il est possible que les concentrations de méthadone distribuées dans les cardiomyocytes puissent être influencées par la présence du CYP2B6 et ce de façon plus marquée si l'isoenzyme est non-fonctionnelle.

## CYP2C8

L'isoenzyme du CYP450 2C8 (31 kilobases, 9 exons) est encodée par le gène *CYP2C8* sur le chromosome 10q23. Au niveau hépatique, le CYP2C8 est exprimé à environ à 9%<sup>198</sup> et métabolise 5% des médicaments prescrits.<sup>199</sup> Les substrats du CYP2C8 ressemblent à ceux du CYP3A4 par contre, la réaction métabolique est parfois bien différente. L'exemple le plus commun est le substrat paclitaxel, qui aux mains du 3A4 va être hydroxylé en position 3' tandis que le CYP2C8 va hydroxyler la molécule à la position 6'.<sup>200,201</sup> Une des raisons de cette complémentarité de substrats relève de la grande pochette de liaison (*binding pocket*) que le CYP2C8 possède ( $1440 \text{ \AA}^3$ )<sup>202</sup>, d'un calibre comparable au 3A4 ( $1386 \text{ \AA}^3$ ). Cette très grande cavité de liaison favorise le métabolisme de substrats volumineux tels que le répaglinide, la rosiglitazone, la cérivastatine, le vérapamil, l'amiodarone, la méthadone et bien d'autres.<sup>203-205</sup> De plus, cette caractéristique du CYP2C8 lui donne la capacité particulière de métaboliser des substrats glucuronidés. D'ailleurs, récemment découvert, le métabolite 3-hydroxydesoratadine est métabolisé par le CYP2C8 mais seulement lorsque celui-ci est préalablement glucuronidé par l'UGT2B10.<sup>206</sup>

L'implication du CYP2C8 dans le métabolisme de composés endogènes comme l'acide arachidonique est abondamment documentée.<sup>196,201,207</sup> Les premières analyses du métabolismes de l'AA par le CYP2C8 furent effectuées en 1995 par l'équipe de Zeldin qui ont identifié les principaux métabolites formés soient le 11(R),12(S)-EET et le 14(R),15(S)-EET.<sup>208</sup> Ainsi, l'expression extrahépatique de l'ARN messager du

CYP2C8 (testicules<sup>164</sup>, glandes surrénales<sup>164</sup>, rein<sup>164,208</sup>, intestin<sup>95,164</sup> [ENREF 30](#), poumon<sup>164,209</sup>, cerveau<sup>164</sup>, cellules du cancer du sein<sup>177</sup>) jumelée à sa capacité à former des métabolites EET vasoactifs déterminent son rôle dans le contrôle du tonus vasculaire. Au niveau cardiaque, l'expression protéique de l'isoenzyme CYP2C8 n'a pas été observée dans les différentes régions du cœur humain<sup>9</sup> alors que l'ARN messager y est présent.<sup>9,91</sup> Le lien entre l'augmentation du risque d'infarctus du myocarde et les individus homozygotes *CYP2C8\*3*, le plus exprimé chez les Caucasiens<sup>199</sup>, a été observé par *Yasar et collègues* avec un rapport des cotes (Odds ratio; OD) de 2.1 (IC95% : 0.7-5.8) et 1.9 (IC95% : 0.6-6.0) pour les hommes et femmes respectivement.<sup>210</sup> D'ailleurs, la formation de métabolites vasoactifs EET est diminuée de 65% chez les homozygotes *CYP2C8\*3*.<sup>211</sup>

## CYP2C9

L'isoenzyme du CYP450 2C9 est encodée par le gène *CYP2C9* sur le chromosome 10q24. Au niveau du foie, cette isoenzyme représente environ de 15-25% de l'expression des enzymes du CYP450 et participe à environ 15% du métabolisme des médicaments utilisés en clinique.<sup>212</sup> Au niveau extrahépatique, la protéine du CYP2C9 est fortement exprimée dans le tubule proximal du rein et dans les cellules pariétales.<sup>141</sup> On la retrouve entre autres dans l'intestin, le conduit biliaire, les poumons, les vaisseaux sanguins, le myocarde, la glande surrénale et la prostate de façon plus modérée.<sup>95,141,213,214</sup> Il a été reconnu que le CYP2C9 métabolise de petits composés lipophiliques acides.<sup>115,215</sup>

Le gène de l'isoenzyme CYP2C9 est polymorphique avec plus de 58 mutations altérant au moins un acide aminé (*non synonymous*) (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>). *CYP2C9\*2* (13%) et *\*3* (8%) sont deux mutations parmi les plus étudiées et exprimées dans la population caucasienne.<sup>216</sup> Responsable du métabolisme de médicaments à index thérapeutique étroit, tel que la warfarine<sup>217</sup>, la phénytoïne<sup>218</sup> et le tolbutamide<sup>216</sup>, le CYP2C9 est enclin à des interactions médicamenteuses. Par exemple, la clairance de la tolbutamide des individus dont le génotype est homozygote pour *CYP2C9\*3* est 6,4-fois plus faible que ceux homozygotes pour le gène sauvage (*CYP2C9\*1\*1*).<sup>216</sup>

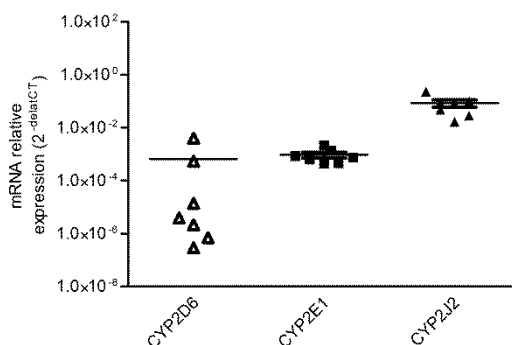


Au niveau endogène, l'isoenzyme CYP2C9 est impliquée dans le métabolisme de l'acide arachidonique. La formation d'EET (52%), HETE (11%) et  $\omega/\omega-1$  (10%) sont les plus importants métabolites vasoactifs produits par le CYP2C9.<sup>196</sup> Parmi les différents EET, le 14,15-EET (24%) est formé de façon majoritaire.<sup>196</sup> Compte tenu du potentiel vasoactifs des EETs, cette isoenzyme a la faculté d'être un médiateur d'homéostasie cardiovasculaire.<sup>219</sup> L'ARNm du CYP2C9 est présent dans le ventricule gauche humain.<sup>91</sup> La protéine et l'ARNm ont aussi été détectés de façon plus importante dans les artères coronaires et dans l'aorte de cinq patients que dans le tissu cardiaque complet.<sup>214</sup> Ceci renforce le rôle du CYP2C9 dans l'homéostasie vasculaire compte tenu de son expression dans le tissu artériel coronarien qui contient des cellules endothéliales, endroit principal de la formation de métabolites vasoactifs par l'oxydation de l'acide arachidonique.<sup>219</sup>

## **CYP2D6**

L'isoenzyme 2D6 du cytochrome P450 est encodée par le gène *CYP2D6* sur le chromosome 22q13.1 et contient 9 exons. Contrairement aux autres isoenzymes, elle n'est pas inductible.<sup>220</sup> Le CYP2D6 représente moins de 5 % des CYP450s au niveau du foie.<sup>181</sup> Néanmoins, elle est sujette à une grande variabilité interindividuelle faisant l'objet de multitudes de recherches depuis les années 1970.<sup>221</sup> Elle est hautement polymorphique avec plus de 80 mutations non silencieuses (<http://www.cypalleles.ki.se/>) et métabolise environ 25%<sup>221</sup> des médicaments couramment utilisés en clinique favorisant son potentiel d'interactions médicamenteuses.<sup>222</sup> Les polymorphismes associés à cette isoenzyme se divisent en 4 catégories soient les métaboliseurs lents (5-10 % Caucasiens), intermédiaires (10-15% des Caucasiens), normaux (60-85% des Caucasiens) et ultrarapides (1-10 % des Caucasiens).<sup>220</sup> D'ailleurs, 35% des substrats du CYP2D6 couramment utilisés en clinique sont associés à de la surveillance thérapeutique dont le métoprolol (20 millions de prescriptions/an) et l'oxycodone représentant les 16<sup>e</sup> et 35<sup>e</sup> médicaments les plus prescrits aux États-Unis en 2012.

Au niveau extrahépatique, l'intestin grêle et les poumons expriment l'ARNm ainsi que la protéine du CYP2D6.<sup>223,224</sup> Au niveau du ventricule gauche, un petit échantillon a été testé dans notre laboratoire où il est exprimé de façon très variable dans 7 cœurs humains (Figure 12).



**Figure 12.** Expression relative de l'ARNm de l'isoenzyme CYP2D6, CYP2J2 et CYP2E1 dans les cœurs explantés de 7 patients. (Données internes obtenues par des expériences réalisées par Jade Huguet lors de travaux exploratoires)

## CYP2E1

L'isoenzyme du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) est la deuxième plus abondante enzyme exprimée dans les ventricules de cœurs humains.<sup>91</sup> Cette isoenzyme est fortement impliquée dans l'oxydation des médicaments<sup>225</sup> ou solvants à faible poids moléculaires résultant en des métabolites à potentiel cancérigène et hépatotoxique, dans la formation de radicaux libres<sup>226</sup> et dans l'oxydation de l'éthanol. L'expression de la protéine du CYP2E1 est augmentée dans un contexte d'ischémie ou de cardiomyopathie dilatée par rapport à des cœurs en bonne santé.<sup>227</sup> Cette surexpression favoriserait une augmentation du stress oxydatif dans les cellules du tissu exprimant le CYP2E1, phénomène déjà amplifié par la présence de pathologies cardiovasculaires.<sup>228,229</sup> D'ailleurs, le CYP2E1 est hautement productif en ROS (*reactive oxygen species*) et favorise l'apoptose des cellules par stress oxydatif.<sup>230,231</sup> Par contre, nous avons observé qu'il n'y avait aucune différence dans l'expression de l'ARNm (ARNm) du CYP2E1 entre des cœurs ischémiques comparativement à des cœurs non-ischémiques<sup>91</sup>

Le CYP2E1 est aussi hautement inductible de façon post-traductionnelle par l'éthanol.<sup>232</sup> L'isoenzyme CYP2E1 se localise majoritairement dans le réticulum endoplasmique de différents tissus dont le foie, les poumons, le cœur, le placenta et la peau.<sup>91,225,233</sup> Au niveau hépatique, une grande variabilité dans l'expression de la protéine et de l'ARNm a été observée chez l'humain avec cirrhose en plus d'une faible corrélation entre la protéine et l'ARNm suggérant encore une fois des mécanismes pré/post traductionnelle affectant son expression.<sup>234</sup> Au niveau cardiaque, la variabilité dans l'expression de l'ARNm du CYP2E1 (jusqu'à 1000 fois de différence entre les individus) est créée par quelques individus qui ont une plus grande expression.<sup>91</sup>

L'isoenzyme CYP2E1 catalyse la transformation de l'acide arachidonique en acide hydroxyéicosatétraoïque (HETE), substance vasoactive pouvant influencer l'homéostasie cardiovasculaire locale. Il s'avère donc pertinent d'étudier la cinétique enzymatique du CYP2E1 dans le ventricule de cœurs humains afin d'établir son profil cinétique cardiaque.

## **CYP2J2**

L'isoenzyme CYP2J2 (~40.3 kb), encodée par le gène *CYP2J2* est localisée sur le chromosome 1 et contient 8 introns et 9 exons.<sup>235</sup> Discutée à la section 1.5.2., la localisation du CYP2J2 fut démontrée dans plusieurs tissus dont l'intestin, les cellules pariétales de l'estomac, les tubules proximaux, distaux et collecteurs du rein, au niveau des cardiomyocytes et des cellules endothéliales cardiaques.<sup>91,141</sup> En 1996, la première évidence de l'existence de cette isoenzyme a été découverte par l'équipe du Dr. Darryl C. Zeldin.<sup>157</sup> Déjà, une certaine variabilité existait dans l'expression de cette isoenzyme au niveau cardiaque. Subséquemment, le CYP2J2 fut l'objet de plusieurs recherches dues à sa capacité à métaboliser de façon énantiosélective l'acide arachidonique en époxydes vasoactifs, les acides époxiéicosanoïques (EET) qui sont de puissants régulateurs du tonus vasculaire par leur capacité à baisser la pression sanguine, à diminuer l'inflammation vasculaire et améliorer la fonction contractile cardiaque.<sup>236-</sup>

<sup>244</sup> [ENREF 168](#) [ENREF 168](#) [ENREF 168](#) [ENREF 168](#) Dès lors, son implication

dans l'effet protecteur de l'homéostasie cardiovasculaire à pousser les recherches pour le développement de molécules qui favoriseraient de plus hauts niveaux d'EET en empêchant sa dégradation ou en favorisant sa production endogène. L'époxyde hydrolase soluble (sEH) est l'enzyme qui dégrade les EET. Des médicaments inhibant cet enzyme sont en développement clinique.<sup>245</sup> Ceci reste une hypothèse scientifique car l'utilisation de ces agents pharmacologiques dans une population qui sous-exprimerait déjà les isoenzymes époxydes (CYP2J2, 2C8 et 2C9) en amont de la cascade se traduirait par des concentrations d'EET plus faibles que la normale. De façon imagée, le bloc de la sEH ramènerait à des niveaux normaux et non supérieurs les concentrations d'EET. L'avantage de niveaux supérieurs d'EET fut démontré cardioprotecteur dans plusieurs études.<sup>237,246</sup> Par contre, une étape de compréhension des mécanismes en amont dans la formation des EET se doit d'être accomplie afin d'identifier de manière plus concrète les mécanismes que les maladies cardiovasculaire ont sur l'expression et l'activité des CYP450s cardiaques afin de trouver des solutions pharmacologiques plus pertinentes et logiques.

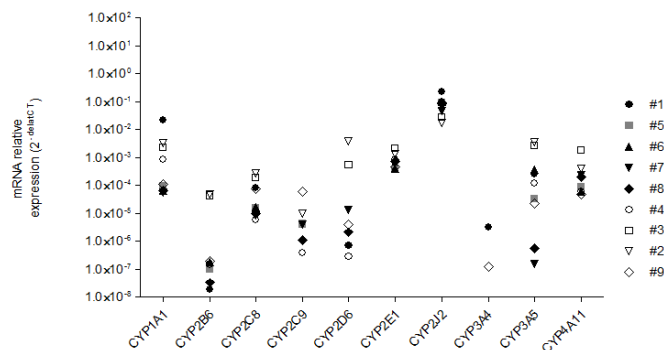
L'intérêt grandissant pour cette isoenzyme a aussi vu le jour suite à certaines études qui ont démonté que le polymorphisme CYP2J2\*7, mutation située à 50 paires de base en amont du site de départ de la transcription dans la région promotrice du gène codant pour un site de liaison à la protéine Sp1, était associé à un risque augmenté de cardiomyopathies cardiovasculaires et d'hypertension.<sup>235,239,247</sup> L'hypothèse sous-jacente à ces études se basait sur les observations de Spiecker *et collègues* qui a observé une diminution de l'activité de la région promotrice dans des vecteurs exprimant le variant allélique CYP2J2\*7.<sup>239</sup> Aucune recherche n'a par contre démontré que la mutation CYP2J2\*7 diminuait la quantité formée de la protéine CYP2J2 ou son activité ce qui supporte les résultats de nombreuses études n'ayant pas réussi à démontrer un lien entre le polymorphisme CYP2J2 et l'augmentation du risque de cardiomyopathies cardiovasculaires ou d'hypertension.<sup>248-255</sup>

### **CYP3A**

Le CYP2J2 peut aussi former le métabolite 19-HETE, qui génère des effets vasoconstrictifs, à partir de l'acide arachidonique.<sup>157,235</sup> Cette dualité dans les effets

engendrés par les métabolites formés par le CYP2J2 peut créer une certaine variabilité dans l'influence que le CYP2J2 a sur l'homéostasie cardiovasculaire. Plusieurs données sont encore manquantes sur le profil métabolique du CYP2J2 et de sa participation enzymatique locale au niveau cardiaque.

Le cytochrome 3A (famille 3, sous-famille A) est encodé par le gène *CYP3A* sur le chromosome 7q.<sup>256,257</sup> CYP3A4 et CYP3A5 représentent à eux seuls environ 50-60% des isoenzymes exprimées au foie.<sup>256,258</sup> Au niveau de l'intestin, CYP3A4 est majoritairement exprimé tandis qu'au niveau du rein, des poumons, du sang et de la glande pituitaire, l'expression en protéine et en ARNm du CYP3A5 prédomine.<sup>257</sup> Les deux isoenzymes sont polymorphiques et partagent des similarités de substrats entre elles et avec d'autres isoenzymes, dont le CYP2J2.<sup>256,259,260</sup> Au niveau du tissu cardiaque, des premiers essais ont démontré une absence d'expression du gène du Cytochrome 3A dans plusieurs régions du cœur humain dont le ventricule gauche, droit et l'aorte.<sup>261</sup> Ces résultats ont été confirmés dans notre laboratoire par Dre Michaud ouu aucun des échantillons présentés n'exprimaient de l'ARNm des CYP3A4/3A5 et ce malgré la capacité métabolique des échantillons à métaboliser le vérapamil, substrat du CYP3A.<sup>91</sup> Des études exploratoires non publiées effectuées dans mon laboratoire d'accueil m'ont permis de démontré la présence du CYP3A4 et 3A5.



**Figure 13.** Expression relative d'ARNm de différentes isoenzymes dans les cœurs explantés de 9 patients. (Données internes obtenues par des expériences réalisées par Jade Huguet lors de travaux exploratoires)

L'isoenzyme CYP3A4 fût quantifiable dans 2 échantillons sur 9 et à des niveaux très différents (**Figure 12**) tandis que l'expression d'ARNm de l'isoenzyme CYP3A5 est supérieure et d'autant plus variable (**Figure 12**). Malgré la présence d'ARNm de ces deux isoenzymes, la capacité des microsomes de cœurs humains à métaboliser le verapamil<sup>91,262</sup>, des essais plus approfondis sur le potentiel métabolique de la fraction microsomale de cœurs humains restaient à être démontrées. Ce projet de doctorat tente de décrire le phénomène à l'aide du substrat marqueur des CYP3A, le midazolam.<sup>263</sup>

### CYP4A11

L'isoenzyme CYP4A11, nommée aussi  $\omega$ -hydroxylase, est la troisième isoenzyme la plus exprimée dans le tissu ventriculaire cardiaque.<sup>91</sup> Le CYP4A11 est encodé par le gène *CYP4A11* et fut initialement observé dans le foie et dans les reins humains.<sup>264,265</sup> Cet isoenzyme est reconnue pour sa capacité d'hydroxylation d'acide gras à courtes et longues chaînes tels que l'acide laurique, l'acide arachidonique et l'acide palmitique. Son activité est NADPH et cytochrome b5 dépendante.<sup>266,267</sup> [ENREF 206](#) Son rôle au niveau cardiovasculaire a pris du temps à être reconnu compte tenu de sa faible implication dans le métabolisme des médicaments couramment utilisés.

Sa capacité à métaboliser l'acide arachidonique en 20-HETE, substance endogène et puissant vasoconstricteur, a été reconnue dès les années 1990.<sup>268,269</sup> Le rôle du 20-HETE sur le système cardiovasculaire s'effectue au niveau rénal de manière pro-hypertensive

en favorisant la vasoconstriction des cellules musculaires lisses par l'inhibition de leur hyperpolarisation ou de manière anti-hypertensive en inhibant la réabsorption du sodium (natriurèse) par l'inhibition du canal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase dans les tubules rénaux.<sup>268,270,271</sup> Il a été démontré que les niveaux de 20-HETE sont associés à des crises cardiaques d'origine ischémique.<sup>272</sup> De plus, l'isoenzyme CYP4A11 est polymorphique et la mutation C-296T fut associée à un risque élevé d'arrêts cardiaques ischémiques.<sup>273</sup> D'autres mutations existent pour le CYP4A11 dont certaines démontrent une activité catalytique différente que le type sauvage.<sup>274</sup> Au niveau cardiaque, une très grande variabilité dans l'expression de l'ARNm du CYP4A11 a été observée.<sup>91</sup> Par contre, aucune recherche n'a encore testé son potentiel métabolique dans le tissu ventriculaire cardiaque.

## 1.8 Les éicosanoïdes

Les éicosanoïdes sont des métabolites oxydés formés par l'oxygénation de la longue chaîne d'acides gras polyinsaturés de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est composé de 20 carbones et 4 double liens en position 5,6, 8,9, 11,12 et 14,15 et se retrouve naturellement estérifié en position sn-2 des phospholipidiques membranaires.<sup>275</sup> Lorsque la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) est activée ou que d'autres stimuli chimiques, physiologiques ou inflammatoires affectent la membrane, l'acide arachidonique est libéré par hydrolyse et devient disponible pour être métabolisé en différents éicosanoïdes. Trois voies enzymatiques majeures sont impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique 1) les cyclooxygénases (COX), 2) les lipoxygénases (LOX) et 3) la voie des cytochromes P450 (CYP450) divisées en deux voies distinctes soit les CYP450/hydroxylase ou  $\omega/\omega-1$  hydroxylase (CYP<sub>hy</sub>) et les CYP450/époxygénases (CYP<sub>ep</sub>).<sup>276</sup> La voie des COX est responsable de la synthèse des prostanoides (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes). L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent la voie des COX. D'ailleurs, l'aspirine est un traitement de première ligne, souvent administré en concomitance avec le clopidogrel, chez des patients souffrant d'athérosclérose.<sup>277</sup> La voie des LOX synthétise les leukotriènes, les acides hydroxyéicosatétraenoïques (HETEs) et les lipoxines. La voie des CYP<sub>hy</sub> est aussi responsable de la synthèse d'HETE reconnu comme étant des substances vasoconstrictrice.<sup>276,278</sup> La voie des CYP<sub>ep</sub> est responsable du métabolisme de l'acide

arachidonique en acides époxyeicosatriénoïques (AEE).<sup>279,280</sup> Ces métabolites de l'acide arachidonique sont depuis plusieurs années la cible de recherches approfondies considérant leur action sur le tonus vasculaire et leurs propriétés anti-inflammatoires, mitogéniques, antiapoptotiques et proangiogéniques.<sup>236,281-287</sup> Différents CYP450 sont impliqués dans la formation des métabolites AEE dont le CYP1A, 2B, 2E, mais ce sont les cytochromes CYP2C et CYP2J qui sont les plus importants enzymes de cette cascade.<sup>288,289</sup>

Les CYP2C8 et 2J2 se retrouvent majoritairement dans les tissus du système gastro-intestinal, du foie, des reins et du système endocrinien.<sup>141</sup> Seul le CYP2J2 a été identifié dans le tissu myocardique.<sup>141</sup> Le CYP2C9 se localise dans les mêmes organes que des CYP2C8 et 2J2 en plus de se retrouver dans les poumons, la peau et l'utérus.<sup>141</sup> De plus, le CYP2J2 se retrouve dans les cellules endothéliales.<sup>237</sup> Les CYP2C8, 2C9 et 2J2 sont les principaux isoenzymes responsables de la formation des AEEs.<sup>15</sup>

Ils existent quatre régioisomères des AEEs, soient le 5,6-, 8,9-, 11,12-, et 14,15-AEEs. Les différents régioisomères formés par le CYP2C<sup>208</sup> (11,12-AEE et 14,15-AEE > 5,6 AEE et 8,9-AEE) sont majoritaires comparativement à ceux formés par le CYP2J2<sup>157</sup> (24 % de 8,9-AEE, 18% de 11,12-AEE et 37% de 14,15-AEE favorisant à 76% l'énantiomère 14,15-(R,S)-AEE versus le 14,15-(S,R)-AEE). Les CYP450s génèrent des époxydes isomériques en position *cis*. Bien que des stéréoisomères en position *trans* aient été observés dans les globules rouges de rat, il n'a pas été encore prouvé que ces métabolites proviennent de l'oxydation des CYP450s.<sup>278,290-292</sup> Par ailleurs, la distribution des différents isoenzymes du CYP450 varient dans les différents tissus, prédisposant des effets spécifiques des différents métabolites.

Les acides époxyeicosatriénoïques sont métabolisés très rapidement avec une demi-vie de quelques secondes.<sup>285,293</sup> Ceux-ci sont métabolisés ou entreposés par une variété de voies physiologique. Premièrement, les AEEs sont dégradés en acides dihydroxyéicosatriénoïques (ADHEE) par une enzyme époxyde hydrolase soluble (sEH) du groupe EC3.3.2.10 codé par le gène *EPHX2*.<sup>294</sup> Le métabolisme des AEEs par la



sEH est régiosélectif. Par exemple, le métabolisme des AEEs dans les tissus de foie et de poumons de lapins ont démontré que la dégradation du 14,15-AEE est favorisée au 11,12-AEE et au 8,9-AEE.<sup>294</sup> De plus, l'affinité de la sEH pour les régioisomères est aussi sélective envers les différents isomères (14R,15S-AEE>14S,15R-AEE, 11S,12R-AEE > 11R,12S-AEE et 8S,9R-AEE > 8R,9S-AEE).<sup>294</sup> Finalement, la formation de l'isomère 14R,15R-ADHEEs par rapport au 14S,15S-ADHEEs démontre que la sEH a aussi une sélectivité métabolique.<sup>294</sup> La sEH est aussi polymorphique, deux mutations ont été identifiées comme ayant un impact sur les quantités d'AEEs soit la rs751141 (substitution d'une glycine au lieu d'une arginine à l'acide aminé 287) qui diminue l'expression enzymatique et la rs41507953 (substitution d'une arginine au lieu d'une lysine à l'acide aminé 55) qui augmente son expression.<sup>295,296</sup>

Deux voies alternatives de dégradation, autres que la sEH, ont été identifiées, la  $\beta$ -oxydation et l'élongation de la chaîne de carbones. Ces deux voies sont généralement sélectives pour le 14,15-AEE et l'11,12-AEE.<sup>297</sup> Ces deux voies sont surtout favorisées lorsque la sEH est inhibée.<sup>285,297</sup> Les AEEs peuvent aussi s'incorporer dans les phospholipides membranaires, souvent après une élongation de leur chaîne de carbones (réaction nécessitant une acétyltransférase et de l'adénosine triphosphate).<sup>297</sup> Cet entreposage est une source d'AEEs indépendante de la voie de synthèse *de novo* des CYP450s. D'autres voies de moindre importance ont été identifiées tel que l'oméga-oxydation, la conversion en substance bioactive par les COX, la liaison des AEEs cytoplasmique aux protéines liant des acides gras (*fatty acid binding protein* : FAPB) permettant de prolonger leur effet en les rendant moins disponibles à la sEH et finalement la conjugaison par la glutathionne-S-transférase (GST).<sup>285,298</sup> Bref, il existe plusieurs cibles enzymatiques soit en amont ou en aval pour contrôler les concentrations cellulaires d'AEEs.

Le contrôle des concentrations d'AEEs est cliniquement pertinent considérant leurs multiples actions contrôlant le tonus vasculaire. Les AEEs sont synthétisés et relâchés par les cellules endothéliales et comme le monoxyde d'azote (NO) sont considérés comme des facteurs hyperpolarisant dérivés de l'endothélium (EDF).<sup>288,299-301</sup> Les AEEs

agissent comme des hormones de façon paracrine sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et autocrine sur la cellule endothéliales elle-même.<sup>302</sup> De plus, les AEEs vasodilant les CMLVs de plusieurs façons. Premièrement, dans la cellule endothéliale, les AEEs activent de façon intracellulaire différents canaux ioniques à potentiel transitoire (*transient receptor potential channel*:TRP) provoquant une augmentation de calcium intracellulaire ( $Ca^{2+}_i$ ). L'élévation de  $[Ca^{2+}_i]$  activera les canaux à conductance faible et intermédiaire d'ions potassium ( $K^+$ ) (*Small/Intermediate conductance Calcium-Activated  $K^+$  channels*:  $SK_{ca}$  et  $IK_{ca}$ ) provoquant une hyperpolarisation (la cellule devient plus polarisée, plus négative) de la cellule par la sortie d'ions potassium.<sup>303</sup> Cette hyperpolarisation peut se transmettre par les jonctions communicantes et diminuer le potentiel de la CMLV ou par la sortie des ions  $K^+$  de la cellule endothéliale qui activent différents canaux ioniques ( $Na^+/K^+$ ,  $K_{ATP}$ ) sur la membrane de la CMLV provoquant à leur tour l'hyperpolarisation de la cellule. L'hyperpolarisation de la CMLV entraîne une diminution du  $[Ca^{2+}_i]$ , diminuant les possibilités de liaison avec la calmoduline qui par une cascade intracellulaire favorise la déphosphorylation de la myosine entraînant la relaxation de la cellule vasculaire.<sup>304</sup>

Les AEEs produisent une vasodilatation des CMLV de façon paracrine directe par liaisons à des canaux ioniques (canaux à conductance forte sensible au calcium :  $BK_{ca}$ , canal potassique sensible à l'adénosine triphosphate :  $K_{ATP}$ , canal à voltage de longue durée dépendant du calcium: L-Type  $Ca^{2+}$  et le récepteur 4 activé par des vanilloïdes : TRPV4) et à des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (récepteurs aux AEEs et le récepteur aux thomboxanes : TPR) de la CMLV.<sup>285,305-307</sup> Cette liaison entraîne une multitude de cascades intracellulaires menant, à leur tour, à l'hyperpolarisation de la CMLV, à une diminution du  $[Ca^{2+}_i]$  et donc à une vasodilatation de la CMLV. Également, les AEEs agissent de façon autocrine en se liant à des récepteurs sur la membrane de la cellule endothéliale induisant, par différents mécanismes intracellulaires, plusieurs fonctions physiologiques autre que le maintien du tonus vasculaire.

En effet, comprendre les interactions modulant les concentrations intracellulaires des AEEs, soit par leur synthèse par les cytochromes P450 ou par leur dégradation par la

sEH, en situation physiologique, permettrait de mieux cibler les approches thérapeutiques dans les traitements de certaines maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose.<sup>308-310</sup>

De ce fait, plusieurs polymorphismes existent pour les CYP450 impliqués dans la formation et la dégradation d'AEEs. Certains polymorphismes ont été associés à une diminution du risque d'incidents cardiovasculaires, à une diminution de la prévalence des crises cardiaques ou à un effet protecteur contre l'hypertension, pour ne nommer que ceux-ci.<sup>311-313</sup> King *et al* a démontré qu'il y a une association possible entre le génotype CYP2J2\*7 et l'hypertension chez les Caucasiens mâles et chez les Caucasiens sans historique familiale d'hypertension.<sup>314</sup>

Plusieurs chercheurs ont réussi à développer des modèles pour isoler le phénomène de la variation des AEEs chez l'humain de façon hémodynamique. Ceci permet d'expliquer l'impact des AEEs sur la paroi artérielle et de différencier cet impact chez différents groupes de patients.<sup>315,316</sup> Par contre, aucune de ces études n'a étudié l'impact des polymorphismes sur les enzymes CYPep reconnus comme étant de possibles facteurs de risques des maladies cardiovasculaire. Aussi, les différences entre les hommes et les femmes n'ont pas encore été identifiées.

## 1.9 Variabilité dans la réponse aux médicaments

La réaction du corps humain envers les corps étrangers (médicaments, produits chimiques ou aliments) a modelé la diversité enzymatique humaine et génère divers degrés de réponse rapidement reconnue en tant que variabilité interindividuelle. La variabilité dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des composés exogènes et endogènes implique différentes composantes physiologiques. Au niveau enzymatique les composantes susceptibles de varier sont la quantité de protéines microsomales et l'abondance de chacun des CYP450s exprimés dans les microsomes. Ces deux composantes rajoutent à la complexité d'identifier les facteurs associés à la variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments. Il est important de bien isoler la source étudiée afin d'éliminer les biais potentiels.

L'objectif d'étudier les facteurs à l'origine de la variabilité dans le métabolisme des médicaments par les CYP450s au niveau local est de cibler les individus à risque de répondre de façon différente aux doses recommandées et de prévenir un éventuel échec thérapeutique ou une toxicité accrue. La variabilité dans la réponse aux médicaments peut être observée sur différentes cibles thérapeutiques (transporteurs, récepteurs, enzymes), associée à une toxicité (transporteurs, récepteurs, enzymes) ou à des protéines impliquées dans l'élimination des médicaments par métabolisme ou transport. Généralement, cette variabilité est gérée par les concentrations plasmatiques qui sont dépendantes du premier passage hépatique (pour les médicaments administrés oralement). Il est de plus en plus reconnu que les concentrations locales de médicaments à l'origine d'une action thérapeutique ou toxique sont différentes que celles retrouvées au niveau plasmatique. Par ailleurs, une même concentration plasmatique peut créer différentes réponses (toxiques ou pharmacologiques) chez deux individus.<sup>2</sup> Ainsi, les cibles visées par les médicaments réagissent aussi en fonction de la concentration locale qui peut aussi être gérée par des mécanismes locaux d'élimination (enzymatique ou par transporteur). Ce concept oriente mes travaux de recherches qui tentent de découvrir les sources responsables (Chapitre 4) de la variabilité observée (Chapitre 3) dans la cinétique enzymatique d'élimination par les CYP450s dans le tissu ventriculaire cardiaque humain à l'aide de substrats marqueurs des CYP450s (Chapitre 2).

Les enzymes membres des familles 1, 2 et 3 du système CYP450 sont impliquées dans le métabolisme de la majorité des médicaments utilisés par l'humain.<sup>123,317</sup> Les CYP450s deviennent des causes populaires sous-jacentes à la variabilité dans le comportement cinétique et la réponse aux médicaments. Ces protéines sont susceptibles de varier autant dans leurs expressions que leurs fonctions dépendamment de plusieurs facteurs dont la génétique, l'âge, le genre etc.<sup>236,284</sup> Au niveau hépatique, les facteurs affectant l'expression et l'activité des CYP450s ont grandement été étudiés.<sup>318-321</sup> Par contre, au niveau local, les informations sont plus restreintes et peu d'études explorent les facteurs pouvant faire varier le comportement (expression et activité) enzymatique des CYP450s dans le cœur humain.

### 1.9.1 Facteurs Génétiques : Polymorphismes

Les 'variations dans la séquence d'ADN' qui prédisposent les individus à des différences dans la réponse aux médicaments sous-tendent la discipline qu'est la pharmacogénétique.<sup>322,323</sup> Il est reconnu depuis 2014 par l'agence gouvernementale américaine (FDA) que 138 monographies de médicaments devaient présenter des données pharmacogénétiques.<sup>324</sup> Un exemple déterminant dans l'évolution de la pharmacogénétique est la warfarine, un anticoagulant oral. Dès les années 70, il avait été démontré que l'effet d'anticoagulants oraux pouvaient varier jusqu'à 100 fois entre les individus ayant des profils génétiques différents.<sup>325,326</sup> La warfarine est un exemple qui entrecroise plusieurs concepts de variabilité interindividuelle. La warfarine est entre autre métabolisée par le CYP2C9 et agit sur le complexe enzymatique vitamine K époxyde réductase (encodée par le gène *VKORC1*).<sup>327,328</sup> L'isoenzyme CYP2C9 et l'enzyme VKORC1 expriment des polymorphismes qui influencent les comportements pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la warfarine.<sup>327</sup> Cet exemple, parmi tant d'autres, démontre bien que la génétique influence la réponse des médicaments.

Les mêmes polymorphismes génétiques uniques (SNP : *single nucleotide polymorphism*) s'expriment au niveau extrahépatique et l'impact peut différer dépendamment de l'abondance des CYP450s dans le tissu en question. À ce jour, l'abondance de 9 isoenzymes (CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 2J2, 3A5 et 4A11<sup>91</sup>) a été déterminée dans le ventricule de cœurs humains et expriment toutes un ou plusieurs polymorphismes.

Le gène *CYP1A1* est associé à plus de 13 polymorphismes génétiques uniques différents dont aucun ne semble associé à une perte fonctionnelle de la protéine. (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>). Parmi les 9 isoenzymes observées dans le ventricule de cœurs humains, l'isoenzyme CYP2B6 est la moins exprimée tout en étant associée à plus de 38 différents variants alléliques fonctionnels *in vitro* ou *in vivo* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2b6.htm>).<sup>91</sup> Plus de quatorze variants alléliques ont été découverts à ce jour pour le gène codant l'isoenzyme CYP2C8 parmi lesquels 5 sont connus pour diminuer l'activité enzymatique *in vitro* mais aucun changement de



**Figure 14.** Expression relative de l'ARNm des CYP3A4 et CYP3A5 (CYP3A/GAPDH) dans le tissu de ventricule de cœurs humains dans 8 tissus de cœurs humains explantés. Les résultats sont présentés selon la technique  $2^{-\Delta CT}$  sans calibrateur. La méthode utilisée est mentionnée dans Michaud et collègues, 2010.<sup>91</sup>

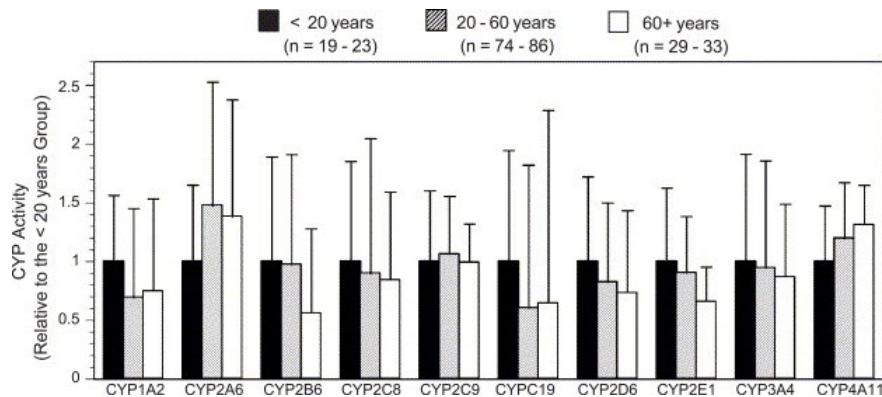
Finalement, il existe dix variants alléliques pour le gène *CYP4A11* dont la majorité ont démontré une diminution de la capacité enzymatique d' $\omega$ -hydroxylation du substrat endogène acide arachidonique.<sup>274</sup> Reste à confirmer son comportement au niveau cardiaque.

## 1.9.2 Facteurs Non-Génétiques : Physiologiques

### 1.9.2.1 Âge

Dans les années 60 et 70, le vieillissement de la population a fait place à l'ajout d'une catégorie d'utilisateurs de médicaments : les 65 ans et plus.<sup>331</sup> Les personnes âgées sont devenues une population cible pour la polypharmacie (usage quotidien de plusieurs médicaments).<sup>332</sup> D'ailleurs, environ 50 % de la sous-population des personnes âgées utilisent des médicaments non nécessaires.<sup>332</sup> L'utilisation accrue de plusieurs médicaments par les personnes âgées depuis les dernières décennies se justifiait par la philosophie médicale de guérir le plus de maux possibles qui apparaissaient en vieillissant. Ce phénomène a mis à risque cette sous-population à une augmentation d'effets secondaires, aux interactions médicamenteuses, à une diminution de la conformité de l'usage (*drug compliance*), à une perte cognitive et à plusieurs autres troubles affectant la qualité de vie.<sup>332</sup> L'augmentation de la demi-vie des différents médicaments chez les personnes âgées fut l'un des premiers indices justifiant que cette population était plus à risque d'une diminution de la qualité de vie.<sup>331,333</sup> L'augmentation de la demi-vie d'un médicament suggérait que différents phénomènes pharmacocinétiques pouvaient être affectés par le vieillissement. Ceci additionné à l'usage de plusieurs médicaments et à l'apparition de maladies, les personnes âgées

représentaient une population chez qui la variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments était préminente.<sup>334,335</sup> Les changements majeurs impliqués dans le vieillissement ayant un impact sur le devenir des médicaments sont la diminution de la masse du foie engendrant une diminution de l'effet de premier passage hépatique, une diminution de la masse du rein, une diminution du flux sanguin hépatique et rénale, une augmentation de la masse grasseuse et une diminution du volume d'eau corporel.<sup>334-336</sup> Plusieurs études ont démontré que le vieillissement n'altérait pas la fonction intrinsèque des enzymes métaboliques CYP450s *in vitro* chez l'humain.<sup>337-339</sup> Des résultats ont quand même démontré une légère diminution de la fonction métabolique des CYP1A2 (p=0,018), CYP2D6 (p=0,015) et CYP2E1 (p=0,006) dans les microsomes de foie humain (Figure 15).<sup>340</sup> La très grande variabilité dans chacun des sous-groupes d'âge suggère que l'âge ne peut expliquer à lui seul les changements interindividuels de la fonction intrinsèque des CYP450s.<sup>341</sup>



**Figure 15.** Effet de l'âge dans le métabolisme des CYP450s dans les microsomes de foies humains. D'après Parkinson *et collègues*.<sup>340</sup>(Licence pour utilisation # 3673680919397)

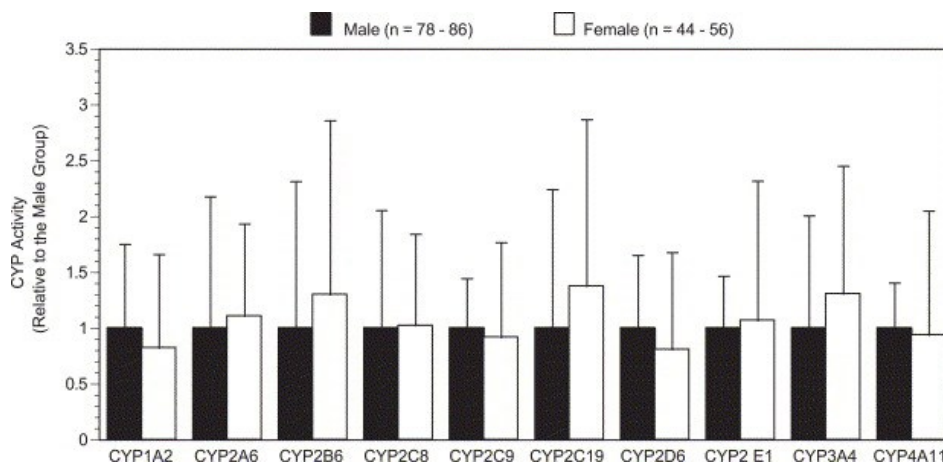
Les changements de clairance observés dans cette sous-population peuvent provenir de l'utilisation de plusieurs médicaments favorisant des interactions médicamenteuses ou des altérations des fonctions biologiques affectant ainsi le phénotype des patients et non l'activité intrinsèque d'une isoenzyme en particulier.<sup>341,342</sup> [ENREF 24](#) L'utilisation de l'âge dans un modèle prédictif peut devenir une variable redondante, car elle englobe l'état physiopathologique du patient ainsi que l'utilisation de plusieurs médicaments qui sont deux facteurs susceptibles d'expliquer la variabilité entre les patients âgés. Il faut



donc être prudent lorsque ce paramètre est introduit dans un modèle de prédiction de variabilité.<sup>343</sup>

### 1.9.2.2 Genre

Une grande variabilité autant chez les hommes que chez les femmes a été observée dans le métabolisme des médicaments par les CYP450s *in vitro* indiquant que le genre n'explique pas complètement la variabilité observée entre les individus de sexes opposés (Figure 15).<sup>340</sup> Il avait d'ailleurs déjà été démontré que le genre n'affectait pas le métabolisme microsomal hépatique.<sup>338</sup>



**Figure 16.** Effet du genre dans le métabolisme des CYP450s dans les microsomes de foies humains. D'après Parkinson *et collègues*.<sup>340</sup>(Licence pour utilisation # 3673680919397)

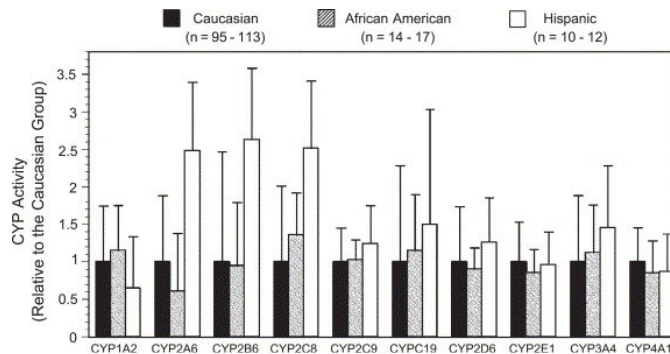
Par contre, au niveau basal, les femmes et les hommes ont des paramètres physiologiques différents qui peuvent affecter le devenir d'un médicament.<sup>344,345</sup> Des différences dans la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de certains médicaments ont été observées entre les hommes et les femmes.<sup>345</sup> Par contre, les résultats sont controversés et plusieurs autres facteurs influencent les différences hommes-femmes dans la clairance des médicaments tels que la diète, les modes de vie et les maladies dépendantes du genre associées à une polypharmacie différente.<sup>341</sup> Il a été récemment démontré que les différences homme-femme au niveau de l'expression des transporteurs membranaires telle que la p-glycoprotéine (P-gp) pourraient jouer un rôle majeur dans les différences sexuelles observées sur la clairance des substrats du CYP3A4.<sup>346</sup> Le

genre est donc lui aussi un facteur pouvant créer un biais lorsqu'utilisé dans des études déterminant les causes de la variabilité observée dans la réponse aux médicaments.

### 1.9.2.3 Ethnicité

Finalement, l'ethnicité est une autre caractéristique intrinsèque qui peut influencer l'activité des CYP450s dans le foie humain (**Figure 17**).<sup>340</sup> Généralement, l'ethnicité sera jumelée aux facteurs génétiques où certaines populations exprimeront différents génotypes.

Il existe tout de même des différences dans le métabolisme des médicaments entre les différentes ethnies qui empêchent de généraliser car le phénotype exprimé par certaines personnes ayant une même maladie ou prenant les mêmes médicaments pourrait être similaire malgré une différence ethnique.



**Figure 17.** Effet de l'ethnicité dans le métabolisme des CYP450s dans les microsomes de foies humains. D'après Parkinson *et collègues*.<sup>340</sup>(Licence pour utilisation # 3673680919397)

### Facteurs Non-Génétiques : Physiopathologiques

#### *Maladies comme facteur de risque*

Les CYP450s des familles 1, 2, 3 et 4 sont responsables de la formation des 150 éicosanoïdes endogènes, métabolites de l'acide arachidonique.<sup>347</sup> Une défectuosité dans l'expression ou la fonction d'une isoenzyme impliquée dans la synthèse d'éicosanoïdes peut engendrer une altération dans l'homéostasie de différentes fonctions biologiques et ainsi être à la source du développement de maladies.<sup>347,348</sup> Il est important de différencier l'implication d'une dysfonction dans les CYP450s et le risque de maladie

versus l'impact d'une maladie sur la fonctionnalité des CYP450s. Par exemple, le métabolisme par les CYP450s est diminué au niveau de foies affectés par une dégénérescence progressive ou une cirrhose.<sup>340,349-351</sup> Au niveau de l'homéostasie cardiovasculaire, l'importance des CYP450s a été reconnue dans les années 1980-90.<sup>352</sup> L'implication des métabolites vasoactifs provenant du métabolisme de l'acide arachidonique par les CYP450s a été déterminée par l'impact que ces métabolites avaient sur certaines cellules cardiaques (cardiomyocytes et endothéliales).<sup>219,282,283,352,353</sup> [ENREF 33](#) [ENREF 33](#) [ENREF 33](#) Une altération dans l'expression ou la fonctionnalité des isoenzymes du CYP450 influence les niveaux d'écicosanoïdes vasoactifs et par conséquent l'homéostasie du cœur.<sup>347,354</sup>

Par ailleurs, la capacité du muscle cardiaque à se contracter dépend, entre autres, de l'apport en oxygène fourni par la circulation coronarienne.<sup>90</sup> Cet apport sanguin peut être troublé par un blocage complet (infarctus) ou par un rétrécissement des artères coronaires (angine de poitrine). Les causes pouvant altérer la circulation coronarienne sont multiples dont l'origine ischémique fait l'objet de plusieurs recherches depuis les années 1970.<sup>355,356</sup> Une altération du muscle cardiaque à se contracter pour cause ischémique, i.e. un manque d'apport en oxygène aux cellules, n'est encore pas officiellement reconnue comme cardiomyopathie officielle et était présentée sous le terme 'cardiomyopathie spécifique' selon l'Organisation mondiale de la Santé en 1995.<sup>356-358</sup> [ENREF 40](#) Aujourd'hui, le terme cardiomyopathie ischémique est catégorisé sous la section de maladie cardiaque chronique.<sup>II</sup>

Les cardiomyopathies peuvent mener à de l'insuffisance cardiaque, pathologie complexe dans laquelle plusieurs voies hormonales sont activées en plus de créer un stress oxydatif dans plusieurs organes.<sup>359,360</sup> Les différentes cardiomyopathies ischémiques ou non ischémiques sont à l'origine d'altérations dans l'activité des principales enzymes époxygénases CYP2J2, 2C8 et 2C9 exprimées dans le cœur.<sup>352</sup> Ainsi, une altération de fonctions des CYP450s cardiaques affecte directement l'homéostasie cardiaque

---

<sup>II</sup>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision: I25.5, <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2015/en#/I25.5>, accédé 21 juillet 2015.

cellulaire.<sup>361</sup> Une étude a démontré par la technique utilisant une puce à ADN (*oligonucleotide microarrays*) que l'expression du gène CYP2J2 (HSU37143, P450 monooxygénase) était augmentée de 1,8 fois dans les ventricules gauches de cœurs explantés de patients, provenant de la banque Lifebank de l'Ohio, avec une cardiomyopathie dilatée (n=8) par rapport à des cœurs considérés non-insuffisants cardiaques (n=7).<sup>362</sup> Les cœurs insuffisants cardiaques devraient être davantage protégés par les éicosanoïdes vasoactifs vu leur surexpression du gène *CYP2J2* pouvant générer plus d'éicosanoïdes vasoactifs cardioprotecteurs (EET). Cette observation ne concorde pas avec l'association cardio-protectrice provoquée par la surexpression du CYP2J2 et suggère des mécanismes post-transcriptionnels contrecarrant cette surexpression du gène diminuant ainsi son activité intrinsèque associée à la formation de métabolite cardioprotecteur.<sup>363-367</sup> [ENREF 49](#) Le faible échantillon utilisé dans cette étude pourrait avoir un impact sur leurs conclusions.<sup>362</sup>

L'insuffisance cardiaque est caractéristique d'un état inflammatoire systémique reconnu par l'élévation des cytokines proinflammatoires dont le TNFalpha, l'interleukine 1 et 6 dans le plasma de patients.<sup>368,369</sup> L'état inflammatoire active aussi la voie NF-kB qui est reconnue pour diminuer l'expression des CYP450s.<sup>364,368</sup> [ENREF 47](#) La production d'espèces réactives oxygénées et de lipopolysaccharides est stimulée lors d'un état inflammatoire.<sup>364,368</sup> Il est reconnu qu'un état inflammatoire général altère l'expression et l'activité des CYP450s *in vitro* et *in vivo* chez l'humain et dans différents modèles animaux.<sup>363,364,370-372</sup> Un événement ischémique est un phénomène qui enclenche les processus pro-inflammatoires et de la même façon que l'insuffisance cardiaque, son impact sur l'expression et l'activité des CYP450s est suggéré non négligeable.<sup>373,374</sup>

Aucune étude à ce jour, selon nos connaissances, n'a étudié l'impact des cardiomyopathies sur le métabolisme de médicaments sélectifs pour les isoenzymes exprimées au niveau cardiaque. Une partie de mes travaux de recherche étudient l'impact de maladies à caractère ischémique comme facteur influençant l'expression et la fonctionnalité du CYP2J2 exprimé au niveau cardiaque (Chapitre 3).

#### 1.9.2.4 Les médicaments comme facteur de variabilité sur le métabolisme des CYP450s

Les maladies incluent par défaut l'utilisation de médicaments qui sont eux aussi un facteur de risque pouvant faire varier les niveaux d'expression et d'activité des CYP450s [ENREF 10](#) surtout lors d'interactions médicamenteuses affectant le phénotype de clairance des médicaments soit par induction, inhibition ou activation.<sup>10</sup> Globalement, cela peut se traduire en une différence dans la pharmacocinétique ou pharmacodynamie de médicaments métabolisés par les CYP450s. Plusieurs études démontrent que la transcription des gènes du CYP450 est induite par l'utilisation de différents médicaments engendrant une augmentation de l'activité métabolique.<sup>375</sup> Le benzo- $\alpha$ -pyrène et le phénobarbital sont parmi les premiers composés à avoir été identifiés comme inducteurs de certains CYP450s dans les années 60.<sup>375,376</sup> Cette sélectivité dans l'induction des CYP450s était un précurseur d'une variabilité interindividuelle pouvant suggérer que les mécanismes de contrôle de la transcription étaient différents pour différentes isoenzymes.<sup>375</sup> La découverte de ce phénomène a aussi permis d'établir l'effet néfaste de l'induction par l'augmentation du métabolisme hépatique de plusieurs stéroïdes comme l'estradiol et la progestérone.<sup>377 378</sup>

L'activation des isoenzymes du CYP450 est un autre phénomène qui peut engendrer de la variabilité dans la réponse aux médicaments de façon plus immédiate au moment de l'administration du médicament contrairement à l'induction qui est un processus plus lent nécessitant la transcription *de novo* du gène. Par exemple, l'hydroxylation de la zoxazolamine en 6-hydroxyzoxazolamine dépendante des CYP450s hépatiques chez les rats est activée par la flavone (250  $\mu$ M).<sup>379</sup> La quinidine stimule le métabolisme du diclofénac par les CYP450s *in vivo* chez le singe.<sup>380</sup> Ce sont quelques exemples qui démontrent que les médicaments peuvent activer les isoenzymes du CYP450 par différents mécanismes de façon aiguë.<sup>381,382</sup> Finalement, l'inhibition compétitive, non-compétitive ou incompétitive des isoenzymes du CYP450 par interaction médicamenteuse ou par diminution de la transcription des gènes est un autre phénomène crucial qui peut provoquer de la variabilité dans la réponse aux médicaments ou composés endogènes.<sup>383,384</sup>

### 1.9.3 Facteurs environnementaux

Différents facteurs environnementaux comme l'exercice, l'alcool, la diète et l'usage de la cigarette peuvent influencer le métabolisme des CYP450s par inhibition, induction ou activation.<sup>375</sup> Les hydrocarbonés polycycliques aromatiques, la pyridine et l'acétone présents dans la fumée de cigarette sont des inducteurs de certaines isoenzymes dont le CYP1A1, 1A2 et 2E1 d'où son importance en tant que facteur de variabilité dans le métabolisme de substrats de ces isoenzymes, particulièrement au niveau extrahépatique.<sup>375,385</sup>

## 1.10 Résumé de l'état des connaissances, buts de la thèse

La preuve que les médicaments se distribuent dans le cœur n'est plus à faire.<sup>386,387</sup> Certains médicaments s'y distribuent pour exercer leurs fonctions thérapeutiques. D'autres médicaments s'y distribuent et peuvent générer un effet qui bouleverse l'homéostasie contractile du cœur. Par exemple, des essais *in vitro* avec le vérapamil ont démontré son potentiel d'inhibition du canal potassique  $I_{Kr}$  ( $IC_{50}$  0,16  $\mu$ M) depuis l'intérieur de la cellule.<sup>388</sup> Le puissant alcaloïde ibogaïne utilisé contre les dépendances principalement à l'héroïne fut démontré avoir un potentiel de blocage du canal potassique  $I_{Kr}$  ( $IC_{50}$  4  $\mu$ M) du côté cytosolique (intracellulaire) de la cellule.<sup>389</sup> La concentration à laquelle un médicament engendre le blocage des canaux potassiques est initialement gouvernée par le foie qui gère les concentrations plasmatiques circulantes. Par contre, les mêmes concentrations plasmatiques d'un médicament chez deux individus peuvent engendrer une cardiotoxicité chez l'un et non chez l'autre. Cette variabilité entre les individus suggère que les concentrations plasmatiques d'un médicament ne sont pas toujours le facteur limitant à un effet (toxique ou thérapeutique). Ceci suggère que la concentration intracellulaire perçue par la cellule est autant importante que celle quantifiée dans le plasma et des différences entre les deux existeraient de par les différents mécanismes (transport, métabolisme, liaison protéines plasmatiques) existant au niveau hépatique *versus* extrahépatique. Cette idée renforce le fait que d'autres mécanismes que ceux reconnus en pharmacocinétique conventionnelle régissent les concentrations tissulaires au niveau cardiaque appuyant notre hypothèse de contrôle locale des concentrations de médicaments.

La distribution des médicaments dans les cellules du cœur est étudiée par différentes techniques. Par exemple, lors d'une chirurgie à cœur ouvert, des échantillons de fluides péricardiques prélevés chez l'homme ont détecté des concentrations de céforanide et céfamandole, deux antibiotiques administrés *i.v.*, à des concentrations équivalentes à environ 0,3 et 0,4 fois celles quantifiées dans le plasma.<sup>390</sup> La technique de tomographie par émission de positron (PET) représente une autre technique permettant d'observer la distribution de médicament en temps réel dans différents tissus. Par exemple la

distribution dans le myocarde humain de la trovafloxacin, maintenant retirée du marché pour hépatotoxicité, fut observée à des concentrations équivalentes (3,25 µg/ g) à 10 % de celle quantifiée dans le foie (35 µg/ g).<sup>391</sup> Bref, l'évidence de la distribution d'agents pharmacologiques dans les cellules du cœur humain, particulièrement les cardiomyocytes, est évidente mais les techniques utilisées permettant d'observer cette distribution sont soit très invasives, inexactes ou excessivement coûteuses. Ces données recueillies dans différentes sphères scientifiques utilisant différentes approches expérimentales ont toutes pour objectif de découvrir les modes d'actions associés aux toxicités cardiaques dans un objectif ultime de les prévenir.

Le défi est de comprendre et prévoir 1) quelles seront les concentrations d'un médicament au niveau local chez l'humain, 2) seront-elles suffisantes pour exercer un effet potentiellement néfaste ou bénéfique pour la cellule et 3) seront-elles régies par des mécanismes locaux de métabolisme médiés par les CYP450s. Sachant qu'une distribution dans les cardiomyocytes semble nécessiter la pénétration des médicaments à l'intérieur de la cellule et que les cellules du cœur humain (endothéliales, cellules musculaires lisse, cardiomyocytes) expriment certains CYP450s, nous suggérons que les médicaments pénétrant les cellules du cœur humain sont non seulement susceptibles d'effectuer un effet mais aussi d'être exposés au système enzymatique des CYP450s. Advenant la possibilité que ces agents pharmacologiques soient substrats d'isoenzymes exprimées au niveau cardiaque, le métabolisme local pourrait influencer leurs concentrations intracellulaires.

Mes travaux essaient de répondre à l'hypothèse que l'existence d'isoenzymes du CYP450 dans certaines cellules du cœur humain agit comme mécanisme régulateur des concentrations locales si celles-ci sont en quantités suffisantes pour se lier aux dits CYP450s. De façon indirecte, un moyen de déterminer ce potentiel est de mettre en relation les concentrations effectrices locales ( $K_m$  d'une isoenzyme et l' $IC_{50}$  d'une cible thérapeutique ou toxique comme le canal potassique  $I_{Kr}$ ). De façon simple, la concentration intracellulaire d'un médicament se distribuant dans le cœur humain est à risque de varier si elle se retrouve en quantité suffisante pour activer son métabolisme



par une isoenzyme du CYP450. Parallèlement à ce phénomène, si une modification d'activité par l'isoenzyme du CYP450 existe (augmentation ou diminution de l'expression), cela pourrait faire fluctuer les concentrations intracellulaires. Il est donc crucial de comprendre le métabolisme des CYP450s et leurs facteurs de variabilité dans le tissu cardiaque.

Autant *in vitro* qu'*in vivo* les recherches ne cessent d'évoluer afin d'établir les mécanismes impliqués ainsi que les facteurs associés à la variabilité dans la réponse (toxique / thérapeutique) aux médicaments. Il existe une grande variabilité dans la réponse aux médicaments causée par des interactions médicaments-CYP450s. Les facteurs impliqués dans la variabilité associée au métabolisme des isoenzymes du CYP450 exprimées dans le cœur humain restaient à être discernés. Mes travaux d'études doctorales s'inscrivent dans un objectif de démontrer l'étendue du métabolisme extrahépatique dans les ventricules de cœurs humains par les différents CYP450s s'y exprimant. De plus nous voulions évaluer la potentielle fluctuation locale des concentrations d'un médicament pouvant engendrer une réponse différente par la caractérisation de paramètres de cinétique enzymatique chez différents sous-groupes de patients exprimant des facteurs associés à la variabilité interindividuelle dans l'expression et l'activité des CYP450s.

Notre approche fut de développer un cocktail de médicaments substrats et marqueurs des différentes isoenzymes exprimées dans le ventricule de cœurs humains afin d'observer le potentiel métabolique de la fraction microsomale des ventricules humains (MCH) envers les différents substrats-marqueurs (manuscrit 1). L'usage de différents substrats démontrés être sélectifs envers certaines isoenzymes du CYP450 permet d'étudier le métabolisme de ces dites isoenzymes dans des tissus extrahépatiques. L'utilité principale du développement de ce premier volet était de permettre l'usage concomitant de ces substrats dans des tissus dont la quantité est souvent restreinte ou petite de par leur accessibilité (tissu nécessitant d'être pris en charge lors de transplantation afin de conserver l'intégrité physique des tissus), et de par l'usage d'un petit volume (grosseur) pour chaque expérience. Ainsi, l'objectif ultime du développement de cocktails

médicamenteux était d'optimiser la quantité de résultat à travers l'usage unique d'un tissu. De façon concrète, il s'agissait d'incuber plusieurs substrats médicamenteux 1) démontrés pouvant cibler qu'une seule isoenzyme (sélectivité) en particulier et ainsi permette l'étude de cinétique enzymatique de ces substrats tout en ayant préalablement établie 2) l'absence d'interaction entre les substrats (inhibition, activation) et ce dans un 3) milieu optimal (effet de tampon). Ces expériences se sont échelonnées sur 2 ans et demi (6 sessions), de l'été 2010 à l'hiver 2012, période durant laquelle plusieurs problèmes sont survenus nous obligeant à adapter les conclusions de ce premier volet.

Par la suite, nous avons combiné des études métaboliques pour certains substrats-marqueurs à des tests d'inhibition spécifiques avec inhibiteurs chimiques et auto-immun (anticorps) en plus des tests de sensibilité à différentes températures afin d'identifier les isoformes et types enzymatiques impliqués dans les réactions métaboliques des substrats étudiés (manuscrit 2). L'objectif ultime était de démontrer, dans les HHM, le profil métabolique des substrats incluent dans les cocktails médicamenteux développés dans le volet 1. Suite à la renonciation au cocktail #2 dû aux interactions entre les 3 substrats, à l'abandon du substrat acide dodécanoïque (de par l'observation d'une absence d'activité dans les HHM) et des problèmes de saturation rencontrés par le substrat tolbutamide, seul le premier cocktail fût utilisé dans les expériences subséquentes. Suite aux essais préliminaires dans 12 cœurs explantés avec les 4 substrats du cocktail #1, les substrats midazolam et bupropion dans les HHM furent eux aussi laissés de côté des études métaboliques à cause que la formation des métabolites était non quantifiable. Seuls les substrats ébastine et chlorzoxazone permirent de poursuivre des études de comportements métaboliques dans les HHM. Nous avons tenté de démontrer 1) la formation des métabolites dans l'intervalle de la courbe analytique permettant l'obtention de résultats fiables et quantifiables, 2) la sélectivité démontrée au volet 1 des substrats ébastine et chlorzoxazone envers le CYP2J2 et CYP2E1, respectivement, dans les HHM. Ce deuxième volet a permis 1) la démonstration du métabolisme du substrat ébastine dans les HHM et imputer la responsabilité à l'isoenzyme CYP2J2, 2) la démonstration du métabolisme du substrat chlorzoxazone dans les HHM, de source inconnue, mais présent en quantité substantielle et variable entre différents individus et

3) de démontrer l'effet du cocktail #1 sur le métabolisme de l'ébastine et de la chlorzoxazone. Ce volet a été réalisé de l'hiver 2011 à l'hiver 2012 (4 sessions) entrecroisé par l'initiation du volet 3 lors de l'été 2012 jusqu'à la fin de la session de l'automne 2013.

Finalement, nous avons étudié différents facteurs intrinsèques et extrinsèques chez les patients des cœurs explantés afin d'étudier leur association avec la variabilité observée dans l'expression (ARNm) et l'activité du CYP2J2, activité indirectement étudiée par le métabolisme du substrat marqueur ébastine (manuscrit 3). L'objectif ultime était de caractériser les profils d'activités dans la plus large cohorte de tissus de cœurs explantés. Ceci permettrait éventuellement la comparaison entre la capacité métabolique du CYP2J2 (clairance) à celle du débit coronarien pour de futures études d'extrapolation *in vitro/in vivo*. L'intérêt était de comprendre le comportement enzymatique du CYP2J2, ses sources de variabilité, pour ensuite comprendre le contrôle endogène et exogène exercé par le CYP2J2 au niveau cardiaque.

## **Section II : Travaux de recherche**

## **2. Chapitre 2 – Manuscrit 1**

**Élaboration d'un cocktail de substrats-types ciblant sélectivement les isoenzymes du CYP450 exprimées dans le ventricule humain.**

## 2.1 Avant-propos

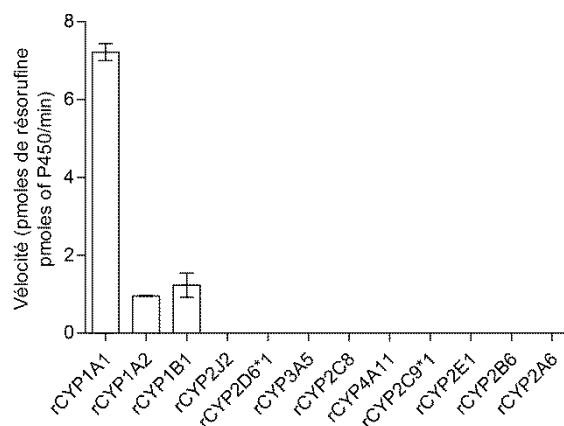
### 2.1.1 Introduction

Plusieurs stratégies existent pour étudier le métabolisme des CYP450s *in vitro*. L'approche classique fait intervenir un substrat-type sélectif pour une isoenzyme mise en présence d'une matrice (cellulaire, microsomale, recombinante) dont le ou les métabolite(s) formé(s) suite à cette combinaison sont quantifiés à l'aide d'une méthode analytique (chromatographie, comptage radioactif, etc.) spécifique et suffisamment sensible.<sup>392</sup> Une deuxième approche se différencie de l'approche classique par le jumelage de plusieurs incubations chacune effectuée avec un substrat-type au niveau de l'analyse chromatographique. Cette approche cible le développement d'une seule méthode analytique pouvant quantifier différents métabolites de différents substrats en même temps. Finalement, une dernière approche tente de combiner et de maximiser les deux précédentes en optimisant l'utilisation de plusieurs substrats-types dans une incubation simultanée et d'une seule méthode analytique quantifiant tous les analytes formés dans cette même incubation. Cette approche se nomme l'approche cocktail (*n-in-one* ou *cassette incubation*).<sup>392</sup>

L'utilisation d'une approche cocktail confère plusieurs avantages lors d'études métaboliques *in vitro* dont la diminution du temps requis pour obtenir l'information ainsi que l'utilisation d'une moins grande quantité de matrices biologiques, surtout lorsqu'il s'agit de tissus biologiques difficilement disponibles. Malgré son utilité, l'approche cocktail reste peu utilisée; de 2012 à 2013 seulement 21 publications en faisaient l'utilisation (études *in vitro* et *in vivo* confondues).<sup>392</sup> Par ailleurs, les isoenzymes ciblées sont en majorité les CYP3A (89%), CYP1A2 et CYP2C9 à ~80%, CYP2D6 (68%), CYP2C19 (61%) et finalement les CYP2B6, CYP2A6, CYP2C8 et CYP2E1 représentant moins de 50% des approches cocktails.<sup>392</sup> Le développement d'une approche cocktail utilisant des substrats-types sélectifs envers certaines isoenzymes ciblées dans un tissu particulier limite sa réutilisation dans un autre tissu exprimant différentes isoenzymes. Il est donc inévitable et essentiel de revalider un nouveau

cocktail pour un tissu particulier surtout lorsque des études impliquent des tissus extrahépatiques dont les isoenzymes exprimées diffèrent du tissu hépatique autant en catégorie qu'en quantité.<sup>82,87,213</sup>

Il est à noter que la majorité des substrats-types utilisés autant dans les cocktails utilisés *in vitro* qu'*in vivo* sont souvent pris pour acquis quant à leur sélectivité.<sup>392</sup> Par exemple, Yu *et collègues* ont utilisé l'éthoxyrésorufine comme substrat marqueur du CYP1A2.<sup>393</sup> Quelques études ont utilisé ce substrat sous forme de cocktail pour étudier la réaction 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylation (EROD).<sup>394-397</sup> Ce substrat était effectivement listé comme substrat type du CYP1A2 par la FDA en 2006 (<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#inVitro>). Il n'est maintenant plus mentionné par la FDA comme substrat-type du CYP1A2. D'ailleurs nos résultats préliminaires ont démontré que l'éthoxyrésorufine est sélective envers le CYP1A1 et non le CYP1A2 ce qui en fait un choix plus acceptable pour étudier le CYP1A1 (Figure 18). Par ailleurs, cet exemple démontre bien que l'avancement des connaissances ainsi que les recommandations gouvernementales en termes de substrats-types ne sont pas toujours adéquates et une validation complète de nouveaux substrats est essentielle dans le développement de cocktails sélectifs pour les CYP450s.



**Figure 18.** Essai de sélectivité du substrat éthoxyrésorufine dans différentes isoenzymes recombinantes humaines. Les incubations ont été effectuées à 0,5  $\mu$ M d'éthoxyrésorufine.

Certaines recherches ont tenté d'éviter les interactions entre les substrats-types et certaines autres voies métaboliques en diminuant les concentrations de chacun à des niveaux en dessous du  $K_m$  (constante d'affinité permettant d'atteindre 50 % de la vitesse maximale).<sup>392</sup> D'ailleurs, la concentration utilisée pour chacun des substrats est un enjeu majeur dans le développement d'un cocktail autant pour la solubilité du substrat que de sa possible interférence avec d'autres CYP450s présents. La stratégie de diminuer les concentrations de substrats ne coïncide pas avec l'approche d'étude de cinétique enzymatique complète permettant de déterminer la clairance intrinsèque puisque tant la valeur du  $K_m$  que la valeur du  $V_{max}$  sont extrapolées et non mesurées. Notre projet de développement de cocktails était prévu pour étudier le profil enzymatique complet (jusqu'à saturation) de substrats-types envers les principales isoenzymes à ce jour démontrées être exprimées dans le tissu de ventricule de cœurs humains soient le CYP1A1, 2B6, 2E1, 2C8, 2C9, 2D6, 2J2, 3A5 et 4A11.<sup>91</sup> Généralement, les cocktails utilisés ciblent les isoenzymes CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2E1 et 3A. Dans notre contexte extrahépatique il était essentiel de valider un nouveau cocktail de substrats-types des isoenzymes ciblées dans le cœur humain.

### 2.1.2 Statut actuel du manuscrit

En soumission dans *Xenobiotica*.



## 2.2 Manuscrit 1

## Title Page

Title: In vitro selective CYP450 probe drugs oxidation by human heart microsomes.

Running Head: CYP450 drug oxidation in human heart microsomes

Authors Name : Huguet Jade <sup>1,2</sup>, Gaudette Fleur <sup>1</sup>, Michaud Véronique <sup>1,2,3</sup>, Turgeon Jacques <sup>1,2,3</sup>

Affiliations;

1. CRCHUM, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.
2. Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montréal, Qc, Canada.
3. Research Group on Diabetes and Metabolic Regulation, CRCHUM, Montréal, Qc, Canada

Name and addresses of the authors

Jade Huguet; Ph.D. Candidate; Faculty of Pharmacy, Université de Montréal and CRCHUM (Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal), 900 Saint-Denis Street, Montreal (Quebec), Canada, H2X 0A9

Fleur Gaudette; M.Sc., CRCHUM, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900 Saint-Denis Street, Montreal (Quebec), Canada, H2X 0A9  
Véronique Michaud; BPharm., Ph.D., Research Scholar Junior 1 FRQS-INESSS, Assistant professor, Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900 Saint-Denis Street, Montreal (Quebec), Canada, H2X 0A9

Corresponding author details

Jacques Turgeon, BPharm., Ph.D., FCAHS, FFNAM

Chief Scientific Officer

Tabula Rasa Healthcare

110 Marter Avenue, Suite 309

Moorestown, New Jersey, 08057, USA

Key terms:

CYP450, cocktail, probe, metabolism, recombinant, microsomes, LC-MSMS

Manuscript details:

Number of figures: 6 (3 main body, 3 supplement)

Number of tables: 6 (5 main body, 1 supplement)

Number of references: 31

Number of words in the Abstract: 222

Word count: (MAX = 4000, without methods): 5739

Methods: 2071

TOTAL without method:  $5739 - 2094 = 3645$

Discussion (MAX 1500): 1588

**Abstract.**

A cocktail approach towards nine probe drugs namely, ethoxyresorufin (CYP1A1), bupropion (CYP2B6), repaglinide (CYP2C8), tolbutamide (CYP2C9), bufuralol (CYP2D6), chlorzoxazone (CYP2E1), ebastine (CYP2J2), midazolam (CYP3A5) and dodecanoic acid (CYP4A11) was developed and validated to evaluate *in vitro* CYP450 activities expressed in human heart ventricles. The validation was conducted using recombinant human CYP450 isoenzymes (rhCYP450) and by comparing activity measured for each probe drug as a function of 1) buffer used, 2) selectivity towards specific isoenzymes, and 3) drug interactions between probes. Activity was measured by validated LC-MSMS methods. Two cocktails including 7 probes were further validated by a full kinetic profile interaction assay. Finally, the nine probe drugs were tested in human heart microsomes (HHM) from twelve patients with cardiomyopathies. Cocktail #1 including bupropion, chlorzoxazone, ebastine and midazolam fully complied with our validation standards and was used to characterize CYP2B6, 2E1, 2J2 and 3A5-mediated metabolism in human heart. Cocktail #2 which includes bufuralol, ethoxyresorufin and repaglinide failed the validation step as bufuralol and repaglinide showed significant interactions when co-incubated. Substrates in cocktail #2 as well as tolbutamide and dodecanoic acid were tested alone because of their physico-chemical characteristics (solubility, ionization) or interactions with other probes. Activity in HHM was the highest towards ebastine, chlorzoxazone and tolbutamide. A validated cocktail approach could be used to characterize *in vitro* CYP450-mediated metabolism in the human heart.

## **Introduction**

The cytochrome P450 superfamily is involved in the metabolism of xenobiotics and endogenous compounds as well as synthesis of signaling endomolecules.(Guengerich, 2008, Denisov et al., 2005) In human, there are more than 57 genes encoding for more than 18 different protein families (CYP1 to CYP51) for roughly 144 different individual isoenzymes (<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>). Approximately 70% to 80% of marketed drugs are metabolized by few members of CYP1, 2 and 3 families and many of these phase 1 enzymes metabolize more than one drug generating drug-drug interactions.(Zanger and Schwab, 2013, Guengerich, 2008) Since those enzymes are polymorphic and their expression is influenced by environmental factors, variability in drug response is likely to occur.(Preissner et al., 2013)

Distribution of CYP450s in human liver and extrahepatic tissues is highly variable both in terms of isoenzyme combination or level of expression.(Pavek and Dvorak, 2008) Even though the overall clearance and circulating concentration of drugs metabolized by CYP450 are largely driven by the liver and the intestine, CYP450-mediated drug metabolism in extrahepatic tissues can modulate the local intracellular drug concentration, and consequently their local action.(Elbekai and El-Kadi, 2006) CYP450s were found to be expressed in the intestines, lungs, kidneys, brain, and skin as well as in the human heart.(Krishna and Klotz, 1994, Wu et al., 1996) Human heart CYP450 expression is of particular interest as they could interact with substrate drugs distributed within the heart cells and thus modulating their intracellular concentration and action. This hypothesis is based on the accepted theory that the plasma concentration of circulating drug can differ from the local circulating levels and the tissue-specific characteristics (CYP450/transporter) may have significant impact on local drug action (Poulin et al., 2015).

Identification of CYP450s in human heart was firstly made by Zeldin's team in 1996. They observed a high expression of CYP2J2 (SW2-17) in pooled human heart tissues.(Wu et al., 1996) Thereafter, other CYP450 isoenzymes were identified in the human heart: CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 4B1 were first thought to be predominantly expressed in the right ventricle while 2E1 was expressed in all regions of the human heart.(Thum and Borlak, 2000) In 2002, Thum and Borlak showed the

mRNA expression of CYP2J2 in the left ventricle of human heart.(Thum and Borlak, 2002) We recently determined mRNA expression levels of different CYP450 isoenzymes in the largest cohort (n=68) of explanted human heart samples from patients with end-stage heart failure.(Michaud et al., 2010) CYP2J2 was predominantly expressed followed by CYP4A11, 2E1, 1A1 and 2C8. Low levels of CYP2B6 and 2C9 were also detected in some of the hearts.(Michaud et al., 2010) Besides, we showed functional CYP450 activities in microsomes from the left ventricle using the substrate verapamil.(Michaud et al., 2007)

A cocktail of probe drugs could represent a favorable approach to study drug metabolism in cardiac tissues considering the presence of functional and various CYP450s in human heart as well as the low availability of human heart tissue. Several probe drug cocktails have been developed over the years for the study of drug metabolism in the liver. Very few have performed a complete validation strategy to characterize the selectivity of probes, probe-probe interaction and competitiveness for isoenzymes as well as buffer compatibility among isoenzymes.(Fuhr et al., 2007, Spaggiari et al., 2014) Since expression levels of several extra-hepatic CYP450s are less than in the liver, highly sensitive and effective methods are required and must be developed for detection of probes and their associated oxidative metabolites.

The objective of our study was to study CYP450-mediated drug metabolism in microsomes isolated from left ventricular samples of explanted human hearts through a validated, selective and sensitive cocktail approach combining probe drugs for *in vitro* assays.

## Materials and Methods

### *Solutions*

The final concentration of organic solvent in the incubation was set to a maximum of 0.5% to avoid possible solvent inhibitory effects.(Easterbrook et al., 2001) Ebastine, midazolam and chlorzoxazone were prepared in methanol and 2.5  $\mu$ l was added in the incubation (all 3 substrates were prepared in the same methanol solution when used in cocktail #1). Bupropion and bufuralol were dissolved in 0.1 N HCl (10  $\mu$ l was added in the incubation). Tolbutamide was prepared in 0.1N NaOH (10  $\mu$ l added in the incubation). Ethoxyresorufin, repaglinide and dodecanoic acid were solubilized in DMSO (2.5  $\mu$ L per incubations). Ebastine, chlorzoxazone and midazolam were prepared at concentrations of 500  $\mu$ M, 200 mM and 3 mM, respectively. Bupropion, bufuralol, ethoxyresorufin, repaglinide, dodecanoic acid and tolbutamide were prepared at concentrations of 38.75 mM, 2.5 mM, 1 mM, 3.4 mM, 5.0 mM and 62.5 mM, respectively. Serial dilutions were performed to dilute each substrate to cover a range of 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5 times their respective  $K_m$  values; ebastine = 0.5  $\mu$ M, bupropion = 155  $\mu$ M, repaglinide = 3.4  $\mu$ M, bufuralol = 10  $\mu$ M, ethoxyresorufin = 1  $\mu$ M, midazolam = 3  $\mu$ M, tolbutamide = 105  $\mu$ M, chlorzoxazone = 200  $\mu$ M, dodecanoic acid = 5  $\mu$ M (data not shown).

### *rhCYP450 cocktail development assays*

*Buffer Effect Studies.* All substrates were each incubated separately, in triplicate, with rhCYP450 in 4 different buffers: 25mM, 50mM, or 100mM phosphate buffer (pH 7.4) or 100 mM Tris (pH 7.5). The final incubation volume (500  $\mu$ l) contained rhCYP450 (between 2.5 and 6 pmoles CYP450/incubations), NADPH-regenerating system (100  $\mu$ l) and substrate. NADPH-regenerating system contained  $\beta$ -nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (oxidized form  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>; 1.3 mM/incubation), D-glucose 6-phosphate (3.3 mM/incubation) solubilized in a 25 mM MgCl<sub>2</sub> solution freshly added with glucose-6-phosphate dehydrogenase Type VII (0.20 U/incubation). Buffer, substrate and NADPH-regenerating system were pre-incubated at 37°C in a shaking bath

at 300 rpm. Reaction was initiated by the addition of the rhCYP450 and stopped with 1000  $\mu$ l of ice-cold methanol containing the internal standards (IS). Incubations were performed for a duration varying from 0 min to 60 min depending on the experiment (time-, protein quantity or substrate-dependent reaction). The whole incubation mix was centrifuged at 13 000 rpm for 10 minutes after a period of 10 minutes on ice. Supernatant was directly injected into LC-MSMS and the remaining was kept frozen at -20°C.

*Substrate Selectivity Studies.* Individual substrates were incubated with (rhCYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 2J2, 3A5 and 4A11 as per the mentioned protocol above. The same incubation procedure was used except that the pre-incubation period was performed with the rhCYP450, buffer and NADPH-regenerating system and the reaction was initiated by the addition of the substrate.

*Substrates Interactions Studies.* Each substrate was incubated with their respective rhCYP450-targetted isoenzyme in combination with each other substrate. The same incubation conditions were used as the buffer assay experiment stated above.

#### *rhCYP450 activity assays*

*Cocktail #1.* Chlorzoxazone, midazolam, ebastine and bupropion were all incubated alone or together with rhCYP2E1, 3A5, 2J2 and 2B6, respectively. Experiment was performed following the same protocol as for the buffer effect studies. The final incubation volume (500  $\mu$ l) contained rhCYP450 (between 2.5 and 6 pmoles CYP450/incubations), NADPH-regenerating system (100  $\mu$ l) and substrate. Each substrate were dissolved to cover a range of 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5 times their respective  $K_m$  values (refer to solutions for concentrations). Ebastine, midazolam and chlorzoxazone were prepared in methanol and 2.5  $\mu$ l was added in the incubation (all 3 substrates were prepared in the same methanol solution when used in cocktail #1). Bupropion was dissolved in 0.1 N HCl (10  $\mu$ l was added in the incubation). Briefly, pre-incubation was initiated with substrates alone or in combination, buffer and NADPH-regenerating system. Reaction was started by the addition of rhCYP450 and stopped with ice-cold methanol containing the internal standard. Incubation mixtures were



chilled on ice for 10 minutes, centrifuged at 13 000 rpm for 10 minutes and finally, the supernatant was directly injected onto the LC-MSMS.

Cocktail #2. Repaglinide, bufuralol and ethoxyresorufin were all incubated alone or together with rhCYP2C8, 2D6 and 1A1, respectively following the same incubation protocol as for cocktail #1.

#### *HHM isolation and activity assays*

*Heart Tissue Samples.* Explanted human hearts were obtained from the Réseau d'Échange de Tissus et d'Échantillons Biologiques (RETEB), from the Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec. Written consent was signed by patients and the use of human heart tissues was approved in accordance with regulation of the Ethic Review Board of the Montreal Heart Institute. Immediately after explantation, the hearts were immersed in a cold transplantation buffer, rapidly mounted on an extracorporeal circulation and perfused for 10 minutes with the same buffer. Left and right ventricular samples (5-20 g) were prepared from regions mostly above the apex and outside of apparent ischemic scars. These samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Before use, human heart samples were thawed slowly, on ice, to prepare human heart microsomes (HHM).

*Preparation of subcellular microsomal fraction of human heart tissue.* Preparation of human heart microsomes from explanted hearts was performed following the already published isolation method in our laboratory.(Michaud et al., 2010) Briefly, frozen hearts were gently chopped in a 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 150 mM KCl / 1mM EDTA buffer containing the protease inhibitors PMSF (0.01 mM) and DTT (0.5mM). The hearts were then homogenized on ice using a Polytron®. Microsomes were isolated by differential centrifugations and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for future experiments. Incubations with rhCYP450 were performed within a linear range of the metabolite formation for the incubation time and concentration of microsomal proteins or CYP450 content (data not shown).

*Protein quantification in HHM.* Protein quantification was performed with the Pierce® BCA Protein Assay Kit following the standard protocol.

*HHM kinetics assays.* Cocktail #1, 7-ethoxyresorufin, bufuralol, repaglinide, tolbutamide and dodecanoic acid were incubated with twelve different HHM preparations. Frozen microsomes were thawed on ice. Experiment was performed following the same protocol as for the cocktail assay (HHM ~[0.7 mg/ml]).

### ***Quantification of metabolites – LC/MSMS***

*Hydroxyebastine, carebastine and desalkylebastine, 1-hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam, and hydroxybupropion.* Analyses were performed using an isocratic mobile phase with a Thermo Scientific Aquasil C18 column (100 x 2.1 mm I.D., 5 m) operating at 40°C. The mobile phase conditions consisted of acetonitrile and 10 mM ammonium formate in type 1 water pH 3.0 at a ratio of 40:60, respectively. The flow rate was fixed at 0.30 mL/min. Following the incubation period and centrifugation, 10 µL of the supernatant was injected onto the LC-MSMS and the total run time was set at 10.0 min. The mass spectrometer was interfaced with a Shimadzu Prominence series UFLC pump and auto sampler (Kyoto, Japan) using a pneumatic assisted heated electrospray ion source (HESI). MS detection was performed in positive ion mode, using selected reaction monitoring (SRM). The precursor-ion reactions were set at 486 → 167 for hydroxyebastine, 500 → 167 for carebastine, 268 → 167 for desalkylebastine, 342 → 168 for 1-hydroxymidazolam, 342 → 234 for 4-hydroxymidazolam and 256 → 139 for hydroxybupropion. The HESI electrode was set to 3500 V. The capillary temperature was set at 300°C. Argon was used as collision gas at a pressure of 1.5 mTorr.

*Hydroxychlorzoxazone, hydroxytolbutamide, 4'-carboxytolbutamide and 12-hydroxydodecanoic acid.* Analyses were performed using an isocratic mobile phase with a Phenomenex Luna PFP(2) column (150\*3.0 mm, 3 µm) operating at 40°C. The mobile phase conditions consisted of acetonitrile and 0.01% formic acid 40:60, respectively. The flow rate was fixed at 0.30 mL/min. Ten microliters of the supernatant were injected onto the LC-MSMS and the total run time was set at 10.0 min. For detection of 12-hydroxydodecanoic acid, after stopping the incubation with the internal standard in ice-

cold methanol, all the supernatant was transferred into clean 16\*100 mm glass tubes and evaporated to dryness in a water bath set at 40°C under a gentle stream of nitrogen (10 psi). The dried extract was dissolved with 200 µL of methanol and 10 µL was used for analysis. The mass spectrometer was interfaced with a Shimadzu Prominence series UFLC pump and auto sampler (Kyoto, Japan) using a pneumatic assisted heated electrospray ion source (HESI). MS detection was performed in negative ion mode, using selected reaction monitoring (SRM). The precursor-ion reactions were set at 184 → 120 for hydroxychlorzoxazone, 285 → 186 for hydroxytolbutamide, 299 → 200 for 4'-carboxytolbutamide and 215 → 169 for 12-hydroxydodecanoic acid. The HESI electrode was set to 3000 V. The capillary temperature was set at 300°C. Argon was used as collision gas at a pressure of 1.5 mTorr.

*Hydroxybufuralol, 2-despiperidyl-2-amino repaglinide (M1 repaglinide metabolite), 3'-hydroxyrepaglinide (M4 repaglinide metabolite) and resorufin.* Analyses were performed using an isocratic mobile phase with a Phenomenex Luna PFP(2) column (150\*3.0 mm, 3 µm) operating at 40°C. The mobile phase conditions consisted of acetonitrile and 0.01% formic acid 50:50, respectively. The flow rate was fixed at 0.30 mL/min. Ten microliters of the supernatant was injected and the total run time was set at 10.0 min. The mass spectrometer was interfaced with a Shimadzu Prominence series UFLC pump and auto sampler (Kyoto, Japan) using a pneumatic assisted heated electrospray ion source (HESI). MS detection was performed in positive ion mode, using selected reaction monitoring (SRM). The precursor-ion reactions were set at 278 → 186 for hydroxybufuralol, 385 → 106 for M1, 469 → 246 for 3'-hydroxyrepaglinide and 214 → 103 resorufin. The HESI electrode was set to 3500 V. The capillary temperature was set at 300°C. Argon was used as collision gas at a pressure of 1.5 mTorr.

#### *Data and Statistical Analysis.*

All data were plotted, fitted and statistically analyzed with GraphPad Prism5 (La Jolla, CA).

All assays for each concentrations were performed in triplicate. Velocity was corrected by the incubation time and the quantity of rhCYP450 (in picomoles) or proteins of HHM

(in mg). All data points are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Km and Vmax were calculated by fitting data with the ‘best-fit’ nonlinear regression models (Michaelis-Menten, substrate inhibition or allosteric sigmoidal). Statistical comparison was executed using the extra-sum-of-squares (F test) with a p-value set at 0.05. Comparison between two assays was performed with a Student-t test and between multiple assays with a one way ANOVA followed by a *post-hoc* Dunnet test. Comparison between the two datasets (solo versus cocktail) was performed to establish the cocktail influence on the kinetics curve of the substrate studied. The comparison method used was the extra sum-of-squares F test with a p-value set at 0.05. A p-value  $<0.05$  was considered statistically significant to notice a difference between the two datasets. Intrinsic clearance was calculated by the equation:  $CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$ . A 95 % confidence interval (CI) was calculated for the intrinsic clearance using the confidence interval equation for a ratio of two means.(Motulsky, 1998) In our analysis, the ratio of the two means (Q) was the quotient of Vmax/Km (CLint). Standard deviations for Km and Vmax obtained from the best-fit model were used to calculate standard deviation of the quotient Q following this equation:  $SD_Q = Q \sqrt{\frac{SD_A^2}{A^2} + \frac{SD_B^2}{B^2}}$ , where A=Vmax, B=Km and Q=A/B.  $SD_A$  and  $SD_B$  are expressed in same units as A and B, respectively. Then 95%CI was calculated following the equation: 95%CI: from  $Q - t^* * SE_Q$  to  $Q + t^* * SE_Q$ , where  $t^*$  represents the 2-tailed t-distribution number for a level of significance of 0.05 as per a degree of freedom equals to the number of data points minus one. Overlapping of the 95%CI obtained from solo versus cocktail datasets was used as a tool to establish a tendency of possible interaction. Absence of overlap for the 95%CI between two datasets was referred to ‘a tendency to be different’.

### **Reagents**

Ebastine, hydroxyebastine, hydroxyebastine-d<sub>5</sub>, carebastine, carebastine-d<sub>5</sub>, desalkylebastine, desalkylebastine-d<sub>5</sub>, bupropion, hydroxybupropion, hydroxybupropion-d<sub>6</sub>, 6-hydroxychlorozoxazone, 4-hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam-d<sub>5</sub> methanoate, bufuralol, hydroxybufuralol, 1-hydroxybufuralol-d<sub>9</sub>, repaglinide, 2-despiperidyl-2-amino repaglinide (M1), 3'-hydroxyrepaglinide (M4), 7'-ethoxyresorufin, hydroxytolbutamide, 4-carboxytolbutamide, hydroxytolbutamide-d<sub>9</sub>, 4-

carboxytolbutamide-d<sub>9</sub> were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). 6-hydroxychlorozoxazone-d<sub>2</sub>-<sup>15</sup>N was purchased from TLC Pharmachem (Vaughan, Ontario, Canada). 1-hydroxymidazolam and 1-hydroxymidazolam-d<sub>4</sub> were purchased from Cerilliant (Texas, USA). Chlorzoxazone, tolbutamide, resorufin sodium salt, resorufin-d<sub>6</sub>, 12-hydroxylauric acid, 10-hydroxydodecanoic acid, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium phosphate dibasic anhydrous (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), trishydroxymethylaminomethane (TRIS), potassium chloride (KCl) and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), acetonitrile and methanol were purchased from Fisher Scientific (Toronto, On). Magnesium chloride was purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was purchased from Bioshop (Burlington, On). Dithiothreitol (DTT) was purchased from Gibco®, Life Technologies Ltd. (Eugene, OR). Recombinant human (cDNA-expressed) CYP1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5, 4A11 Supersomes™ (rhCYP450) and anti-human CYP2E1 antibodies (Abs) for immunoinhibition studies were purchased from Corning® (Tewksbury, MA).

## Results

### *rhCYP450 cocktail validation*

Those assays mentioned below validated the combination of cocktail #1 by grouping bupropion, chlorzoxazone, ebastine and midazolam, and cocktail #2 by grouping bufuralol, ethoxyresorufin and repaglinide.

*Decision process for the construction of substrate cocktails.* Probe drugs to be included into each cocktail were selected based on CYP450 mRNAs CYP2J2, CYP4A11, CYP2E1, CYP1A1, CYP2C8, CYP2B6 and CYP2C9 known to be expressed in human heart human ventricles (Michaud *et al*). CYP3A5 was also added since mRNAs were reported to be observed in some human hearts samples (data not shown). Cocktails were created by grouping probe drugs together considering the most suitable LC-MSMS chromatographic conditions and ionisation mode (negative or positive). Validation was also performed to assure buffer compatibility among substrates by estimating the highest CYP450-mediated velocity, selectivity toward one isoenzyme and the lack of interaction between substrates.

*Probe drugs selectivity.* Bupropion, bufuralol, ebastine, ethoxyresorufin, dodecanoic acid, midazolam, repaglinide and tolbutamide were hydroxylated with high and exclusive affinity by their targeted CYP2B6, CYP2D6, CYP2J2, CYP1A1, CYP4A11, CYP3A5, CYP2C8 and CYP2C9 isoenzyme ( $p < 0.05$  compared to all other rhCYP450, Table 1 and Supplementary Figure 1).

*Buffer effect on rhCYP450-mediated substrates oxidation.* Maximum activity was observed with the 100 mM phosphate buffer for bupropion with rhCYP2B6, chlorzoxazone with rhCYP2E1, ethoxyresorufin with rhCYP1A1 and midazolam with rhCYP3A5 (Table 2). In contrast, repaglinide metabolism decreased with increasing concentrations of phosphate buffer. On the other hand, rhCYP2J2-mediated ebastine hydroxylation was similar in all buffers. Enzyme activity was greatest towards bufuralol, tolbutamide and dodecanoic acid when incubations were performed with TRIS buffer (rhCYP2D6, rhCYP2C9 and rhCYP4A11, respectively).

*Between Substrates Interactions.* Interactions between probe drugs were studied by co-incubating each substrate with each other at one concentration (respective  $K_m$  values for their own more active isoenzyme). Table 3 lists the substantial interactions observed between substrates tested (>25%). Chlorzoxazone hydroxylation through CYP2E1 was decreased by more than 60% when incubated with substrates dissolved in DMSO (ethoxyresorufin, repaglinide and dodecanoic acid). Bufuralol, ethoxyresorufin and repaglinide-mediated hydroxylation was decrease by 40% when co-incubated with ebastine. When bupropion was co-incubated with bufuralol or ethoxyresorufin, their respective hydroxylation decreased by more than 30%.

*Tolbutamide and dodecanoic acid activity with rhCYP450.* Metabolism of tolbutamide and dodecanoic acid was the greatest in the presence of 100 mM TRIS (pH 7.5) buffer which led us to exclude these substrates from cocktail #1 or #2 (Table 2). On the other hand, dodecanoic acid inhibited the metabolism of many substrates including tolbutamide and bupropion (Table 3). Consequently, dodecanoic acid and tolbutamide were studied separately and apart from cocktails #1 and 2. Kinetic analysis performed with rhCYP2C9 and rhCYP4A11 with tolbutamide and dodecanoic acid, respectively are presented in Supplemental Figures 2A and B.

#### *rhCYP450 kinetics activity*

*Cocktail #1.* Bupropion, chlorzoxazone and ebastine hydroxylation kinetics with rhCYP2B6, 2E1 and 2J2, respectively, were not changed when incubated alone compared to as in cocktail #1 (Figures 1A to D, Table 4). Ebastine hydroxylation with rhCYP2J2 best fitted an allosteric sigmoidal kinetic model when incubated alone or as in cocktail #1 (Figure 1C). Ebastine N-dealkylation was not observed in the presence of rhCYP2J2 but was detected when incubations were performed with rhCYP3A5: N-dealkylated ebastine metabolite formation followed a substrate inhibition kinetic model (Figure 1D). Midazolam 1-hydroxylation kinetics with rhCYP3A5 was influenced by other substrates in cocktail #1 with 1.75- and 2-time increases in its apparent  $K_m$  and  $V_{max}$ , respectively (Figure 1E, Table 4). In contrast, midazolam 4-hydroxylation was decreased when exposed to cocktail #1 with a 2.64- and 4.21-times reductions in  $K_m$

and  $V_{max}$ , respectively (Figure 1F, Table 4). The overall  $CL_{int}$  for rhCYP3A50-mediated midazolam 1-hydroxylation did not differ more than 10% between its solo and cocktail#1 assays.

*Cocktail #2.* Bufuralol 1-hydroxylation maximal velocity was decreased 2.3-times compared to a 3.6-times decrease in its apparent  $K_m$  when incubated with cocktail #2 vs. alone (Table 5, Figure 2A). Bufuralol 1-hydroxylation  $CL_{int}$  was increased 1.7-time when exposed to cocktail #2 (Table 5). Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity with rhCYP1A1 was unchanged by the presence of other substrates in cocktail #2 (Figure 2B). Repaglinide hydroxylation on the piperidine ring through rhCYP2C8 when incubated as in cocktail #2 fitted substrate inhibition model (Figure 2C, Table 5). Ratios of kinetic parameters derived from a substrate inhibition model from incubations with either cocktail #2 or alone were close to unity for  $K_m$  ( $K_{m_{cocktail\#2}}/K_{m_{solo}} = 0.9$ ,  $p > 0.05$ ) and  $V_{max}$  ( $V_{max_{cocktail\#2}}/V_{max_{solo}} = 1.06$ ,  $p > 0.05$ ). Repaglinide maximal velocity of its M1 metabolite formation with rhCYP2C8 was increased 4.56-times when incubations were performed with cocktail #2 while its apparent  $K_m$  was decreased by 2.82-times ( $p < 0.05$ , Figure 2D and Table 5). Repaglinide clearance through M1-formation pathway represents 2% of the hydroxylated-pathway when incubated alone with rhCYP2C8 and remains at 2% when co-incubated in cocktail #2.

*Between substrates interaction of cocktail #2 substrates.* Kinetics changes among bufuralol and repaglinide metabolism were further explored (Supplemental Figure 1 and Supplemental Table 1). Co-incubation of repaglinide or ethoxyresorufin with bufuralol decreased the maximal velocity ( $V_{max}$ ) of bufuralol hydroxylation with rhCYP2D6\*1 by 2.29- and 3.37-times, respectively compared to the substrate incubated alone. Inversely, its apparent  $K_m$  decreased by 2.47- and 5.2-times resulting in a similar overall capacity of the enzymes pool ( $CL_{int+ethoxyresorufin} = 3.7$ ,  $CL_{int+repaglinide} = 2.6$  versus  $CL_{int_{solo}} = 2.4$   $\mu l / min / pmol$  of rhCYP450) (Supplemental Figure 1A, Supplemental Table 1).

$V_{max}$  of repaglinide hydroxylation, on the piperidine ring, with rhCYP2C8 was increased by 1.63-times when co-incubated with bufuralol compared to a decrease of



2.3-times when co-incubated with ethoxyresorufin. The apparent  $K_m$  followed similar trends resulting in no change in intrinsic clearances (Supplemental Figure 1B, Supplemental Table 1).

HHM-mediated oxidation toward 9 selective CYP450 probe drugs.

Demographics of each patient used for heart tissue extraction is presented in Table 6 (samples 1 to 12). Substrates in cocktail #1 (chlorzoxazone, ebastine, bupropion and midazolam), repaglinide, bufuralol, ethoxyresorufin and dodecanoic acid were incubated in microsomes prepared from 12 different explanted human heart ventricles (Figure 3). Tolbutamide was only incubated in 3 (samples #3, 5 and 6) out of the 12 HHM samples (Figure 3A). Blanks with no NADPH-regenerating system, establishing if enzymatic sources other than CYP450s were responsible for the metabolism observed, or with no microsomes, establishing if the substrate powder contributed to the metabolite signal or if chemical degradation occurred, were performed. Figure 3 presents the residual velocities. Chlorzoxazone hydroxylation was observed in each heart and was the highest with a mean formation of  $\sim 4$  pmoles of hydroxychlorzoxazone/min/mg protein (Figure 3A). The activity measured for hydroxyebastine formation represented  $\sim 55\%$  (2.2 pmoles of hydroxyebastine/min/mg of proteins) of the activity determined for chlorzoxazone and was observed in the twelve hearts tested (Figure 3A). Bupropion hydroxylation was observed in 3 different samples of the twelve hearts tested and represented  $\sim 0.6\%$  (0.025 pmoles of hydroxybupropion/min/mg of proteins) of chlorzoxazone activity (Figure 3A). Midazolam 4-hydroxylation was observed in 1 heart sample with less than 0.1% of chlorzoxazone activity (0.007 pmoles of 4-hydroxymidazolam/min/mg of protein). Tolbutamide hydroxylation resulted in a velocity of  $\sim 0.015$  pmoles of hydroxytolbutamide/min/mg protein (Figure 3A). Dodecanoic acid incubated in the 12 hearts did not show any activity. Ethoxyresorufin was incubated in 2 samples of HHM and no EROD activity was observed. Repaglinide hydroxylation on the piperidine ring did not show any activity while the M1-hydroxylation pathway showed activity ( $\sim 0.004$  pmoles M1/min\*mg of proteins) for 2 heart samples (Figure 3B). Bufuralol hydroxylation was observed in HHM of 11 samples where the signal was below the limit of quantitation (LOQ) but higher than the

blanks (Figure 3B). A chromatogram of the blanks, the LOQ as well as the signal observed in one sample of HHM are presented in Supplemental Figure 3A to C.

*Concentration-dependent metabolism of ebastine and chlorzoxazone with HHM subcellular fraction*

Comparison of chlorzoxazone and ebastine metabolism incubated as in cocktail#1 vs alone, at 400  $\mu\text{M}$  and 1.5  $\mu\text{M}$  respectively (2 times their respective  $K_m$ ) with HHM from two different samples of men patients (samples #13 and #1, respectively), are depicted in Figures 4A and 4B). Hydroxylation of chlorzoxazone and ebastine, incubated at a range of 0.15 and 8-times their  $K_m$  performed in one human heart sample (sample #1) is presented in Figures 5A and 5B.  $K_m$  and  $V_{max}$  values following ebastine hydroxylation was  $0.05 \pm 0.01 \mu\text{M}$  and  $0.32 \pm 0.01 \text{ pmol/min/mg}$  of proteins, respectively. Acute inhibition assays with astemizole (added at the same time of the substrate ebastine) or with 4-methylpyrazole or anti Human CYP2E1 antibodies (both pre-incubated 10 minutes prior to the addition of chlorzoxazone) were each performed, separately in the same explanted heart (#14) of one men patient diagnosed with idiopathic cardiomyopathy (Figures 6A and 6B ). Hydroxyebastine formation was inhibited when ebastine was co-incubated with astemizole ( $p < 0.05$ , unpaired t-test) while chlorzoxazone metabolism was not inhibited when co-incubated with 4-methylpyrazole or anti Human CYP2E1.

## Discussion

The aim of this study was to explore the HLM oxidation activity toward 9 probe drug substrates validated to be selective toward specific CYP450 known to be expressed in the human heart. Based on our previous findings and the screening of CYP450 mRNAs in the human heart ventricle, we sought the development and validation of selective cocktails towards CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 2J2, 3A5, and 4A11. A first selective cocktail containing bupropion, chlorzoxazone, ebastine and midazolam was developed allowing to measure CYP2B6, 2E1, 2J2 and 3A5 activities. A second cocktail intended to include 7-ethoxyresorufin (1A), bufuralol (2D6) and repaglinide (2C8) was developed but failed the validation step because of probe-probe interactions. Overall, three different analytical methods were developed for the analysis of 14 different metabolites formed through the hydroxylation of 9 different substrates. Quantifiable activity was detected for ebastine and chlorzoxazone only, for which a complete enzyme kinetics profile was further demonstrated immediately after having validated the absence of important interactions between substrates of cocktail #1 on the HLM-hydroxylation ability for ebastine and chlorzoxazone.

Development of a probe drug cocktail requires logical steps of validation to avoid probe-probe interactions and to maximize incubation conditions. Substrate selectivity towards targeted CYP450 isoenzymes was reestablished and we confirmed that ethoxyresorufin, bupropion, repaglinide, tolbutamide bufuralol, ebastine, midazolam and dodecanoic acid are truly selective (>90%) towards CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2J2, 3A5 and 4A11, respectively CYP2J2 and CYP4A11 probe drugs are not largely expressed in human liver (REF). However, these isoenzymes are of great interest for studies with human heart microsomes as they are highly expressed in this tissue (REF VERO). Ebastine was proposed as a probe drug for the study of CYP2J2 metabolism and our study supports its use as a probe for experiments performed in human hearts. (Hashizume et al., 2002, Lee et al., 2010) Dodecanoic acid was previously suggested as a probe for CYP4A11 in other extrahepatic tissues (Johnston et al., 2011) and yet we demonstrated its selectivity towards CYP4A11.

Protein-protein interactions are influenced by the choice of buffer in *in vitro* CYP450 enzyme kinetics assays (Engtrakul et al., 2005). We therefore identified the most

suitable phosphate buffer to reach the highest yield for each kinetics reactions for all substrates used and then transferred with the optimal buffer in HHM system for kinetics assays. Limitation to our study is the lack of buffer effect assessment directly in HHM system. It is known that the ionic and pH influence the CYP450 enzyme metabolism.(Kudo et al., 2016) Therefore, the optimal buffer in the rhCYP450 system could be different than in HHM. To standardize the buffer effect we used the same buffer for both enzyme systems. Moreover, as the volume ratio of buffer over the enzyme system strongly decrease in HHM incubation. It was unlikely that a higher buffer-protein interaction would have occurred and influenced HHM kinetic ability since the volume ratio was at its highest in the rhCYP450 assays. Overall, the buffer choices in HHM was functional and standardized with rhCYP450 system.

Finally, we have demonstrate the utility and ability of using cocktail #1 as a tool for studying multiple CYP450 pathways within the same through a complete validation with the rhCYP450 system using optimal conditions to maximize kinetics. Several molecular interaction processes could come into play when more than one substrate are incubated at the same time (Segel, 1993). When developing our probe drug cocktails different type of inhibition and activation phenomena were observed and inferred based on the change of the apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  parameters. Uncompetitive inhibition (decrease in both  $K_m$  and  $V_{max}$ ), ping-pong mechanisms (increase in both  $K_m$  and  $V_{max}$ ), substrate inhibition (decrease in  $V_{max}$  at high substrate concentrations) and allosteric kinetics (sigmoidal kinetic curve) were all observed kinetic behaviors when multi-substrates conditions were assayed. Complete  $K_i$  assays were not performed to conclude without a doubt on the inhibition phenomena observed in those assays. Still, the phenomena between some substrates restrain their utility to be used as cocktail combination based on the observed fluctuation on their apparent  $K_m$  and  $V_{max}$ .

The combination of probe drugs was first established based on the absence of interactions between each substrates within a potential cocktail. The lack of interactions between bupropion, chlorzoxazone and ebastine validated their use, for the first time, within a cocktail (cocktail #1) of probe drugs selective towards CYP2B6, 2J2 and 2E1, respectively. On the other hand, activation of CYP3A5 mediated midazolam 1-hydroxylation and uncompetitive inhibition of the 4-hydroxylation pathway occurred

when midazolam was co-incubated with other substrates constituting cocktail #1. The metabolic  $CL_{int}$  did not change as both parameter  $K_m$  and  $V_{max}$  changed proportionally in the same direction permitting to maintain midazolam within cocktail #1.

Development of cocktail #2 resulted in a problematic combination of 7-ethoxyresorufin, bufuralol and repaglinide because of kinetic changes occurring for bufuralol and repaglinide hydroxylation when used concomitantly. Bufuralol metabolism in rhCYP2D6 showed a decrease in the apparent  $K_m$  accompanied by a decrease in  $V_{max}$  without major changes on  $CL_{int}$  when co-incubated with 7-ethoxyresorufin or repaglinide or both. Uncompetitive inhibition, a rarely observed phenomenon, is a reversible-type inhibition occurring when the inhibitor and the substrate both can bind to the enzyme concurrently in a multisubstrate system. Theoretically, the decreasing the enzyme-substrate pool and increasing the free enzyme pool allowing an increase in the apparent  $K_m$  (Cornish-Bowden, 1974, Cornish-Bowden, 1986, Whiteley, 2000, Yoshino and Murakami, 2009, Segel, 1993).. Our results clearly demonstrate the heterogenic activation and uncompetitive inhibition occurring between repaglinide, ethoxyresorufin and bufuralol limiting them to be used concomitantly in a cocktail.

We therefore translate our validation to use cocktail #1 from the rhCYP450 to the HHM systems. This validation was confirmed by testing the effect of cocktail #1 on the velocity of the ebastine and chlorzoxazone hydroxylation with HHM showing no to little effect. Yet, we assessed the metabolism of all these substrates in human heart microsomes. We saw a significant metabolism in human heart microsomes mostly for ebastine, chlorzoxazone and tolbutamide while the activity towards bufuralol, bupropion, midazolam and repaglinide was hardly quantifiable.. However, HHM system did not show any activity when incubated with dodecanoic acid which was surprising as it was identified as the fourth most expressed mRNA enzyme.(Michaud et al., 2010)

In vitro metabolism is poorly understood with HHM system. Evidence of stereoselective metabolism with HHM was first demonstrated through the CYP450-mediated formation of nine metabolites from both enantiomers of verapamil.(Michaud et al., 2010) Participation of CYP450 isoenzymes in selective probe drugs toward CYP450 already identified through mRNA and protein assays is of interest to establish local metabolic

capacity within the heart cells. Ebastine (>95 %) and chlorzoxazone (>80 %) metabolism with HHM was greatly variable between patients. Our results are in agreement with mRNA expression being the highest for CYP2J2 closely followed by CYP2E1.(Michaud et al., 2010) Moreover, CYP2J2 protein was also found to be highly expressed in human heart ( $0.17 \pm 0.05$  pmol/mg).(DeLozier et al., 2007) Ebastine hydroxylation with HHM, incubated within cocktail#1 was saturable at high concentrations with an apparent  $K_m$  ( $0.054 \pm 0.01$   $\mu$ M) comparable to the one obtained in rhCYP2J2 ( $0.53 \pm 0.04$   $\mu$ M). Overall, the catalytic activity by the HHM system toward ebastine and chlorzoxazone is NADPH-dependent. .

Chemical and immunoinhibition with rhCYP450 were performed but not shown in this study to counter-validate selectivity across targeted CYP450. Still, chemical inhibition in the HHM system on the hydrolysis of ebastine and chlorzoxazone performed were inconclusive toward CYP2E1-mediated metabolism of chlorzoxazone with HHM. However using the selective CYP2J2 competitive substrate astemizole (Matsumoto et al., 2002), ebastine hydrolysis was strongly suggested to be mediated through CYP2J2 isoenzyme with its metabolism inhibited by more than 70%. Further IC<sub>50</sub> assays with other chemical inhibitors and antibodies assays with more HHM samples are ongoing to confirm the CYP450-mediated source of ebastine and chlorzoxazone metabolism with the HHM system. It is the first time, to our knowledge, that enzymatic assays with CYP450 probe drugs were tested in HHM and a complete metabolic profile was shown for the highly-selective CYP2J2 substrate ebastine.

Extrahepatic CYP450-mediated metabolism is still an innovative era in metabolism which could become of great relevance. According to this concept, concentration of some drugs in extrahepatic organs can be regulated by CYP450 activities within specific tissue cells defining the organ intrinsic clearance.(Krishna and Klotz, 1994, Thelen and Dressman, 2009) Hence, local metabolism is suggested to have a role in drug-associated tissue-specific action or toxicities. For instance, our studies suggest that cardiac metabolism could modulate toxicity of drugs such as the block of hERG potassium channel (intracellular binding) leading to drug-induced Long QT syndrome.(Moss and Morganroth, 1999) Interestingly, many drugs causing this toxicity are metabolized by CYP3A4 but also by CYP2J2, the most abundant expressed CYP450 isoenzyme in the

human heart.(Michaud et al., 2010, Liu et al., 2006, Matsumoto and Yamazoe, 2001)  
Our hypothesis contrasts with the classic pharmacokinetic theory where the systemic drug concentration, usually used to establish evidence of a drug-drug interaction, is driven by CYP450 hepatic metabolism.

Our study fully validates probes of cocktail #1 selective toward CYP2B6, 2E1, 2J2, and 3A5 to be used in other tissues and other species to study tissue-selective metabolism. We established the ability and utility of using cocktail #1 in the HHM system to identify targeted-CYP450 hydroxylation reactions through the metabolism of selective substrates. The human heart is endowed with metabolic activity for at least six different CYP450s: CYP2J2, 2E1, 2B6, 3A5, 2C8 and 2C9. Further studies are needed to establish the importance of human heart CYP450-targeted metabolism and tissue drug concentrations associated toxicities.

## **Acknowledgement**

### **Declaration of Interest**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (#MOP-258587) and internal funding obtained from the Fondation du CHUM. Jade Huguet was subsequently the recipient of a studentship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Fonds de Recherche Santé Québec (FRSQ). Veronique 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).

Conflict of Interest: Authors Name : Huguet J, Gaudette F, Michaud V, Turgeon J declare that they have no conflict of interest.

### **Authorship Contribution Statement**

*Participated in research design:* Huguet, Michaud, Turgeon

*Conducted experiments:* Huguet, Gaudette

*Contributed new reagents or analytic tools:* Huguet, Gaudette

*Performed data analysis:* Huguet, Gaudette, Michaud, Turgeon

*Wrote or contributed to the writing of the manuscript:* Huguet, Gaudette, Michaud, Turgeon



## References

- CORNISH-BOWDEN, A. 1974. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors (Short Communication). *Biochemical Journal*, 137, 143-144.
- CORNISH-BOWDEN, A. 1986. Why is uncompetitive inhibition so rare?: A possible explanation, with implications for the design of drugs and pesticides. *FEBS Letters*, 203, 3-6.
- DELOZIER, T. C., KISSLING, G. E., COULTER, S. J., DAI, D., FOLEY, J. F., BRADBURY, J. A., MURPHY, E., STEENBERGEN, C., ZELDIN, D. C. & GOLDSTEIN, J. A. 2007. Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. *Drug Metabolism and Disposition*, 35, 682-688.
- DENISOV, I. G., MAKRIS, T. M., SLIGAR, S. G. & SCHLICHTING, I. 2005. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev*, 105, 2253-77.
- EASTERBROOK, J., LU, C., SAKAI, Y. & LI, A. P. 2001. Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 Isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 141-144.
- ELBEKAI, R. H. & EL-KADI, A. O. 2006. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther*, 112, 564-87.
- ENGTRAKUL, J. J., FOTI, R. S., STRELEVITZ, T. J. & FISHER, M. B. 2005. ALTERED AZT (3'-AZIDO-3'-DEOXYTHYMIDINE) GLUCURONIDATION KINETICS IN LIVER MICROSOMES AS AN EXPLANATION FOR UNDERPREDICTION OF IN VIVO CLEARANCE: COMPARISON TO HEPATOCYTES AND EFFECT OF INCUBATION ENVIRONMENT. *Drug Metabolism and Disposition*, 33, 1621-1627.
- FUHR, U., JETTER, A. & KIRCHHEINER, J. 2007. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the "cocktail" approach. *Clin Pharmacol Ther*, 81, 270-83.
- GUENGERICH, F. P. 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 21, 70-83.
- HASHIZUME, T., IMAOKA, S., MISE, M., TERAUCHI, Y., FUJII, T., MIYAZAKI, H., KAMATAKI, T. & FUNAE, Y. 2002. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the Metabolism of Ebastine in Human Intestinal Microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300, 298-304.
- JOHNSTON, J. B., OUELLET, H., PODUST, L. M. & ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. 2011. Structural control of cytochrome P450-catalyzed  $\omega$ -hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 507, 86-94.

- KRISHNA, D. & KLOTZ, U. 1994. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. *Clinical Pharmacokinetics*, 26, 144-160.
- KUDO, T., OZAKI, Y., KUSANO, T., HOTTA, E., OYA, Y., KOMATSU, S., GODA, H. & ITO, K. 2016. Effect of buffer conditions on CYP2C8-mediated paclitaxel 6 $\alpha$ -hydroxylation and CYP3A4-mediated triazolam  $\alpha$ - and 4-hydroxylation by human liver microsomes. *Xenobiotica*, 46, 241-246.
- LEE, C. A., NEUL, D., CLOUSER-ROCHE, A., DALVIE, D., WESTER, M. R., JIANG, Y., JONES, J. P., FREIWALD, S., ZIENTEK, M. & TOTAH, R. A. 2010. Identification of Novel Substrates for Human Cytochrome P450 2J2. *Drug Metabolism and Disposition*, 38, 347-356.
- LIU, K.-H., KIM, M.-G., LEE, D.-J., YOON, Y.-J., KIM, M.-J., SHON, J.-H., CHOI, C. S., CHOI, Y. K., DESTA, Z. & SHIN, J.-G. 2006. Characterization of Ebastine, Hydroxyebastine, and Carebastine Metabolism by Human Liver Microsomes and Expressed Cytochrome P450 Enzymes: Major Roles for CYP2J2 and CYP3A. *Drug Metabolism and Disposition*, 34, 1793-1797.
- MATSUMOTO, S., HIRAMA, T., MATSUBARA, T., NAGATA, K. & YAMAZOE, Y. 2002. Involvement of CYP2J2 on the Intestinal First-Pass Metabolism of Antihistamine Drug, Astemizole. *Drug Metabolism and Disposition*, 30, 1240-1245.
- MATSUMOTO, S. & YAMAZOE, Y. 2001. Involvement of multiple human cytochromes P450 in the liver microsomal metabolism of astemizole and a comparison with terfenadine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51, 133-142.
- MICHAUD, V., FRAPPIER, M., DUMAS, M.-C. & TURGEON, J. 2010. Metabolic Activity and mRNA Levels of Human Cardiac CYP450s Involved in Drug Metabolism. *PLoS ONE*, 5, e15666.
- MICHAUD, V., SIMARD, C. & TURGEON, J. 2007. An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to in vitro drug metabolism studies. *Journal of Chromatography B*, 852, 611-616.
- MOSS, A. J. & MORGANROTH, J. 1999. Cardiac effects of ebastine and other antihistamines in humans. *Drug Saf*, 21 Suppl 1, 69-80; discussion 81-7.
- MOTULSKY, H. 1998. *Intuitive Biostatistics*. , New York, 1995. No. of pages: xxi+386. Price: \$26. ISBN 0-1950-8607-4, Oxford University Press, USA
- PAVEK, P. & DVORAK, Z. 2008. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab*, 9, 129-43.

- POULIN, P., BURCZYNSKI, F. J. & HADDAD, S. 2015. The Role of Extracellular Binding Proteins in the Cellular Uptake of Drugs: Impact on Quantitative In Vitro-to-In Vivo Extrapolations of Toxicity and Efficacy in Physiologically Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Research. *J Pharm Sci*.
- PREISSNER, S. C., HOFFMANN, M. F., PREISSNER, R., DUNKEL, M., GEWIESS, A. & PREISSNER, S. 2013. Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy. *PLoS One*, 8, e82562.
- SEGEL, I. H. 1993. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley Classics Library.
- SPAGGIARI, D., GEISER, L., DAALI, Y. & RUDAZ, S. 2014. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: An overview of current methodologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 221-237.
- THELEN, K. & DRESSMAN, J. B. 2009. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol*, 61, 541-58.
- THUM, T. & BORLAK, J. 2000. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet*, 355, 979-83.
- THUM, T. & BORLAK, J. 2002. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *Faseb j*, 16, 1537-49.
- WHITELEY, C. G. 2000. Enzyme kinetics: partial and complete uncompetitive inhibition. *Biochemical Education*, 28, 144-147.
- WU, S., MOOMAW, C. R., TOMER, K. B., FALCK, J. R. & ZELDIN, D. C. 1996. Molecular Cloning and Expression of CYP2J2, a Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Highly Expressed in Heart. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 3460-3468.
- YOSHINO, M. & MURAKAMI, K. 2009. A graphical method for determining inhibition constants. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24, 1288-1290.
- ZANGER, U. M. & SCHWAB, M. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 138, 103-41.

## Figure Legends

### **Figure 1. Kinetics of bupropion, chlorzoxazone, ebastine and midazolam incubated alone or as cocktail #1 with rhCYP2B6, 2E1, 2J2 and 3A5, respectively.**

Enzyme kinetics of (A) bupropion (B) chlorzoxazone (C-D) ebastine (E-F) midazolam incubated alone or within cocktail #1 (midazolam, chlorzoxazone, bupropion and ebastine) with rhCYP450s. Empty circles (○): substrate incubated alone, filled circles (●): substrate incubated with cocktail #1. Dashed line represents the 95% CI.

### **Figure 2. Kinetics of ethoxyresorufin, bufuralol and repaglinide incubated alone or as cocktail #1 with rhCYP1A1, 2D6 and 2C8, respectively.**

Enzyme kinetics of (A) bufuralol (B) ethoxyresorufin (C) and repaglinide incubated alone or within cocktail #2 (bufuralol, ethoxyresorufin and repaglinide) with rhCYP450s. Empty circles (○): substrate incubated alone, filled circles (●): substrate incubated with cocktail #2. Dashed line represents the 95% CI.

### **Figure 3. Substrates in cocktail #1 (chlorzoxazone, ebastine, bupropion and midazolam), repaglinide, bufuralol and dodecanoic acid were incubated in microsomes prepared from 12 different explanted human heart ventricles**

Formation of specific major metabolites of midazolam, bupropion, chlorzoxazone, ebastine and tolbutamide (A) or bufuralol and repaglinide (B) produced in human left ventricle heart microsomes from twelve subjects (incubations were realised at concentrations where the reaction rate is half the  $V_{max}$  in their respective recombinant enzyme rhCYP450 ( $K_m$ ) although otherwise indicated).

### **Figure 4. Substrates ebastine and chlorzoxazone incubated alone or within cocktail #1 in HHM**

Formation of specific major metabolites of ebastine (A) and chlorzoxazone (B) produced in human left ventricle heart microsomes from one subject.

**Figure 5. Kinetics of ebastine and chlorzoxazone incubated within cocktail #1 in HHM**

Enzyme kinetics of (A) ebastine and (B) bufuralol incubated alone or within cocktail #1 with HHM.

**Figure 6. Inhibition assays in HHM**

Inhibition assays with astemizole (added at the same time of the substrate ebastine) (6A) or with 4-methylpyrazole or anti Human CYP2E1 antibodies (both pre-incubated 10 minutes prior to the addition of chlorzoxazone) (6B) performed in the same explanted heart (#14) of one patient (n=1) for each assay.

## Tables.

**Table 1. *In vitro* drug metabolism in different rhCYP450 systems.**

Drugs [concentration]	Quantified metabolites	rhCYP1A1	rhCYP2B6	rhCYP2C8	rhCYP2C9	rhCYP2D6	rhCYP2E1	rhCYP2J2	rhCYP3A5
Bupropion [465 µM]	6-hydroxybupropion	<0.5%	12.84±0.12*	0.45±0.006	0	<0.5%	<0.5%	<0.5%	<0.5%
Bufuralol [100 µM]	1-hydroxybufuralol	0.24±0.02	<0.5%	<0.5%	<0.5%	26.98±1.82*	0.01±0.01	<0.5%	<0.5%
Chlorzoxazone [210 µM]	6-hydroxychlorzoxazone	9.94±0.64	0	0	0	2.97±0.09	23.15±1.813*	2.76±.12	2.83±0.04
Dodecanoic acid [25 µM]	12-OHdodecanoic acid	<0.5%	0,11±0.01	0	<0.5%	0,17±0,004	<0.5%	<0.5%	<0.5%
Ebastine [25 µM]	hydroxyebastine	0,07±0,001	<0.5%	0,105±0,004	0,002±0,0005	<0.5%	<0.5%	8,03±1,34*	0,103±0,014
	carebastine	0	0	0	0	0	3.3*	0,0282±0,011	ND
Ethoxyresorufin [0.5 µM]	resorufin	7.23±0.22*	0	0	0	0	0	0	0
Midazolam [1 µM]	1-hydroxymidazolam	0	<0.5%	0	<0.5%	<0.5%	NDE	0	2.39±0.13*
	4-hydroxymidazolam	NC	NDE	NC	0	NC	NDE	NDE	0,0138±0,0017
Repaglinide [17 µM]	M1	0,015±0,002	0,015±0,002	0,083±0.003*	0,0157±0,0006	0,0168±0,0005	0,0163±0,001	0,0136±0,002	0,042±0,007
	3'hydroxyrepaglinide	0,00058±0.000047	<0.5%	1,46±0,04*	0,02343±0,0007	0,0099±0,0006	<0.5%	0,0096±0,0022	<0.5%
Tolbutamide [450 µM]	hydroxytolbutamide	0,04268±0,002740	<0.5%	0,9717±0,1276	5,850±0,5476*	0,1059±0,01711	<0.5%	<0.5%	<0.5%
	4-carboxytolbutamide	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE	NDE

Activity is expressed as mean ± SD, units: pmol/min/pmol of rhYCP450. Legend: M1; 2-despiperidyl-2-amino-repaglinide, NC; Not Calculated, NDE; Not Done. Activity less than 5% of the maximal observed activity is reported as <0.5%. \* Statistically significant difference p <0.05 when compared to the highest observed activity unless performed in simplicata (1-way ANOVA). \*\* Performed in simplicata, no statistical comparison was performed.

**Table 2. rhCYP450 relative activity towards CYP450 drugs in different incubation buffer.**

Drugs [concentration]	Quantified metabolites	rhCYP450 system	25 mM PO <sub>4</sub> (pH 7.4)	50 mM PO <sub>4</sub> (pH 7.4)	100 mM PO <sub>4</sub> (pH 7.4)	100 mM TRIS (pH 7.5)
Bupropion [155 µM]	Hydroxybupropion	CYP2B6	41%*	67%*	100%	64%*
Bufuralol [10 µM]	1-hydroxybufuralol	CYP2D6*1	68%*	82%	93%	100%
Chlorzoxazone [120 µM]	6-hydroxychlorzoxazone	CYP2E1	41%*	85%*	100%	25%*
Dodecanoic acid [7.5 µM]	12-hydroxydodecanoic acid	CYP4A11	99%**	77%**	NDE	100%**
Ebastine [5 µM]	Hydroxyebastine	CYP2J2	100%	99.6%	98%	94%
	Carebastine	NDE	73%*	200%	100%	41%*
Ethoxyresorufin [0.3 µM]	Resorufin	CYP1A1	42%*	65%	100%	45%*
Midazolam [1 µM]	1-hydroxymidazolam	CYP3A5*	41%*	72%*	100%	65%*
	4-hydroxymidazolam	NDE	ND	ND	ND	ND
Repaglinide [17 µM]	M1	CYP2C8	100%	70%*	69%	69%
	hydroxyrepaglinide	NDE	100%	78%*	56%*	60%
Tolbutamide[150 µM]	hydroxytolbutamide	CYP2C9	130%*	32%	100%	1314%*

Untransformed value of activity are presented in Supplementary Figure 1. Statistical analysis was performed on untransformed data from Supplementary Figure 1. (ANOVA, post-hoc Dunnet). Legend: M1; 2-despiperidyl-2-amino-repaglinide, mM; millimolar, ND; Not Detected, NDE; Not Done, PO<sub>4</sub>; phosphate.

\*Statistically significant difference  $p < 0.05$  when compared to the 100 mM PO<sub>4</sub> (pH 7.4) used as control. \*\* No statistical comparison were performed, not enough data.

**Table 3. *In vitro* relative activity of probe drug metabolism when co-incubated**

<b>Probe [concentration] (dissolution solvent)</b>	<b>Quantified metabolites</b>	<b>rhCYP450 incubation system</b>	<b>Drug co-incubated with [concentration]</b>	<b>% change in activity</b>
Bupropion [155 µM] (0,1 N HCl)	hydroxybupropion	2B6	+ ethoxyresorufin [1 µM] + dodecanoic acid [5 µM]	↓32% ↓31%
Bufuralol [10 µM] (0.1 N HCl)	1-hydroxybufuralol	2D6*1	+ bupropion [155 µM] + ebastine [5 µM]	↓80% ↓43%
Chlorzoxazone [200 µM] (MeOH)	6- hydroxychlorzoxazone	2E1	+ ethoxyresorufin [1 µM]  + repaglinide [3 µM] + dodecanoic acid [5 µM]	↓61%  ↓72% ↓69%
Ethoxyresorufin [0.3 µM] (DMSO)	resorufin	1A1	+ ebastine [5 µM] + bupropion [155 µM]	↓37% ↓30%
Midazolam [1 µM] (MeOH)	1-hydroxymidazolam	3A5	+ repaglinide [3.4 µM] + dodecanoic acid [50 µM]	↓21% ↑32%
Repaglinide [3.4 µM] (DMSO)	hydroxyrepaglinide	2C8	+ chlorzoxazone [210 µM] + dodecanoic acid [50 µM] + ebastine [5 µM]	↓31% ↓43% ↓41%

Legend: DMSO; dimethylsulfoxide, HCl; hydrochloric acid, MeOH; Methanol, µM; micromolar. Results are presented following student-t test significant interaction ( $p < 0.05$  compared to the incubation alone used as control). Only interaction higher than 25% are presented. All relative activities presented in percentage were the results of the quotient between mean triplicate data activity obtained from substrate co-incubated with another substrate over its triplicate mean value when incubated alone.



**Table 4. *In vitro* kinetics parameters of probes incubated alone or within cocktail #1 in rhCYP450 system.**

Probe	Quantified metabolites	rhCYP450 incubation system	Experimental intervention	Best-Fit Model	Km ± SD	Vmax ± SD	CLint (95CI)
Ebastine	sum of hydroxyebastine and carebastine	CYP2J2	Solo	Allosteric sigmoidal	0.34 ± 0.04 <sup>y</sup>	15.6 ± 0.4	47.7 (40.4-55)
			Cocktail 1	Allosteric sigmoidal	0.53 ± 0.04 <sup>y</sup>	17.9 ± 0.4	34.8 (31.1-38.5)
	desalkylebastine	CYP3A5	Cocktail 1	Substrate inhibition	3.8 ± 2.2	0.86 ± 0.46	0.13 (-0.08-0.33)
Bupropion	hydroxybupropion	CP2B6	Solo	Michaelis-Menten	151 ± 15	31.3 ± 1.1	0.22 (0.17-0.27)
			Cocktail 1	Michaelis-Menten	144 ± 13	32.1 ± 1.1	0.24 (0.19-0.28)
Chlorzoxazone	6-hydroxychlorzoxazone	CYP2E1	Solo	Michaelis-Menten	166 ± 10	21.9 ± 0.5	0.14 (0.13-0.16)
			Cocktail 1	Michaelis-Menten	213 ± 9	25.0 ± 0.4	0.13 (0.12-0.14)
Midazolam	1-hydroxymidazolam	CYP3A5	Solo	Michaelis-Menten	4.3 ± 0.4	8.6 ± 0.3	1.9 (1.5-2.2)
			Cocktail 1	Michaelis-Menten	7.6 ± 0.8	16.9 ± 0.9	2.1 (1.6-2.6)
	4-hydroxymidazolam	Solo	Michaelis-Menten	27 ± 6	3.0 ± 0.5	0.11 (0.05-0.17)	
		Cocktail 1	Michaelis-Menten	10 ± 1	0.72 ± 0.04	0.07 (0.05-0.08)	

<sup>y</sup>Khalf. Legend: CI; 95% confidence interval, CLint; intrinsic clearance, min; minute, pmol; picomole, SD; standard deviation, μM; micromolar, Vmax; maximal velocity. No statistical analysis were performed between the datasets. Only the estimation of 95% confidence interval calculated for the CLint allow the overlapping observation between two experimental interventions. Km units are expressed in μM, Vmax in pmol/min/pmol of rhCYP450 and CLint in μL/min/pmol rhCYP450.

**Table 5. *In vitro* kinetics parameters of probes incubated alone or within cocktail #2 in rhCYP450 system..**

Probe	Quantified metabolites	rhCYP450 incubation system	Experimental intervention	Best-Fit Model	Km ± SD	Vmax ± SD	CLint
Bufuralol	1-hydroxybufuralol	CYP2D6*1	Solo	Michaelis-Menten	11.7 ± 1.2	9.8 ± 0.4	0.8
			Cocktail 2	Michaelis-Menten	3.3 ± 0.5	4.3 ± 0.2	1.2
Ethoxyresorufin	resorufin	CYP1A1	Solo	Substrate inhibition	0.36 ± 0.07	8.6 ± 0.7	21
			Cocktail 2	Substrate inhibition	0.4 ± 0.05	9.7 ± 0.5	21
Repaglinide	hydroxyrepaglinide	CYP2C8	Solo	Michaelis-Menten	3.1 ± 0.3	3.04 ± 0.09	1.0
			Cocktail 2	Substrate inhibition	2.9 ± 1.3	3.4 ± 0.7	1.2
	M1	CYP2C8	Solo	Michaelis-Menten	2.7 ± 0.5	0.068 ± 0.004	0.0
			Cocktail 2	Michaelis-Menten	8.0 ± 1.2	0.31 ± 0.02	0.0

Legend: CI; 95% confidence interval, CLint; intrinsic clearance, M1; 2-despiperidyl-2-amino-repaglinide min; minute, pmol; picomole, SD; standard deviation, μM; micromolar, Vmax; maximal velocity. No statistical analysis were performed between the datasets. Only the estimation of 95% confidence interval calculated for the CLint allow the overlapping observation between two experimental interventions. Km units are expressed in μM, Vmax in pmol/min/pmol of rhCYP450 and CLint in μL/min/pmol rhCYP450.

**Table 6. Demographic characteristics of patients used for HHM activity assays.**

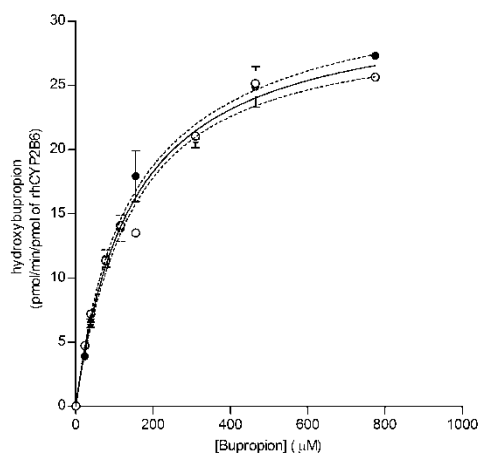
---

<i>Demographics</i>	
Gender (n)	10
Age (mean $\pm$ SD)	76 $\pm$ 17
Height (mean $\pm$ SD)	171 $\pm$ 6
Clinical Diagnostic (n)	
<i>Dilated cardiomyopathy</i>	5
<i>Viral cardiomyopathy</i>	3
<i>Idiopathic</i>	2
<i>cardiomyopathy</i>	
<i>Restrictive</i>	1
<i>cardiomyopathy</i>	
<i>Hearth failure</i>	1

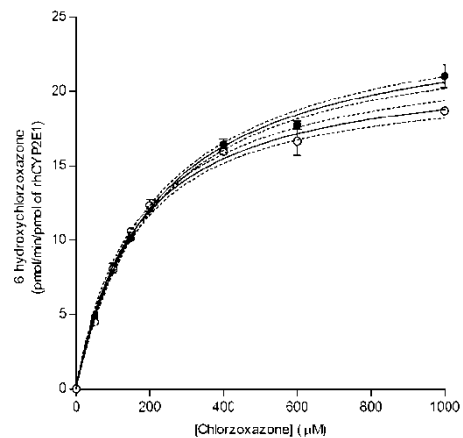
## Figures

**Figure 1.**

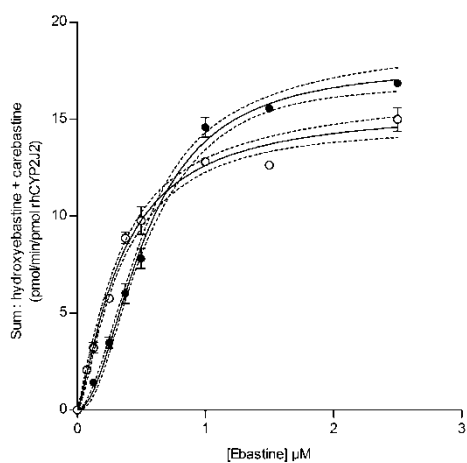
1A.



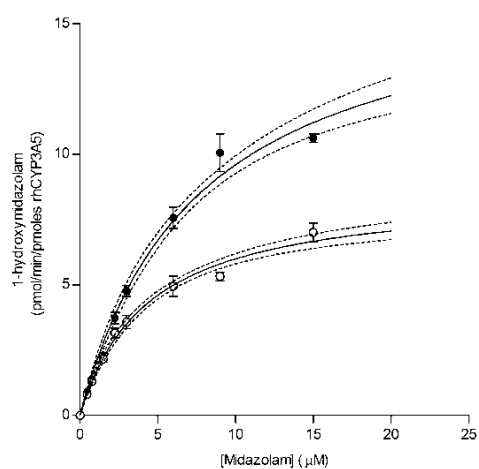
1B.



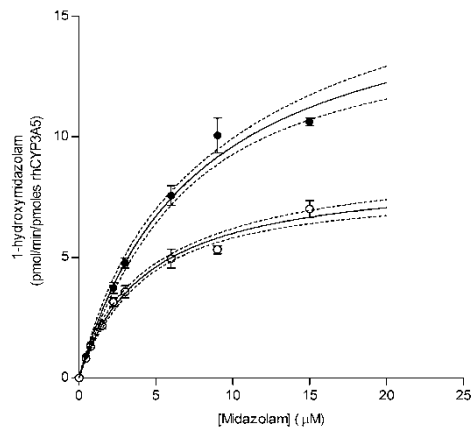
1C.



1D.



1E.



1F.

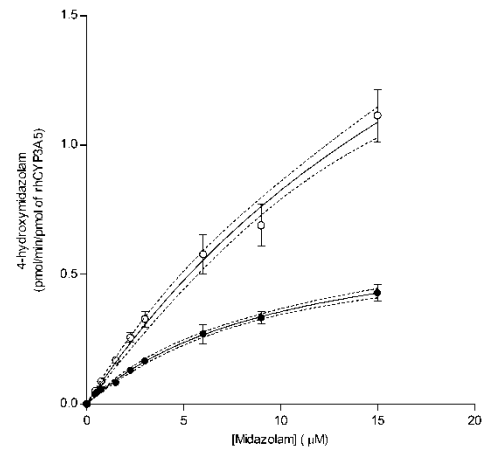
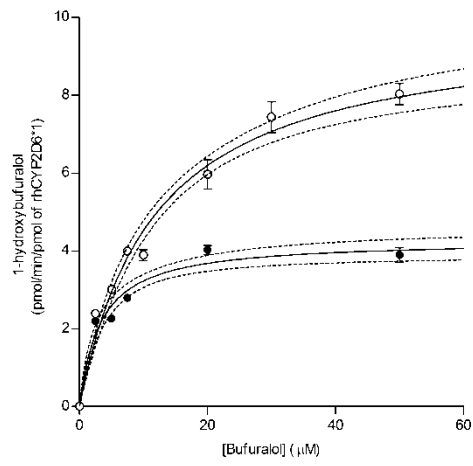
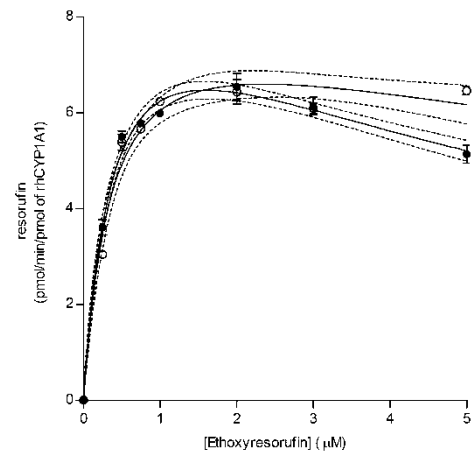


Figure 2.

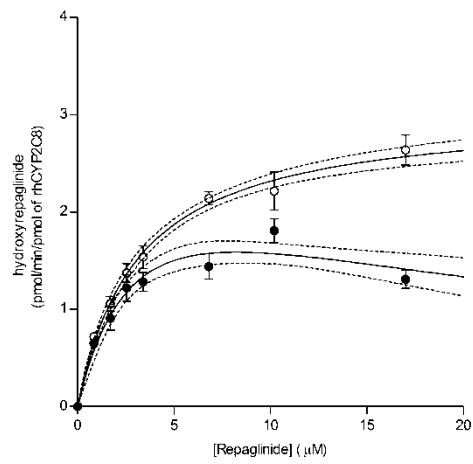
2A.



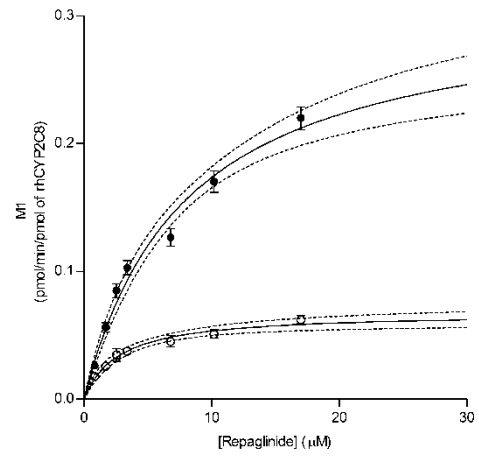
2B.



2C.

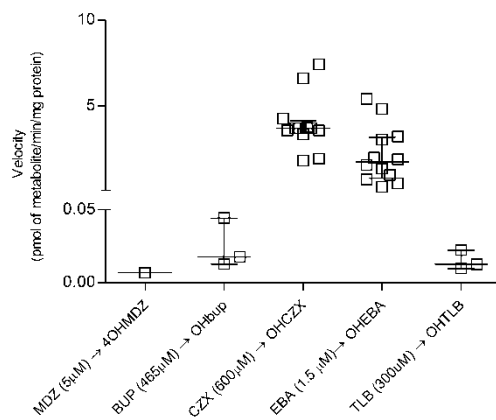


2D.



**Figure 3.**

3A.



3B.

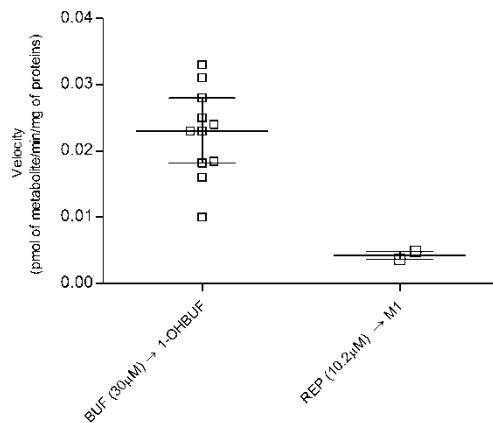
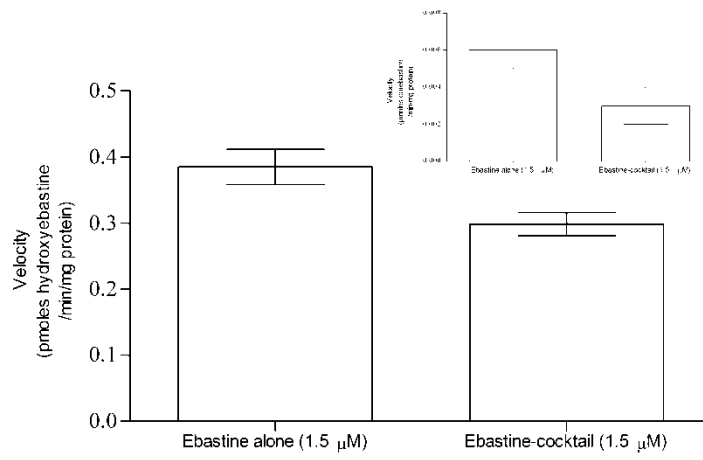




Figure 4.  
4A.



4B.

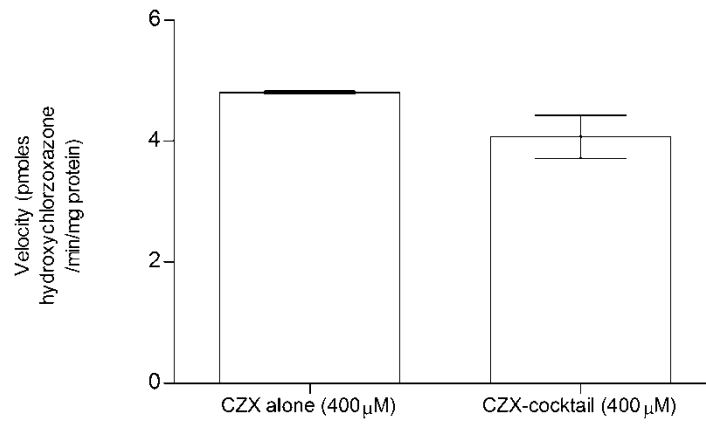
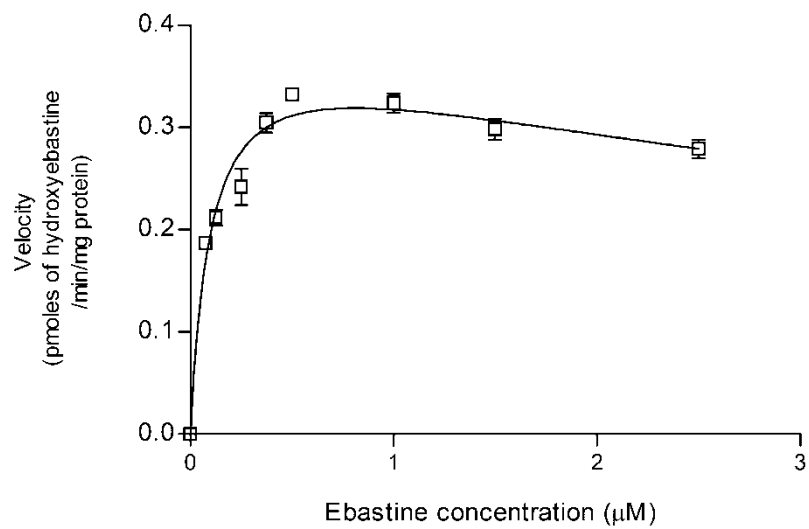


Figure 5.

5A.



5B.

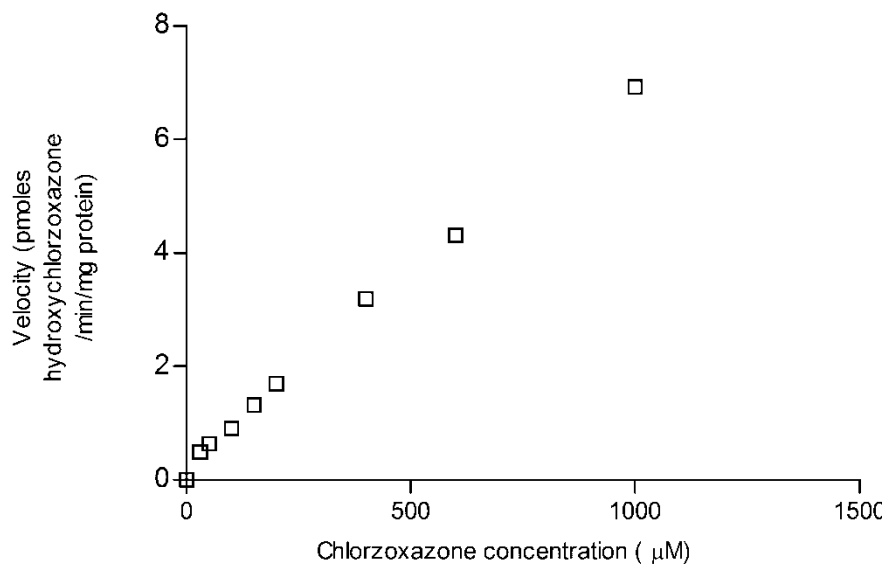
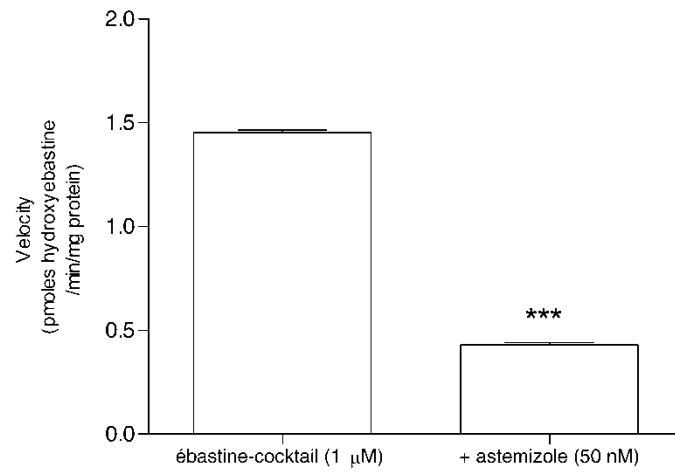
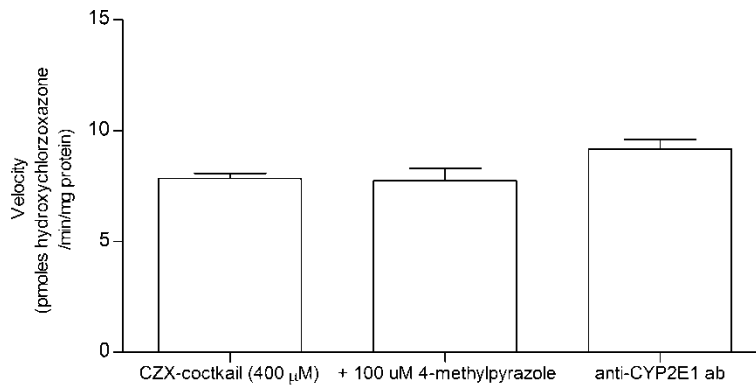


Figure 6.  
6A.



6B.



## **SUPPLEMENTAL DATA**

**ARTICLE: Validation of probe drugs used alone or within a cocktail for the study of CYP450-mediated drug metabolism in human heart microsomes.**

Jade Hugué, Fleur Gaudette, Véronique Michaud, Jacques Turgeon

Research Center (CRCHUM), Centre hospitalier de l'Université de Montréal, 900 Rue Saint-Denis, Montréal, QC H2X 0A9, Québec, Canada.

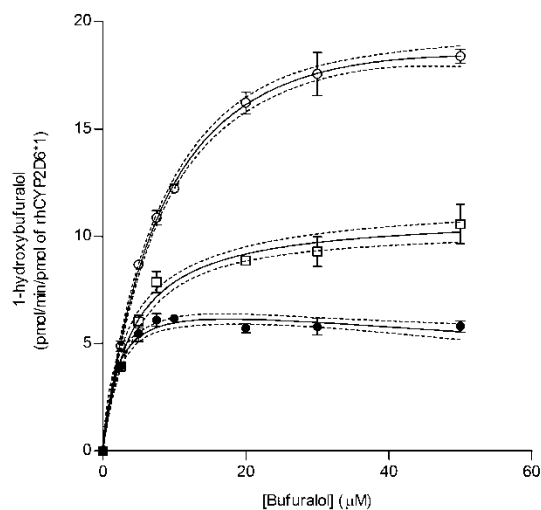
CRCHUM, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

(JH, FG, VM, JT)

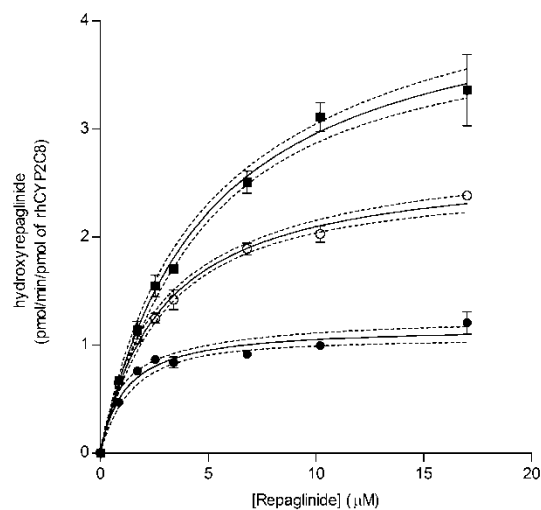
Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. (JH, VM, JT)

**Supplemental Figure 1.** Enzyme kinetics of (A) bufuralol incubated with rhCYP2D6\*1, (B-C) repaglinide incubated with rhCYP2C8. Empty circles (○): substrate incubated alone, filled circles (●): + ethoxyresorufin, filled squares (■): + bufuralol and empty squares (□): + repaglinide. Dashed line represents the 95% CI.

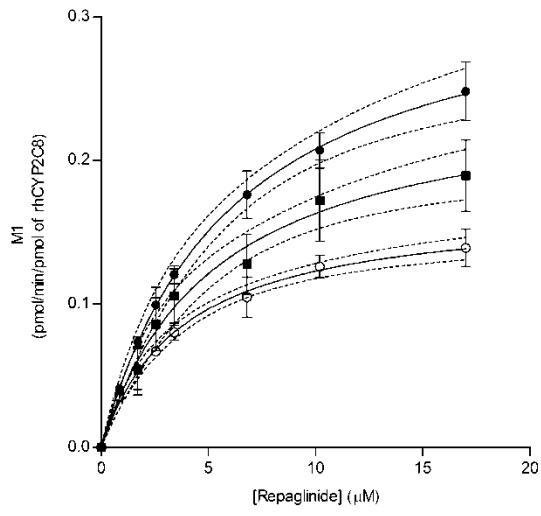
A.



B.

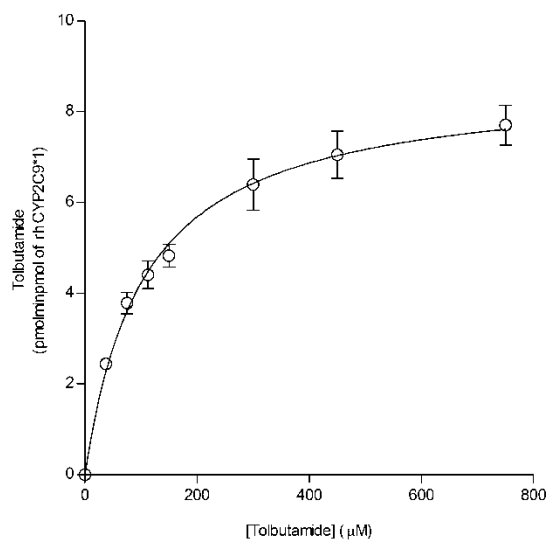


C.

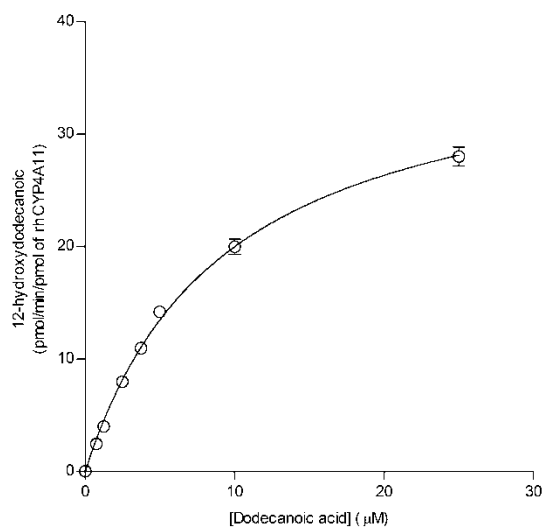


**Supplemental Figure 2.** Enzyme kinetics of (A) tolbutamide incubated with rhCYP2C9 and (B) dodecanoic acid incubated with rhCYP4A11.

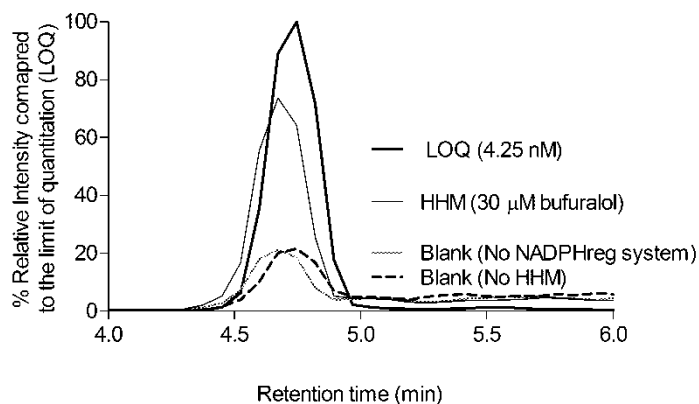
A.



B.



**Supplemental Figure 3.** Chromatogram representing the percentage of relative intensity of 6-hydroxybufuralol compared to the limit of quantitation (LOQ) of the LC-MSMS method. Four different chromatograms are presented; the LOQ signal, the signal obtained from bufuralol incubated in HHM (+NADPH regenerating system), one blank without NADPH regenerating system (with substrate and HHM) and one blank without HHM (with substrate and NADPH regenerating system).





**Supplemental Table 1. Comparison of *in vitro* probes activities with rhCYP450 between ethoxyresorufin, bufuralol and repaglinide.**

Probe substrates	Quantified metabolites	rhCYP450	Experimental		Km ± SD (µM)	Vmax ± SD (pmol/min/pmol rCYP450)	CLint (95CI) (µL/min/pmol rCYP450)
			intervention	Best-Fit Model			
Bufuralol	1-hydroxybufuralol	CYP2D6*1	Solo	S-I	9.9 ± 0.9	25.2 ± 1.3	2.4 (1.9-2.9)
			+ repaglinide	M-M	4.0 ± 0.4	11.0 ± 0.3	2.6 (2-3.2)
			+ ethoxyresorufin	S-I	1.9 ± 0.4	7.5 ± 0.5	3.6 (2-5.3)
Repaglinide	hydroxyrepaglinide	CYP2C8	Solo	M-M	2.9 ± 0.2	2.70 ± 0.07	0.97 (0.81-1.13)
			+ ethoxyresorufin	M-M	1.16 ± 0.20	1.17 ± 0.05	1.05 (0.67-1.44)
			+ bufuralol	M-M	4.9 ± 0.4	4.4 ± 0.2	0.94 (0.75-1.12)
	M1	CYP2C8	Solo	M-M	3.8 ± 0.5	0.177 ± 0.008	0.047 (0.034-0.059)
			+ ethoxyresorufin	M-M	6.1 ± 1.0	0.33 ± 0.02	0.057 (0.036-0.078)
			+ bufuralol	M-M	5.3 ± 1.1	0.25 ± 0.02	0.049 (0.026-0.072)

Legend: A-S; allosteric-sigmoidal, CI; 95% confidence interval, CLint; intrinsic clearance, Km; affinity constant, min; minute, M-M; Michaelis-Menten, pmol; picomole, SD; standard deviation, S-I; Substrate Inhibition, µM; micromolar, Vmax; maximal velocity.

## 2.3 Discussion

Brièvement, nos résultats démontrent que les substrats-types chlorzoxazone, ébastine, bupropion et midazolam peuvent être utilisés ensemble pour étudier sélectivement les voies d'hydroxylation des CYP2E1, 2J2, 2B6 et 3A5. Nous avons aussi démontré que les substrats-types éthoxyrésorufine, bufuralol et répaglinide ne peuvent être combinés pour étudier les voies métaboliques des CYP1A1, 2D6 et 2C8, respectivement. Finalement, le substrat tolbutamide nécessite des conditions expérimentales différentes des 8 autres substrats étudiés et l'acide dodécanoïque interagit avec plusieurs substrats nous empêchant de les inclure dans un cocktail *in vitro*. Finalement, nous avons développé 3 méthodes analytiques suffisamment sensibles pour quantifier des métabolites formés en beaucoup plus petite concentrations par les MCH qu'avec les microsomes de foies humains (HLM) ou les isoenzymes recombinantes. De plus, ces 3 méthodes analytiques peuvent analyser les 14 métabolites issus de l'hydroxylation de 9 substrats-marqueurs utilisés. L'efficacité d'utilisation des substrats fût améliorée de 34% (6 procédures d'incubations pour 9 substrats) et de 80% au niveau des méthodes analytiques quantitatives (3 méthodes analytiques pour quantifier 14 analytes). Le Tableau 2 résume les résultats obtenus ainsi que les différences majeures entre les méthodes analytiques.

Les isoenzymes recombinantes exprimant les CYP450s humains (rhCYP450) utilisées dans ce projet de recherche proviennent de la même source commerciale. La protéine d'une isoenzyme du CYP450 est exprimée dans des cellules d'insectes préalablement infectées par le système baculovirus exprimant l'ADN complémentaire (ADNc) de l'isoenzyme étudiée. Des microsomes sont préparés à partir de cette matrice. Étant donné que tous les tests ont été effectués avec la même matrice nos résultats sont standardisés en terme de surexpression de l'isoenzyme. Dans cette matrice, nous avons observé certaines cinétiques enzymatiques atypiques envers certains substrats et des inhibitions asymétriques lors d'interactions entre deux substrats.

**Tableau 2.** Résumé du développement de cocktails et des méthodes analytiques.

Traitement	Substrats marqueurs	Isoenzymes ciblées	Métabolites	Transition de masses des métabolites	Méthode analytique	Colonne chromatographique	Phase mobile	Mode de détection
cocktail 1	ébastine	CYP2J2	hydroxyébastine	486 → 167	méthode 1	Thermo Scientific Aquasil C18 column (100 x 2.1 mm I.D., 5 m)	acétonitrile : 10 mM ammonium formate (ratio of 40:60), pH 3.0	positif
			désalkylébastine	268 → 167				
			carébastine	500 → 167				
	midazolam	CYP3A5	1-hydroxymidazolam	342 → 168				
			4-hydroxymidazolam	342 → 234				
bupropion	CYP2B6	hydroxybupropion	256 → 139					
Solo	tolbutamide	CYP2C9	chlorzoxazone	183.9 → 120.1	méthode 2	Phenomenex Luna PFP(2) column (150*3.0 mm, 3 µm)	acétonitrile : acide formique 0.01% (ratio 40:60)	négatif
			hydroxytolbutamide	284.9 → 186.1				
			4-carboxytolbutamide	298.9 → 200.1				
Solo	acide dodécanoïque	CYP4A11	acide 12-hydroxydodécanoïque*	214.9 → 1169.1				
Solo	bufuralol	CYP2D6	hydroxybufuralol	278.0 → 186.1	méthode 3		acétonitrile : acide formique 0.01% (ratio 50:50)	positif
Solo	éthoxyrésorufine	CYP1A1	résorufine	214 → 103				
Solo	répaglinide	CYP2C8	M1	385.1 → 106.1				
			M4	469.1 → 246.2				

\*évaporation à sec à 10 psi (*pound-force per square inch*), reconstitution avec 200 µL de méthanol avant analyse.

La majorité des cinétique enzymatique observées décrivant l'hydroxylation des substrats utilisés seuls ou en combinaison sont décrites par des profils suivant le modèle Michaelis-Menten. Seuls deux substrats, lorsqu'incubés seuls ou en combinaisons, sont hydroxylés selon deux modèles atypiques; le modèle d'inhibition par le substrat (éthoxyrésorufine) et le modèle allostérique-sigmoïdale (ébastine). Ce changement de modèle cinétique est souvent associé à une forme de contrôle direct de l'enzyme réagissant à un déséquilibre survenu dans son environnement lui permettant de conserver son homéostasie.<sup>398</sup> Différentes formes de contrôles directs peuvent être générées par la cellule soit par la liaison de son propre substrat ou soit d'un autre composé (effecteur) agissant comme inhibiteur ou activateur par sa liaison au site catalytique ou de régulation (allostérie).<sup>399,400</sup> De façon expérimentale, ce phénomène a souvent lieu lorsque le milieu est saturé en concentration de substrat, événement quasi impossible dans un contexte *in vivo*.

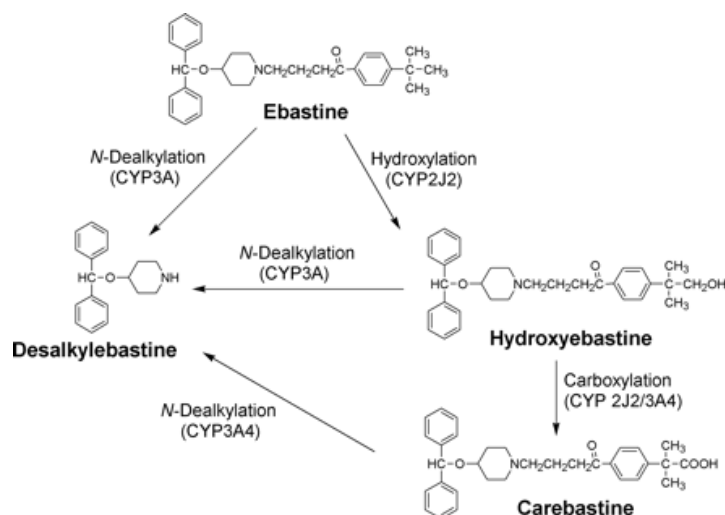
### 2.3.1 Discussion spécifique : éthoxyrésorufine

L'éthoxyrésorufine est hydroxylée par le CYP1A1 selon le modèle cinétique d'inhibition par le substrat même lorsqu'incubée en présence du répaglinide et du bufuralol. Ce phénomène est suggéré être provoqué par un excès de substrat pouvant être expliqué par un artefact créé expérimentalement lors de l'incubation ou par une capacité d'autorégulation de l'isoenzyme. Cette deuxième explication s'explique par le fait qu'à une certaine concentration de substrat, l'enzyme diminuerait sa capacité métabolique qui s'observe au point d'inflexion de la courbe.<sup>401</sup> Selon les résultats obtenus, le point d'inflexion a eu lieu à environ 1  $\mu\text{M}$  (0,24  $\mu\text{g/ml}$ ) d'éthoxyrésorufine suggérant qu'une concentration de 1  $\mu\text{M}$  dans l'environnement de l'enzyme provoquerait un mécanisme d'autorégulation.

### 2.3.2 Discussion spécifique : ébastine

La formation du métabolite hydroxyébastine par l'isoenzyme recombinante CYP2J2 suit un modèle de cinétique allostérique avec une courbe sigmoïdale et ce en présence ou non du cocktail #1. L'hydroxyébastine et son métabolite séquentiel la carébastine

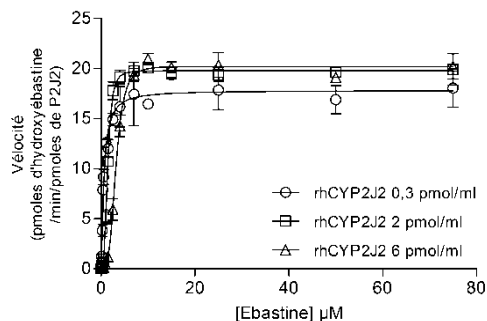
peuvent tous les deux être N-désalkylés en désalkylébastine par les CYP3A (Figure 19).<sup>259</sup>



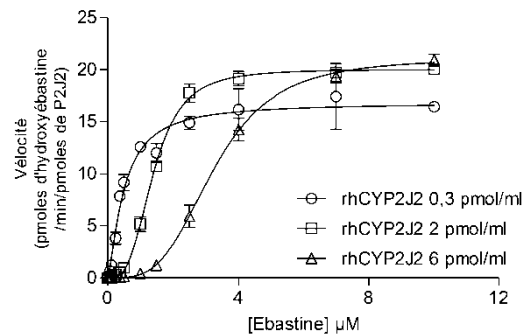
**Figure 19.** Voies métaboliques du substrat ébastine d'après Liu K-H *et collègues*. (2006) *Characterization of Ebastine, Hydroxyebastine, and Carebastine Metabolism by Human Liver Microsomes and Expressed Cytochrome P450 Enzymes: Major Roles for CYP2J2 and CYP3A*. *Drug Metab Dispos* 34:1793-1797.<sup>259</sup> (Autorisation de reproduction obtenue par Richard Dodenhoff, Journals Director de l'ASPET 2015-08-10)

Nos résultats démontrent pour la première fois une cinétique allostérique de la voie d'hydroxylation de l'ébastine par le CYP2J2. Une des raisons pour lesquelles aucune autre publication n'a jamais rapporté ce type de cinétique est l'utilisation de trop grandes concentrations d'ébastine (souvent jusqu'à  $100 \mu\text{M}$ <sup>259,402</sup>) particulièrement dans la partie ascendante de la courbe en plus d'une trop grande concentration de protéines (quantité de rhCYP2J2) lors de l'incubation. Conséquemment, la portion ascendante de la courbe cinétique camoufle l'allostérie observée à faible concentration de substrat. La Figure 20 illustre le profil d'hydroxylation de l'ébastine par le CYP2J2 selon le modèle allostérique avec les rhCYPP2J2.

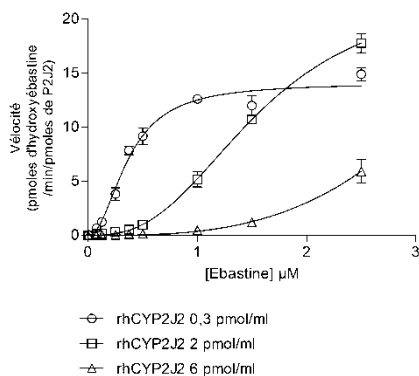
19-A.



19-B.



19-C.

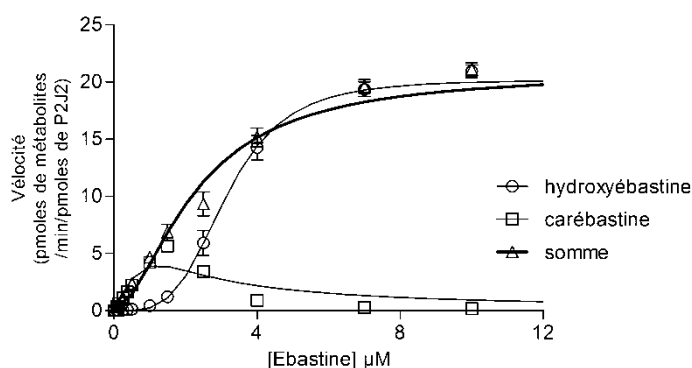


**Figure 20.** Profil de cinétique enzymatique de l'ébastine avec les rhCYP2J2. A (Gauche) Profil de cinétique enzymatique du substrat ébastine avec les rhCYP2J2 à des concentrations variant de 0-75 $\mu$ M. B (Droite) Illustration rapprochée de la figure 19-A entre les concentrations 0 et 10  $\mu$ M. C (Centre) Illustration rapprochée de la figure 19A entre les concentrations 0 et 2,5  $\mu$ M. Les incubations ont été effectuées en triplicata, pendant 20 minutes selon les méthodes d'incubations mentionnées dans le manuscrit 1).

La Figure 20 suggère que l'isoenzyme CYP2J2 régule le métabolisme de l'ébastine de façon allostérique. L'allostérie est définie par la liaison de molécules (substrats ou effecteurs [activateurs ou inhibiteurs]) au site catalytique ou régulateur de l'enzyme.<sup>398</sup>

Certaines données font état de potentiel d'inhibition allostérique par le telmisartan envers l'O-déméthylation de l'astémizole dans les rhCYP2J2.<sup>403</sup> D'autres chercheurs mentionnent une composante allostérique dans l'O-déméthylation de l'astémizole par les CYP2J2, 4F12, 2D6 et 3A4.<sup>404</sup> Il s'agit des deux seules études, selon nos connaissances, ayant démontré le potentiel allostérique du CYP2J2.

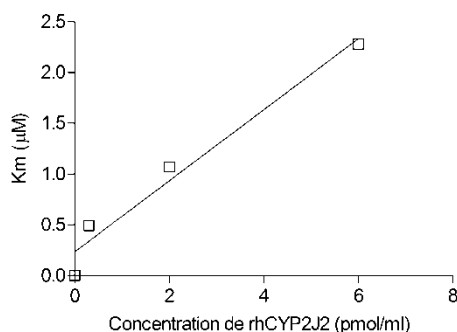
Une des explications au modèle d'allostérie serait que l'hydroxyébastine agirait comme effecteur (substrat) par compétition pour le site d'hydroxylation du CYP2J2 avec l'ébastine rajoutant ainsi une complexité au modèle qui est peu documenté dans la littérature.<sup>405</sup> De façon mécanistique, il est possible de suggérer que la formation de carébastine à partir de l'hydroxyébastine est très rapide ( $V_{\max} = 13 \mu\text{l}/\text{min}/\text{rhCYP2J2}^{259}$ ) et est décrit par un profil cinétique d'inhibition par le substrat (Figure 21). L'addition des deux métabolites séquentiels obtenus permet de diminuer la concavité de la courbe démontrant que l'hydroxylation de l'hydroxyébastine en carébastine a lieu au début de la cinétique d'ébastine en hydroxyébastine (lorsque la concentration d'ébastine est  $< K_m$ ).



**Figure 21.** Cinétique enzymatique de l'ébastine dans les rhCYP2J2 de 0 à 12  $\mu\text{M}$  utilisant une concentration de 2 pmol/ml de rhCYP2J2.  $\circ$  : Représentation de la cinétique de formation du métabolite hydroxyébastine dans les rhCYP2J2 suite à l'incubation du substrat ébastine.  $\square$  : Représentation de la cinétique de formation du métabolite carébastine dans les rhCYP2J2 suite à l'incubation du substrat ébastine.  $\Delta$  : Représentation de la cinétique de formation de la somme des deux métabolites dans les rhCYP2J2 suite à l'incubation du substrat ébastine.

En plus de démontrer un profil cinétique atypique, nos résultats démontrent que le  $K_m$  augmente en fonction de la concentration de rhCYP2J2 utilisée dans l'incubation

(Figure 22). Ce graphique explique la valeur plus petite de  $K_m$  obtenue pour le substrat ébastine avec les rhCYP2J2 par rapport aux autres valeurs de  $K_m$  observés dans la littérature. Par exemple, un  $K_m$  de 8,20  $\mu\text{M}$  fût obtenue avec 20 pmol/ml de rhCYP2J2<sup>259</sup>. Finalement, la variabilité dans l'estimation des  $K_m$  influence grandement les valeurs de clairance intrinsèque ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) rapportée dans la littérature ( $CL_{\text{int}}$  ébastine  $\rightarrow$  hydroxyébastine avec les rhCYP2J2 = 0.45  $\mu\text{l}/\text{min} / \text{pmoles rhCYP2J2}$ <sup>259</sup>) par rapport à celle obtenue avec nos conditions expérimentales ( $CL_{\text{int}} = 47,7 \mu\text{l}/\text{min} / \text{pmoles rhCYP2J2}$ ).<sup>406</sup>



**Figure 22.** Représentation graphique du Khalf de l'hydroxylation de l'ébastine en fonction de la concentration de rhCYP2J2 ( $r^2 = 0,97$ ).

Dans un système de fractions microsomales de tissu (ex : HLM), le phénomène de cinétique allostérique est imperceptible dû à la présence d'autres voies oxydatives. La présence du CYP3A dans les HLM participe à la formation du désalkylébastine et pourrait dissimuler le phénomène d'allostérie par le CYP2J2.<sup>259</sup> D'ailleurs, l'allostérie dans la formation d'hydroxyébastine n'a pas été observée lorsqu'incubée dans les HLM ni dans les HHM. Les comparaisons des constantes obtenues des différents systèmes enzymatiques et leur pertinence clinique (HLM, MCH et rhCYP2J2) sont détaillées aux chapitres 3 et 4.

### 2.3.3 Discussion spécifique : cocktail #2

D'autres faits intéressants furent l'observation d'interactions des substrats répaglinide avec les rhCYP2C8 et bufuralol avec les rhCYP2D6 lorsque mis en présence des substrats éthoxyrésorufine, bufuralol et répaglinide (combiné sous l'appellation cocktail



#2). Des mécanismes de régulation enzymatique d'activation de type mixte et d'inhibition incompétitive (*uncompetitive inhibition*) sont suggérés par l'interprétation des graphiques obtenus.<sup>407,408</sup> [ENREF 275](#) Ces deux phénomènes d'inhibition démontrent que l'enzyme conserve son homéostasie (équilibre) de réaction par une capacité globale ( $CL_{int}=V_{max}/K_m$ ) similaire avec ou sans inhibiteur.<sup>409</sup> Cette particularité s'explique par un changement de même direction pour les deux constantes cinétiques générant un ratio  $V_{max}/K_m$  équivalent à celui obtenu sans inhibition.

Le phénomène d'activation de type mixte (*ping-pong/double displacement kinetics*) observé envers l'hydroxylation du substrat répaglinide avec les rhCY2C8 lorsque mis en présence du bufuralol se traduit par une augmentation du  $K_m$  reflétant une inhibition non compétitive ainsi que par une augmentation du  $V_{max}$ . L'augmentation du  $V_{max}$  est un phénomène rare mais connu. Par exemple, l'oxydation du 17- $\beta$ -estradiol s'est vu stimulée en présence d' $\alpha$ -naphthoflavone ( $\alpha$ -NF) dans les rhCYP3A4.<sup>410</sup> D'ailleurs, l'agent chimique le plus connu et utilisé comme activateur des CYP450s est l' $\alpha$ -naphthoflavone. L'hydroxylation de la nifédipine fut elle aussi augmentée en présence d' $\alpha$ -NF dans les microsomes de foie humain.<sup>411</sup> Finalement, un phénomène similaire à celui du répaglinide fut observé dans les rhCYP2D6 envers l'hydroxylation en position 21 de la progestérone lorsqu'elle fût mise en présence de fluoxétine.<sup>412</sup> Ce phénomène est dépendant des substrats utilisés. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène sont peu connus, mais il est suggéré qu'en présence de plusieurs substrats, l'enzyme formerait un intermédiaire Enzyme-Substrat (ES) où la forme de l'enzyme serait altérée. Dans notre cas, le bufuralol n'est pas un substrat du CYP2C8 et donc agit comme activateur indépendant. Par contre nous ne pouvons confirmer si l'activation est homotropique (au niveau du site catalytique) ou hétérotropique (autre site que le site catalytique). Les processus mécanistiques et la modélisation enzymatique dépassent les objectifs de mes études doctorales, mais il est intéressant de comprendre que l'enzyme doit atteindre un état transitoire avec une certaine énergie afin de catalyser une réaction et que la vitesse de réaction ( $v$ ) est indépendante de l'affinité du substrat envers l'enzyme ( $K_m$ ).<sup>74</sup> Ainsi, la diminution de l'affinité du substrat répaglinide pour l'enzyme CYP2C8 est indépendante de sa vitesse d'hydroxylation. Toutefois, de manière logique, l'augmentation de la vitesse de réaction pourrait engendrer une augmentation de la

concentration de substrats nécessaire pour atteindre le  $V_{max}$ , d'où l'augmentation du  $K_m$ . D'ailleurs, comme il en résulte aucun changement dans la clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ) la capacité globale de réaction n'est pas altérée en présence de l'activateur. Étant donné que ce phénomène est observé pour les deux métabolites non séquentiels générés par le CYP2C8 (M1 et l'hydroxyrépaglinide), l'interaction provoquée par le bufuralol est homogène pour les deux voies d'hydroxylation. Cependant, ce phénomène n'a jamais été clairement rapporté *in vivo*. Étant donné que l'atteinte d'une vitesse maximale requiert parfois des concentrations très élevées impossibles à administrer chez l'humain, ce phénomène est non significatif *in vivo*.

Bref, ce projet a révélé plusieurs nouvelles observations quant au profil cinétique de certains substrats ainsi que l'impact sur la fonction oxydative des CYP450s entre différents substrats. La recommandation provenant de ce manuscrit est d'utiliser le cocktail #1 afin d'étudier le métabolisme oxydatif sélectif envers CYP2J2, CYP3A5, CYP2B6 et CYP2E1. Finalement, nous avons observé du métabolisme dans les microsomes de ventricules de cœurs humains pour certains substrats suggérant que les MCH sont doués d'une activité oxydative NADPH-dépendante. D'ailleurs, le prochain chapitre expose les profils de cinétique enzymatique de l'ébastine et de la chlorzoxazone dans les microsomes de ventricules de cœurs humains ayant démontrés des activités permettant de dériver des paramètres de cinétique enzymatique pertinents et représentatifs dans le contexte d'étude du métabolisme extrahépatique. Les différentes cinétique enzymatique atypiques observées lors du développement des cocktails a facilité la compréhension de celles observées avec certains substrats des CYP450s avec les MCH présentées dans le chapitre suivant.

### **3. Chapitre 3 – Manuscrit 2**

**Caractérisation des profils métaboliques dans la fraction microsomale de ventricules de cœurs humains des substrats ébastine et chlorzoxazone.**

## 3.1 Avant-propos

### 3.1.1 Introduction

La capacité d'oxydation envers certains substrats-marqueurs des CYP450s dans la fraction microsomale isolée de ventricules de cœurs humains observée dans le chapitre précédent a contribué à alimenter la perspective d'approfondir les observations obtenues et de caractériser le comportement métabolique sélectif envers certaines isoenzymes ciblées par des substrats sélectifs identifiés au chapitre 2 (manuscrit 1). Néanmoins, certaines décisions ont dû être prises afin de bien cibler la pertinence de continuer les études métaboliques avec les MCH utilisant certains substrats-types. L'acide dodécanoïque, sélectif envers l'isoenzyme CYP4A11, dont l'ARNm est hautement exprimé dans le cœur humain a dû être abandonné dû à l'absence complète de formation du métabolite hydroxylé en position 12 avec les MCH malgré une sensibilité de détection de la méthode analytique par LC/MSMS de l'ordre de 4 nanomolaires (0.8 ng/ml), limite acceptable dans le contexte étudié. Deuxièmement, l'hydroxylation des substrats bufuralol et répaglinide avec les MCH n'était pas suffisamment élevée pour poursuivre la caractérisation de leur profil métabolique. D'ailleurs, la majorité des activités observées a été obtenue à des concentrations de substrats équivalentes à 3 fois leur  $K_m$  respectif en deçà de quoi aucune activité n'était observée malgré la sensibilité des méthodes analytiques développées. Le présent chapitre cible le profil d'activité enzymatique de 2 substrats sélectifs pour 2 isoenzymes particulières afin d'en extraire des valeurs de clairance intrinsèque pouvant être utilisées dans des modèles prédictifs à l'échelle humaine. Ces modèles prédictifs de pharmacocinétique incluant la physiologie humaine (*physiologically-based pharmacokinetic model* :PBPK) utilisent des données obtenues à partir de résultats *in vitro* extrapolés à l'échelle humaine.

Les extrapolations de données *in vitro* (IVIVE : '*in vitro/in vivo extrapolation*') regroupent certaines formules mathématiques permettant d'obtenir des valeurs représentant la situation physiologique à l'échelle d'un organe ou tissu complet ou à l'échelle du corps humain. Les constantes obtenues extrapolées à l'échelle *in vivo* peuvent par la suite être introduites dans des modèles prédictifs basés sur la

pharmacocinétique du composé et la physiologie du tissu.<sup>413</sup> Les données *in vitro* deviennent ainsi le fondement des données extrapolées et des prédictions effectuées sur la pharmacocinétique d'un composé ou de la contribution d'un organe à la clairance de ce composé.<sup>414</sup> L'importance d'estimer de manière précise les constantes de cinétiques enzymatiques *in vitro* est cruciale dans l'établissement de modèle PBPK. D'ailleurs, il existe un manque flagrant de données *in vitro* sur la cinétique enzymatique de médicaments dans des organes extrahépatiques pouvant permettre l'extrapolation des valeurs de clairance à l'échelle *in vivo*. Bien qu'en cinétique conventionnelle le foie régit les concentrations plasmatiques, lorsque distribuées dans d'autres organes/tissus, celles-ci peuvent être contrôlées par des mécanismes enzymatiques et de transports exprimés localement. Afin d'en vérifier l'hypothèse au niveau du cœur, nous avons effectué certaines extrapolations de clairance associée au ventricule gauche.

L'objectif de ce projet était de caractériser les profils d'hydroxylation complets des substrats bupropion, chlorzoxazone, ébastine et midazolam avec les MCHs et imputer les CYP2B6, 2E1, 2J2 et 3A comme sources enzymatiques responsables de l'activité métabolique observée. Un large intervalle de concentrations des substrats du cocktail #1 fut incubé avec 18 fractions microsomales isolées de ventricules de cœurs humains. À l'aide d'inhibiteurs chimiques et d'anticorps sélectifs d'isoenzymes l'imputabilité a pu être confirmée pour une isoenzyme (CYP2J2) tandis que d'autres recherches seront nécessaires pour d'autres (CYP2E1). Un deuxième segment de ce chapitre extrapole les données *in vitro* de capacité métabolique pour les substrats ébastine et chlorzoxazone afin d'obtenir des valeurs extrapolées de clairance intrinsèque associée au ventricule complet.

### 3.1.2 Statut actuel de du manuscrit

Ce manuscrit est présenté en français et est en cours de traduction pour publication éventuelle dans le journal *Drug Metabolism and Disposition*.

## 3.2 Manuscrit II

## **Metabolic Profile Characterization in the Microsomal Fraction of Human Ventricles**

Jade Huguet, Fleur Gaudette, Véronique Michaud, Jacques Turgeon

Research Center (CRCHUM), Centre hospitalier de l'Université de Montréal, 900 Rue Saint-Denis, Montréal, QC H2X 0A9, Quebec, Canada.

CRCHUM, Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

(JH, FG, VM, JT)

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. (JH, VM, JT)

### 3.3 Introduction

Les médicaments sont distribués par la circulation générale aux différents organes et tissus du corps humain.<sup>1</sup> La circulation coronarienne irrigue les vaisseaux sanguins du cœur, soient les artères et veines coronaires. La paroi des vaisseaux sanguins coronariens (artères et veines) est tapissée de cellules endothéliales.<sup>2</sup> La circulation coronarienne s'étend à travers le myocarde composé de cardiomyocytes.<sup>3</sup> Il existe des échanges moléculaires entre la lumière vasculaire et les cardiomyocytes.<sup>4</sup> Cet échange permettrait à des médicaments, distribués par la circulation coronarienne, de pénétrer dans les cardiomyocytes.<sup>5</sup> D'ailleurs, des études suggèrent une distribution locale des médicaments dans les cardiomyocytes.<sup>5,6</sup> Les cellules endothéliales et les cardiomyocytes de ventricule de cœurs humains expriment, au niveau du réticulum endoplasmique lisse, différentes quantité et combinaison d'isoenzymes du Cytochrome P450 (CYP450).<sup>7-10</sup> Les médicaments, substrats des isoenzymes du CYP450, pénétrant les cardiomyocytes ou les cellules endothéliales pourraient ainsi être transformés localement. Ceci suggère qu'il existe une capacité d'élimination des médicaments par métabolisme dans un organe extrahépatique dû à la présence d'enzymes spécifiques. La clairance extrahépatique dans le ventricule de cœurs humains est pertinente afin de déterminer son rôle dans le contrôle des concentrations d'un médicament dans les cellules cardiaques. Ce phénomène ne peut être observé par des études pharmacocinétiques conventionnelles où les concentrations plasmatiques reflètent majoritairement la clairance associée au foie, occultant généralement toute participation extrahépatique.

La fraction microsomale extraite de ventricules de cœurs humains (MCH) fut démontrée capable d'hydroxyler différents médicaments tels que l'ébastine, la chlorzoxazone, le midazolam, le bupropion, le bufuralol, la tolbutamide et le répaglinide (Chapitre 2). Ainsi, l'hydroxylation de ces composés est une réaction catalysée par les CYP450.<sup>11</sup> Tous ces médicaments ont aussi été démontrés sélectifs envers différentes isoenzymes des familles 1, 2 et 3 des CYP450. L'ARNm de différentes isoenzymes du CYP450 des familles 1 à 3 est exprimé dans la fraction microsomale des cellules du tissu ventriculaire cardiaque de l'homme.<sup>12</sup> Les protéines des isoenzymes CYP2J2, 2C8,



2C9 se localisent dans différentes cellules du cœur humain dont les cardiomyocytes et les cellules endothéliales des artères coronaires.<sup>9,13</sup> Chez l'humain, le lien en l'expression spécifique de certains CYP450s, tels que le CYP2J2, CYP2C9 et CYP2E1 et leur activité métabolique relative au niveau des cellules cardiaques n'a jamais été corrélée. De plus, à notre connaissance, aucune donnée ne décrit les profils enzymatiques complets des substrats ébastine, bupropion, chlorzoxazone et midazolam dans les microsomes de cœurs humain ciblant les CYP2J2, 2B6, 2E1 et 3A5.

L'objectif de cette étude fût de déterminer la contribution réelle d'isoenzymes du CYP450 ciblées et la clairance de certains de leurs substrats sélectifs. La participation d'isoenzymes spécifiques dans l'hydroxylation de substrats sélectifs fût aussi explorée par des essais avec des inhibiteurs chimiques d'activité enzymatique. Finalement, la clairance intrinsèque de différents substrats fût calculée. Les paramètres cinétiques  $V_{max}$ ,  $K_m$ , et  $CL_{int}$  furent utilisés comme outil d'extrapolation de clairance métabolique cardiaque *in vivo* et permettre d'avoir un aperçu de la contribution du ventricule gauche à la clairance métabolique locale de substrats sélectifs des CYP450s.

### 3.4 Méthodes

#### Réactifs.

L'ébastine, l'hydroxyébastine, la carébastine, le désalkylébastine, l'hydroxyébastine-d5, la carébastine-d5, le désalkylébastine-d5, le bupropion, l'hydroxybupropion, l'hydroxubupropion-d6, le 4-hydroxymidazolam, le 4-hydroxymidazolam-d5 méthanoate et le 6-hydroxychlorozoxazone ont été achetés chez Toronto Research Chemicals (Toronto, On). Le produit de référence 6-hydroxychlorozoxazone a été acheté chez TLC Pharmachem (Vaughan, Ont, Can). L'alpha-hydroxymidazolam et l'alphahydroxymidazolam-d4 ont été achetés chez Cerilliant (Texas, USA). La chlorzoxazone, le nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADPH), le glucose-6-phosphate, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, le diméthyle sulfoxyde (DMSO), le sodium phosphate dibasique anhydre ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), le trishydroxyméthylaminométhane (TRIS), le chlorure de potassium (KCl) et le phenylméthanesulfonyle fluoride (PMSF) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Le phosphate de potassium monobasique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), l'acétonitrile et le méthanol ont été achetés chez Fisher Scientific (Toronto, On). Le chlorure de magnésium a été acheté chez JT Baker (Philipsburg, NJ). L'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) a été acheté chez Bioshop (Burlington, On). Le dithiothréitol (DTT) a été acheté chez Gibco®, Life Technologies Ltd. (Eugene, OR). Les Supersomes™ humains du CYP450 (rhCYP450) exprimant 2E1 et 2J2 (exprimant la CYP450 réductase et/ou le cytochrome b5) ainsi que les anticorps dirigés contre le CYP1A2 et 2E1 humains ont été achetés chez Corning® (Tewksbury, MA). L'anticorps dirigé contre le CYP1A1 (MA1A1) a été acheté chez Xenotech, LLC (Kansas, USA).

**Tissue de cœurs humains.** Les échantillons de tissus provenant de cœurs explantés de patients ont été obtenus par le Réseau d'Échange de Tissus et d'Échantillons Biologiques (RETEB), de l'Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Québec. Un formulaire de consentement était préalablement signé par les patients avant la transplantation et l'utilisation des tissus humains. Ce projet de recherche était approuvé en conformité avec les règles du comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de

Montréal. Immédiatement après la transplantation, le cœur explanté était immergé dans un tampon froid rapidement installé sur une circulation extracorporelle et perfusé pendant 10 minutes avec le même tampon. Des échantillons de ventricules gauches et droits étaient prélevés (5-20 g) en coupant des morceaux au-dessus de l'apex en évitant les cicatrices d'ischémie. Ces échantillons de tissus étaient immédiatement congelés dans l'azote liquide. Avant d'être utilisés, les tissus de ventricules étaient dégelés sur glace afin de préparer la fraction microsomale (MCH).

**Isolation des microsomes de cœurs humains.** La préparation des cœurs humains a été effectuée selon la méthode déjà décrite dans Michaud *et al.*<sup>12</sup>

#### **Quantification des protéines des MCH.**

La quantification des protéines dans la fraction microsomale a été effectuée selon le protocole standard du fournisseur Pierce® BCA Protein Assay Kit.

**Préparation des solutions concentrée.** Les solutions concentrées pour tous les substrats utilisés ont été préparées soit dans de l'eau ou des solvants organiques afin d'obtenir une solubilité et stabilité optimale tout en gardant le plus faible pourcentage possible de phase organique dans l'incubation, établit à 0,5% maximum. L'ébastine, le midazolam et la chlorzoxazone ont été solubilisés dans du méthanol où 2,5 µl, contenant les trois substrats, étaient utilisés par incubation. Le bupropion était dissout dans 0.1 N HCl (10 µl / incubation). L'ébastine, la chlorzoxazone et le midazolam ont été préparés à 500 µM, 200 mM and 3 mM, respectivement. Des dilutions en série ont été effectuées pour chacun des substrats pour atteindre des concentrations finales dans les incubations s'étendant de 0.15 à 5 fois leur  $K_m$  respectif (ebastine = 0.5 µM, bupropion = 155 µM, repaglinide = 3.4 µM, bufuralol = 10 µM, ethoxyresorufin = 1 µM, midazolam = 3 µM, tolbutamide = 105 µM, chlorzoxazone = 200 µM, dodecanoic acid = 5 µM).

#### **Incubations en fonction de la quantité et du temps d'incubation dans les MCH.**

Les microsomes de cœurs humains étaient dégelés sur glace. Les incubations étaient préparées dans un volume total de 500 µL et effectuées en triplicata pour chaque essai.

Les expériences en fonction du temps d'incubation étaient effectuées en mélangeant le tampon (100 mM PO<sub>4</sub>) et les substrats du cocktail#1. La pré-incubation de 10 minutes effectuée dans un agitateur réglé à 300 rpm à 37°C débutait par l'ajout de 100 µL du système régénérateur NADPH conservé sur glace. Ce système contenait du β-nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (sous sa forme oxydée β-NADP<sup>+</sup>; 1.3 mM/incubation), du D-glucose 6-phosphate (3.3 mM/incubation) dissout dans une solution de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM dans laquelle la glucose-6-phosphate déshydrogénase de Type VII (0.20 U/incubation) était fraîchement ajoutée. L'incubation débutait ensuite par l'ajout des MCH (150 µL). Les incubations étaient arrêtées après 40 ou 60 minutes d'incubations avec 1 ml de méthanol froid contenant les standards internes (SI). Après 10 minutes de repos sur glace, les échantillons étaient centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes. Une portion du surnageant était injectée directement dans le LC-MSMS. L'excédent était congelé à -20°C.

Le protocole pour les conditions de linéarité en fonction de la quantité de protéines et du temps d'incubation. Un changement dans la quantité de protéines et le temps d'incubation. Au moment d'ajouter les MCH, différentes concentrations de protéines étaient ajoutées (variant de 0,51 à 1,53 mg/mL). Les incubations duraient 60 minutes avant d'être arrêtées avec le méthanol froid (contenant le standard interne).

#### **Incubation des contrôles.**

Trois types d'incubations contrôles ont été effectués; 1) sans système régénérateur NADPH (remplacé par du MgCl<sub>2</sub>), 2) sans substrat (remplacé par le solvant de dissolution), 3) sans microsome (remplacé par le tampon d'isolation de microsomes, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 150 mM KCl / 1mM EDTA). La technique d'incubation était identique à celle mentionnée ci-haut. Les volumes de tampon de remplacement utilisés avaient le même volume que le réactif prévu pour une incubation totale de 500 µl.

#### **Cinétiques enzymatiques dans les MCH et le cocktail #1.**

La méthode d'incubation pour étudier la cinétique enzymatique dans les MCH était identique à celle utilisée pour tester les conditions de linéarité. Seul le volume de MCH

et le temps d'incubation étaient différents. Pour ces essais, le volume de MCH variait de 31,5 à 74,5  $\mu\text{L}$  ( $\sim 0,6$  mg/mL / incubation) et le temps d'incubation était de 40 ou 45 minutes.

### **Essais d'inhibition, d'immunoinhibition et de chauffage avec les MCH.**

La méthode d'incubation pour effectuer les essais d'inhibition possédait une étape supplémentaire. Toutes les incubations étaient effectuées dans un volume total de 500  $\mu\text{l}$  en triplicata dans un agitateur réglé à 300 rpm à 37°C. Les inhibitions effectuées avec des médicaments inhibiteurs étaient préalablement préparées à température pièce en mélangeant le tampon d'incubation (100 mM  $\text{PO}_4$ ) avec un volume variant de 2,5 à 10  $\mu\text{l}$ , dépendamment du solvant de dissolution de l'inhibiteur à l'étude. La pré-pré-incubation débutait avec l'ajout des MCH ou des rhCYP450 (2J2 ou 2E1) pour une durée de 10 minutes suivit de l'ajout de 100  $\mu\text{l}$  du système régénérateur NADPH (pré-incubation, 10 minutes). L'incubation était ensuite débutée par l'ajout du substrat (ébastine ou chlorzoxazone) pour une durée variant de 30 à 40 minutes. L'incubation était ensuite terminée par l'ajout de méthanol (contenant le standard interne) et la centrifugation à 13 000 rpm pour permettre la précipitation de protéine et récolter le surnageant.

Les essais d'immunoinhibition effectuées avec les anticorps dirigés contre les CYP450 humain étaient exécutés de la même méthode à l'exception de l'étape initiale de pré-pré-incubation où l'anticorps était incubé avec la source enzymatique (rhCYP450 ou MCH) sur glace entre 5 à 20 minutes selon les instructions du fournisseur.

### **Analyses des données et statistique.**

Toutes les incubations ont été effectuées en triplicata et la vitesse de formation des métabolites a été calculée en divisant la concentration de métabolites obtenue par le temps d'incubation (minute) et par la quantité de protéines microsomales utilisée (mg). Tous les graphiques ont été tracés, modélisés et analysés avec GraphPad Prism version 5.00 ou 6.00 pour Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Tous les points sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart-type (ET). Les paramètres  $K_m$  et  $V_{max}$  ont été obtenus suite à la modélisation des points de chaque courbe cinétique tracée avec des modèles de régressions non linéaires appropriés (Michaelis-Menten, Inhibition par le substrat ou Allostérique/Sigmoïdal).

La clairance intrinsèque a été calculée avec l'équation :

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$$

Un intervalle de confiance à 95% a été calculé selon l'équation d'intervalle de confiance pour un ratio de deux moyennes.<sup>14</sup>

#### **Extrapolation In vitro/In vivo.**

L'extrapolation de la clairance intrinsèque *in vitro* obtenue dans les MCH ( $CL_{int,MCH}$ ) a été extrapolée à la clairance intrinsèque *in vivo* du ventricule ( $CL_{int,vg}$ ) complet par l'équation sous-jacente qui a été adaptée de l'équation utilisée dans le foie où le facteur A MPPGL qui représente la quantité de protéine microsomale par gramme de foie a été substituée par le MPPGLV (*microsomal protein per gram of left ventricle*) qui représente la quantité de protéines microsomaux dans le ventricule gauche. Le facteur B qui correspond au poids du foie a aussi été substitué pour le poids du ventricule gauche. Cette donnée était non disponible dans nos échantillons, nous avons donc pris une moyenne (285,5 g) de ventricule gauche pesée selon Rackley *et al.*<sup>15</sup>

$$CL_{int,vg} = CL_{int,MCH} * MPPGLV * \text{poids du ventricule} \quad (1)^{16,17}$$

Le facteur A (MPPGLV) est différent pour chaque échantillon et a été obtenu selon l'équation 2;

*MPPGLV = quantité de protéine des MCH \* volume de reconstitution du culot après extraction des MCH / poids du tissu utilisé pour l'isolation des MCH.*

(2)



### 3.5 Résultats

#### **Influence de la quantité de protéines microsomales et du temps sur l'activité enzymatique des substrats du cocktail #1 dans les microsomes de cœurs humains.**

La figure 1 (A à H) présente les courbes de formation de métabolites en fonction de différents temps d'incubation ou de quantités de protéines microsomales dont la pente représente la vitesse de formation du substrat dans les MCH. La vitesse de réaction d'hydroxylation de tous les substrats du cocktail 1 soit l'ébastine, la chlorzoxazone, et le midazolam est linéaire ( $r^2 > 0,96$ ) pour différentes quantités de protéines microsomales variant de 0.2545 à 0.7635 mg (Figures 1A, 1C, 1G). La vitesse d'hydroxylation du bupropion dans les MCH fût linéaire ( $r^2 = 0,99$ ) pour des quantités de protéines variant de 0.2545 mg à 0.509 mg par incubation (Figure 1E). La vitesse de formation des métabolites hydroxylés dans les MCH suite à des incubations avec le cocktail #1 reste constante ( $r^2 = 0,99$ ) jusqu'à 60 minutes d'incubation pour les substrats ébastine et chlorzoxazone (Figure 1B et 1D). La vitesse de formation de l'hydroxybupropion et de l' $\alpha$ -hydroxymidazolam est non constante jusqu'à 60 minutes d'incubation à 37°C (Figure 1F et 1H).

Les essais de cinétiques enzymatiques ont été effectués avec des quantités de protéines et des temps d'incubation se situant dans la zone de linéarité assurant une vitesse de formation constante.

#### **Évaluation du profil enzymatique d'hydroxylation des substrats ébastine, chlorzoxazone, bupropion et midazolam incubés ensemble (cocktail #1) dans les microsomes de ventricules de cœurs humains (MCH).**

**Hydroxylation de l'ébastine.** La caractérisation du profil d'hydroxylation du substrat marqueur de l'isoenzyme CYP2J2 ébastine dans les MCH a été effectuée en incubant l'ébastine avec le cocktail #1 à différentes concentrations en triplicata [0,75 à 2,5  $\mu$ M] dans la fraction microsomale (~0.68 mg/mL) de 18 échantillons de cœurs explantés (MCH) avec un système régénérateur de NADPH. La figure 2A présente la moyenne de toutes les courbes de chaque échantillon ( $n=18$ ) selon le modèle Michaelis-Menten. La table 1 présente les données de cinétiques enzymatiques ( $K_m$ ,  $V_{max}$  et  $CL_{int}$ ) d'hydroxylation de l'ébastine dans chacun des 18 échantillons de cœurs humains



explantés. Le  $K_m$  et  $V_{max}$  étaient de  $0,21 \pm 0,15 \mu\text{M}$  et de  $2,9 \pm 2,8$  pmoles d'hydroxyébastine / min / mg de protéines, respectivement. La clairance intrinsèque moyenne calculée était de  $15 \mu\text{l} / \text{min} / \text{mg}$  de protéines. Les concentrations incubées d'ébastine en haut de  $1 \mu\text{M}$  ont créé des courbes de cinétique enzymatique représentées par l'équation d'inhibition par le substrat suggérant que la cinétique enzymatique d'hydroxylation de l'ébastine dans les MCH arrive à saturation environ à  $1 \mu\text{M}$  d'ébastine. Une analyse plus poussée de la courbe a été effectuée afin d'évaluer le nombre de composantes enzymatiques impliquées dans l'hydroxylation de l'ébastine dans les MCH. La transformation des données selon le modèle Eadie-Hofstee (avec au moins 4 concentrations) a été effectuée. La figure 2B représente la transformation des données de la figure 2A selon le modèle Eadie-Hofstee. Les points des concentrations 1, 1,5 et 2,5  $\mu\text{M}$  ont été retirés afin de ne pas interférer dans la modélisation de la droite. L'obtention d'une droite suivant le retrait de ces points suggère qu'une seule composante enzymatique soit responsable de l'hydroxylation de l'ébastine dans les MCH. La dernière colonne de la table 1 représente la clairance intrinsèque extrapolée des courbes Eadie-Hofstee pour chacun des 18 échantillons. Ce phénomène est corroboré par la similarité des valeurs de  $CL_{int}$  extrapolées (table 1, colonne 6) *versus* celles calculées à partir des  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues (table 1, colonne 5)

**Hydroxylation de la chlorzoxazone.** L'évaluation du profil d'hydroxylation du substrat chlorzoxazone dans les MCH a été obtenue par des incubations avec le cocktail #1 à différentes concentrations de chlorzoxazone en triplicata [30 à 1000  $\mu\text{M}$ ] dans les mêmes échantillons mentionnés plus haut. La figure 3A illustre la moyenne des courbes ajustées selon l'équation Michaelis-Menten d'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH (n=16). La table 2, section de gauche, présente les paramètres  $K_m$ ,  $V_{max}$  et  $CL_{int}$  d'hydroxylation de la chlorzoxazone de 16 échantillons de cœurs humains explantés. Le  $K_m$  et  $V_{max}$  moyens étaient de  $4086 \pm 4084 \mu\text{M}$  et de  $52 \pm 61$  pmoles d'hydroxyébastine / min / mg de protéines, respectivement. La clairance intrinsèque moyenne calculée équivaut à  $14 \pm 8 \text{ nl} / \text{min} / \text{mg}$  de protéines, soit 1000 fois moins que la  $CL_{int}$  d'ébastine dans les MCH. Les valeurs obtenues sont imprécises compte tenu d'une absence de saturation enzymatique pour des raisons de dissolution de la chlorzoxazone dans le

solvant. La seconde analyse des données avec le modèle Eadie-Hofstee suggère la présence d'une deuxième composante enzymatique. La table 2 présente les paramètres cinétiques des deux composantes enzymatiques. La première composante est caractérisée par un plus grand  $K_m$  et une vitesse maximale moyenne plus petite ( $K_m = 352 \mu\text{M}$ ,  $V_{\max} = 6,4$  pmoles d'OHCZX / min / mg protéines) que la deuxième ( $K_m = 3749 \mu\text{M}$ ,  $V_{\max} = 38,4$  pmoles d'OHCZX / min / mg protéines). La  $CL_{\text{int}}$  moyenne de la première composante d'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH est environ deux fois plus grande que la seconde.

**Hydroxylation du midazolam.** Le midazolam a été incubé avec le cocktail #1 dans les microsomes des 18 ventricules de cœurs humains. L'hydroxylation du midazolam en alpha-hydroxymidazolam était indétectable dans les 18 échantillons. La formation de 4-hydroxylation fût détectée dans un échantillon où l'activité NADPH-dépendante (midazolam =  $5\mu\text{M}$ ) était plus grande que la limite de détection mais moindre que le contrôle effectué sans NADPH (Figure 1A supplémentaire). L'activité observée est de l'ordre du femtomole ( $1^{-15}$ ). Aucune estimation exacte de la cinétique enzymatique n'a pu être extrapolée avec les données obtenues.

**Hydroxylation du bupropion.** Deux des 18 échantillons de MCH testés ont démontré une activité NADPH-dépendante d'hydroxylation du bupropion à la concentration maximale incubée ( $775 \mu\text{M}$ ) d'environ  $0,025$  pmoles d'hydroxybupropion / min / mg protéines (Figure 1B supplémentaire). Une activité moindre mais quantifiable a été détecté dans les contrôles sans NADPH. Aucune estimation exacte de la cinétique enzymatique n'a pu être extrapolée avec les données obtenues.

### **Évaluation de l'inhibition avec anticorps et inhibiteurs chimiques sur l'hydroxylation des substrats du cocktail #1 dans les MCH.**

**Ébastine.** Parmi les inhibiteurs utilisés le N-octylamine, le SKF525 et la métyrapone seul le SKF525 a inhibé, à plus de 40%, l'hydroxylation du substrat ébastine dans la fraction microsomale de ventricule de cœurs humains (MCH). (Figure 4A). Des résultats similaires ont été obtenus avec les HLM. Aucune inhibition n'a été observée lors

d'incubation dans les Supersomes™ exprimant l'isoenzyme humaine rhCYP2J2. Une inhibition du métabolisme de l'ébastine par la N-octylamine a été observée que dans les HLM (Figure 4A). Le méthimazole, inhibiteur non sélectifs des FMOs, n'a pas engendré d'inhibition du métabolisme de l'ébastine dans les rhCYP2J2, MCH et HLM. Le chauffage des différentes matrices enzymatiques (rhCYP2J2, MCH et HLM) à 60°C, 10 minutes avant l'incubation, a complètement inhibé l'hydroxylation du substrat ébastine dans chacune des matrices (Figure 4B). L'utilisation d'un anticorps sélectif envers l'isoenzyme CYP2J2 (gracieuseté du Dr. Darryl C. Zeldin, M.D., NIH) a engendré une diminution d'hydroxylation de l'ébastine dans les MCH et rhCYP2J2 de 9% et de 30%, respectivement (Figure 4C). Finalement, l'inhibition de l'hydroxylation du substrat ébastine a été abolie à plus de 90% dans les MCH de façon concentration-dépendante par les substrats compétitifs astémizole ( $IC_{50, MCH} = 20\mu M$ ) et terfénadine ( $IC_{50, MCH} = 12\mu M$ ) (Figure 4D et 4E). Les mêmes essais avec les rhCYP2J2 ont confirmé le potentiel d'inhibition de l'astémizole et de la terfénadine.

**Chlorzoxazone.** L'hydroxylation de la chlorzoxazone avec les rhCYP2E1 a été inhibée de façon significative par les inhibiteurs non sélectifs des CYP450s; métyrapone (50%) et N-octylamine (75%), ainsi que par l'anticorps sélectif envers la protéine CYP2E1 humaine (50%) et le 4-méthylpyrazole, inhibiteur sélectif des CYP2E1 (84%). L'inhibiteur non sélectif des CYP450 SKS525 n'a pas inhibé de manière significative l'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH (Figure 5A). Les MCH chauffés à 60°C et 90°C d'un échantillon humain, d'une durée de 10 minutes avant incubation n'a pas inhibé l'hydroxylation du substrat chlorzoxazone comparativement à l'activité obtenu à 37°C (Figure 5B). L'anticorps ciblant l'activité de l'isoenzyme humaine CYP2E1 incubé dans 5 cœurs différents n'a pas inhibé l'hydroxylation de la chlorzoxazone à l'exception d'un cœur à environ 60% (Figure 5C). Ce même cœur incubé avec un anticorps inhibant l'activité de l'isoenzyme humaine CYP1A1 a permis de diminuer l'hydroxylation de la chlorzoxazone à plus de 85% (Figure 5D) tandis que l'inhibiteur anti-CYP1A2 n'a eu aucun impact sur le métabolisme de la chlorzoxazone (Figure 5E). La N-octylamine, inhibiteur non sélectif des CYP450s, a permis une réduction de métabolisme d'environ 30% chez 5 des 6 échantillons de cœurs humains

testés (Figure 5 F). Ce résultat est associé à l'excès (> 0,5%) de solvant utilisé dans l'incubation confirmant la sensibilité du métabolisme de la chlorzoxazone aux solvants organiques dans les MCH (Figure G). L'inhibiteur non sélectif des CYP450s, SKF525 (100 µM) dissout dans l'eau, a inhibé à plus de 60% l'hydroxylation de la chlorzoxazone dans un échantillon de cœur humain (Figure 5H). Finalement, l'utilisation de l'inhibiteur chimique 4-méthylpyrazole, sélectif contre le CYP2E1, a inhibé de façon très variable l'hydroxylation de la chlorzoxazone dans 8 cœurs différents (0 à 60 %) (Figure 5I).

**Extrapolation *In vitro/In vivo* : prédiction mécanistique de la clairance intrinsèque du ventricule de cœurs humains à partir de la clairance intrinsèque des MCH de l'ébastine et de la chlorzoxazone.**

Les tables 3A et B présentent l'extrapolation de la clairance intrinsèque *in vivo* du ventricule gauche ( $CL_{int,vg}$ ) du substrat ébastine et chlorzoxazone à partir de la clairance intrinsèque *in vitro* calculée dans les MCH.

La clairance intrinsèque de l'hydroxylation de l'ébastine extrapolée à l'échelle du ventricule gauche varie de 2,6 à 56,3 ml/min ( $\bar{x}$  16,7 ± 14,2) chez les 18 échantillons de cœurs testés (Table 3A).

Dans les HLM, les essais *in vitro* obtenus démontrent que le substrat ébastine suit une cinétique à deux composantes enzymatiques (Figure supplémentaire 2A et 2B). La représentation graphique Eadie-Hofstee a permis de calculer deux clairances intrinsèques associées à l'hydroxylation de l'ébastine dans un pool commercial de HLM (composante 1; 132 µL/min/mg de protéines, composante 2; 24 µL/min/mg de protéines. Les deux composantes enzymatiques extrapolées à l'échelle *in vivo* du foie sont de 7207 ml/min et 1310 ml/min pour les deux composantes respectives (Table 3A). Les données obtenues estiment la contribution de la voie métabolique d'hydroxylation de l'ébastine par le ventricule gauche à 0,23% et 1,27% des composantes 1 et 2 du foie humain. La contribution du ventricule gauche humain à la clairance totale du substrat ébastine pourrait être estimée en introduisant les données de  $CL_{int,vg}$  dans une modèle de

pharmacocinétique-physiologique afin d'estimer les variations de concentrations locales selon la clairance extrapolée du ventricule gauche.

La table 3B présente les prédictions de clairances intrinsèques associée à l'hydroxylation de la chlorzoxazone. La clairance intrinsèque d'hydroxylation de la chlorzoxazone pour le ventricule gauche humain extrapolée à l'échelle *in vivo* varie de 0,007 à 0,052 ml/min ( $\bar{x}$  0,022  $\pm$  0,012) soit environ 4000 fois plus petite que celle extrapolée pour le foie humain étant de 2020 ml/min. Malgré que l'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH est NADPH-dépendante, la contribution du ventricule au niveau de la clairance locale de la chlorzoxazone est faible, voire négligeable. L'extrapolation de la  $CL_{int,vg}$  à partir du systèmes d'enzyme recombinant n'a pu être effectuée compte tenu que l'abondance (pmole / mg de protéine) du CYP2J2 et CYP2E1 dans le ventricule de cœur humain est inconnue.

### 3.6 Discussion

L'objectif de ce projet était de caractériser le profil d'activité complet médié par les isoenzymes CYP2J2, 2E1, 2B6 et 3A5 préalablement démontrées comme étant être exprimées et actives dans le tissu ventriculaire cardiaque à l'aide de substrats sélectifs envers chacune d'elles.<sup>12</sup> Les résultats obtenus démontrent que la fraction microsomale du tissu ventriculaire cardiaque humain (MCH) est dotée, de façon variable, d'une activité enzymatique d'hydroxylation envers les substrats ébastine et chlorzoxazone. Le profil d'hydroxylation du substrat ébastine dans les MCH est saturable, NADPH-dépendant, sensible à la chaleur et inhibé de façon compétitive par les deux substrats marqueurs de l'isoenzyme CYP2J2 astémizole<sup>18</sup> et terféndine<sup>19,20</sup> suggérant la contribution majoritaire de l'isoenzyme CYP2J2. La formation du métabolite 6'-hydroxychlorzoxazone dans les MCH est un processus NADPH-dépendant, non-saturé, résistant à la chaleur impliquant au moins deux sources (composantes) enzymatiques avec des paramètres de cinétiques enzymatiques différents. Nos résultats suggèrent que la composante avec la plus grande capacité métabolique ( $CL_{int,MCH}$ ) serait attribuable au CYP2E1. Par contre, aucun essai d'inhibition effectué avec des chimiques ou des anticorps n'a pu être imputé au CYP2E1. Quant aux substrats bupropion et midazolam, ils sont hydroxylés par un mécanisme enzymatique NADPH-dépendant et indépendant. L'activité métabolique observée est très faible de 10 à 100 fois moins active comparativement aux substrats ébastine et chlorzoxazone limitant l'obtention de paramètres décrivant une cinétique enzymatique complète. De plus, le comportement enzymatique microsomal envers le bupropion et le midazolam n'a pas pu être attribué au CYP2B6 ou 3A5, respectivement ciblés par ces substrats. Aucune conclusion n'est obtenue quant à la source enzymatique responsable de leur hydroxylation et davantage de recherches devront être effectuées afin d'obtenir un profil complet des enzymes responsables du métabolisme de ces substrats dans les MCH.

Le cocktail #1 a permis d'explorer l'activité de 4 substrats co-incubés dans 18 échantillons différents de cœurs humains permettant d'optimiser la quantité de données obtenues avec des tissus inaccessibles ou disponibles qu'en quantités limitées tel que le tissu de ventricule de cœurs humains explantés. L'hydroxylation du substrat ébastine

dans les MCH est saturable et suit une cinétique Michaelis-Menten jusqu'à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  (469 ng/mL) à partir de laquelle l'aspect de la courbe se modifie selon le modèle d'inhibition par le substrat'. Les concentrations moyennes plasmatiques de l'ébastine chez la personne en bonne santé sont d'environ 0.023  $\mu\text{M}$  (10,7 ng/mL)<sup>21</sup> pouvant atteindre des maximum à 0,07  $\mu\text{M}$  (32 ng /mL).<sup>22</sup> L'étendue des concentrations utilisées se rapprochent des concentrations observées en clinique (0,075 à 2,5  $\mu\text{M}$ ). La plus faible concentration d'ébastine incubée (0,075  $\mu\text{M}$ ) donne une quantité de métabolites formés au minimum 7 fois plus élevée que la limite de quantification par LC-MSMS. La technique analytique ne limiterait donc pas l'analyse d'incubations effectuées à des concentrations retrouvées en clinique 2 fois moins grandes.

La capacité enzymatique envers l'ébastine à des concentrations se rapprochant de celles observées dans le plasma confirme la participation possible à l'élimination locale du substrat ébastine au niveau cardiaque. Le  $K_m$  moyen obtenu avec les MCH était de  $0,21 \pm 0,15 \mu\text{M}$ , CV = 71% avec une vitesse catalytique moyenne de  $2,9 \pm 2,7 \text{ pmol/min/mg}$  de protéines (CV = 94%) y découlant une clairance intrinsèque microsomale hautement efficace ( $CL_{\text{int}} = 15 \pm 10 \mu\text{L/min/mg}$  de protéines, CV= 69%) du même ordre que celle obtenue dans un pool de microsomes de foies humains ( $CL_{\text{int}} = 26,2 \mu\text{L/min/mg}$  de protéines). La très grande variabilité observée pour chacun des paramètres cinétiques démontrent que la capacité enzymatique envers le substrat ébastine, marqueur du CYP2J2, est régulée différemment pour chacun des individus. Des facteurs intrinsèques ou extrinsèques peuvent moduler l'expression ou l'activité du processus enzymatique dépendant du CYP2J2 localement dans le cœur humain suggérant que la clairance de molécule endogènes circulantes localement et métabolisées par le CYP2J2 serait elle aussi sujette à une variabilité interindividuelle tel qu'observée dans le foie.<sup>23</sup>

Les paramètres cinétiques  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$  et  $CL_{\text{int}}$  dérivés des profils de formation de l'hydroxychlorzoxazone dans les MCH modélisés par l'équation Michaelis-Menten suggèrent un processus métabolique hautement variable avec une  $K_m$  d'environ 4086  $\mu\text{M}$ , CV = 100% (suggérant une faible affinité) et un  $V_{\text{max}}$  d'environ 52 pmol/min/mg de protéines, CV = 118%. La clairance intrinsèque d'hydroxylation de la chlorzoxazone

( $CL_{int} \sim 13,8$  nl/min/mg de protéines, CV = 61%) combinée à la très grande concentration de substrat étant nécessaire pour atteindre la vitesse maximale d'hydroxylation ( $> 1000 \mu\text{M}$ ) exprime un rendement catalytique inefficace. D'ailleurs, une concentration moyenne dans le plasma humain équivalente à la constante d'affinité de  $3701 \mu\text{M}$  ( $628 \mu\text{g/ml}$ ) ne serait jamais atteinte chez l'humain considérant que le  $C_{max}$  d'une dose moyenne de 400 mg est  $44 \mu\text{M}$  ( $7.15 \mu\text{g/ml}$ ).<sup>24</sup> Il serait très difficile d'atteindre une saturation enzymatique des processus métaboliques impliqués dans l'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH pour cause de sa solubilité.

L'incapacité d'atteindre la saturation enzymatique suggère l'implication de plusieurs composantes enzymatiques lors de la transformation des données selon le modèle Eadie-Hofstee. Ce modèle est parfois utilisé à des fins d'observation de composantes enzymatiques. L'analyse des résultats obtenus pour la chlorzoxazone suggère qu'au moins deux différentes composantes cinétiques sont impliquées dans l'hydroxylation de la chlorzoxazone.<sup>25-28</sup> Nous avons conséquemment à la première analyse transformée les données obtenues avec le modèle Eadie-Hofstee. L'analyse illustre clairement une cinétique à au moins deux composantes enzymatiques dont la première est présente une vitesse maximale moyenne d'environ  $6,4$  pmol/min/mg de protéines (CV = 122%) et un  $K_m$  d'environ  $352 \mu\text{M}$  (CV = 131%) engendrant naturellement une clairance intrinsèque plus grande ( $CL_{int} \sim 42$  nl/min/mg de protéines, CV = 65%). La deuxième composante, à l'inverse de la première s'illustre avec une vitesse maximale moyenne supérieure ( $V_{max} \sim 38$  pmol/min/mg de protéines, CV = 69%) jumelée à un  $K_m$  plus élevé ( $K_m \sim 3749 \mu\text{M}$ , CV = 86%) générant une clairance intrinsèque deux fois plus petite et similaire à celle estimée par le modèle Michaelis-Menten ( $CL_{int} \sim 14,1$  nl/min/mg de protéines, CV = 67%). L'usage du modèle Eadie-Hofstee est approprié pour expliquer une activité enzymatique non saturée par le modèle Michaelis-Menten tel qu'obtenue avec le substrat chlorzoxazone. La première composante enzymatique suggère un processus dérivé de l'isoenzyme CYP2E1 compte tenu que le  $K_m$  ( $352 \mu\text{M}$ ) est du même ordre que celui obtenu dans les rhCYP2E1 ( $K_m = 212 \mu\text{M}$ ) (Chapitre 2). Il fût démontré que l'hydroxylation de la chlorzoxazone variait aussi dans les microsomes de cerveau.<sup>29</sup> En plus d'être variable dans les différentes régions du cerveau, l'activité est 1000 fois plus



petite que dans le cœur ( $V_{\text{vélocité}_{\text{cerveau}}} = 0,083^{29}$  versus  $V_{\text{vélocité}_{\text{cœur}}} 67$  pmoles d'OHCZX / min / mg protéines) après une incubation de chlorzoxazone d'environ 500  $\mu\text{M}$  avec un système régénérateur NADPH. La source enzymatique du métabolisme de la chlorzoxazone dans le cerveau a été démontrée être majoritairement provenir de l'isoenzyme CYP2E1 suite à un test d'inhibition avec un anticorps dirigé contre celle-ci.<sup>29</sup> Il n'est pas inexact de penser que cette inhibition aurait pu être différente avec un échantillon plus large tel qu'observé dans notre étude. La présence d'autres composantes enzymatiques empêche d'obtenir des détails sur le profil associé à l'isoenzyme CYP2E1 (composante 1). Des études futures seraient nécessaires afin de déterminer les enzymes responsables de chacune de composantes enzymatiques impliquées dans la formation d'hydroxychlorzoxazone.

L'étude des réactions d'hydroxylation de substrats sélectifs envers des isoenzymes du CYP450 reconnus être exprimées dans les MCH était ciblée pour caractériser leur implication métabolique (ébastine – CYP2J2, chlorzoxazone – CYP2E1, bupropion – CYP2B6 et midazolam – CYP3A5). Selon nos résultats, il est possible de suggérer que certains groupes d'enzymes sont plus susceptibles d'être impliqués que d'autres dans l'hydroxylation des substrats utilisés. L'activité NADPH-dépendante observée pour tous les substrats dans la fraction sous-cellulaire microsomale suggère que la source enzymatique pourrait provenir de la famille des enzymes CYP450s et/ou FMOs.<sup>30,31</sup> Le complexe enzymatique CYP450 regroupe l'enzyme CYP450 et la co-enzyme CYP450 réductase composée de deux domaines (FAD et FMN) autour desquelles gravitent les cofacteurs NADPH et le dioxygène.<sup>32</sup> Le cofacteur NADPH est réduit par la CYP450 réductase permettant le transfert d'un électron de la CYP450 réductase à l'isoenzyme CYP450.<sup>32</sup> De la même manière, les flavines monooxygénase (FMO) sont aussi dotées d'une capacité oxydoréductrice de par la coopération de leur coenzyme associée l'oxydoréducteur FAD (flavine adénine dinucléotide) et se retrouvent, elles aussi, ancrées à la membrane lipidique du réticulum endoplasmique.<sup>33</sup> En plus de la dépendance au cofacteur NADPH, les métabolites formés sont caractéristique d'une réaction d'hydroxylation par les CYP450 versus les FMO.

L'ébastine n'est pas métabolisé par les FMO et l'hydroxylation de l'hydrocarbure (CH) en position 6 de la chlorzoxazone est un type de réaction chimique caractéristique des CYP450 tandis que les FMO sont plus enclines à catalyser une N-, S- ou P-oxydation.<sup>11,34</sup> Un autre moyen simple pour discerner entre les FMO ou les CYP450 est l'utilisation d'un inhibiteur sélectif des FMO, le méthimazole.<sup>33</sup> Compte tenu qu'aucune inhibition d'activité dans les MCH n'a été observée avec cet inhibiteur, l'implication des FMO dans l'hydroxylation de la chlorzoxazone ou de l'ébastine peut être écartée. D'autres enzymes sont capables de réactions oxydatives telles que les monoamines oxydases (MAO), les déshydrogénases (DHO) et les xanthines oxydases (XO).<sup>7,35</sup> Leur implication dans le métabolisme des substrats utilisés est exclue car ces systèmes se situent dans le cytosol ou dans la membrane des mitochondries et non dans la fraction microsomale utilisée. Les enzymes de la famille des aldo-kéto réductases (AKR) ont une capacité oxydoréductrice préférant le NADPH comme cofacteur dont les sous-familles fonctionnelles chez l'humain se retrouvent majoritairement dans le cytosol et non dans les microsomes.<sup>36</sup>

La cinétique d'hydroxylation de l'ébastine par les MCH selon le modèle Eadie-Hosftee suggère l'implication d'une seule composante enzymatique. D'ailleurs, les expériences d'inhibition ont permis de proposer que la composante enzymatique est l'isoenzyme CYP2J2. Tout d'abord, l'ajout de 100  $\mu$ M de SKF-525, inhibiteur non sélectif pour les CYP450s, a permis de diminuer la formation d'hydroxyébastine de 40% de façon similaire à l'inhibition de 54% observée dans un pool de microsomes de foie humain. Les essais de chauffage des microsomes à 60°C ayant complètement abolie la formation du métabolite hydroxylé de l'ébastine suggèrent une source enzymatique inactivée par la chaleur.<sup>37</sup> Finalement, la terfénadine<sup>20,38</sup> et l'astémizole<sup>18</sup> deux substrats sélectifs de l'isoenzyme CYP2J2 ont été utilisés comme inhibiteurs compétitifs de l'hydroxylation de l'ébastine. Les essais d'inhibition d'IC<sub>50</sub> avec la terfénadine et l'astémizole ont réduit à moins de 10% l'activité résiduelle à des concentrations de 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M, respectivement. La concentration nécessaire de chacun pour inhiber 50% la formation d'hydroxyébastine fût de 12  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> terfénadine) et de 20  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> astémizole). Ces résultats démontrent l'implication de l'isoenzyme CYP2J2 dans l'hydroxylation du

substrat ébastine, marqueur du CYP2J2. Pour la première fois l'association entre le métabolisme oxydatif du substrat ébastine par la fraction microsomale du ventricule de cœurs humains et l'isoenzyme CYP2J2 est établie.

La participation de l'isoenzyme CYP2E1 dans l'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH fût moins concluante. Nous avons préalablement établi que d'autres isoformes ont la capacité d'hydroxyler la chlorzoxazone dont le CYP1A1 et CYP1A2 à plus de 42% et 16 % malgré le fait que la chlorzoxazone est reconnue depuis plus de 25 ans comme un substrat sélectif du CYP2E1.<sup>39-41</sup> Nous avons aussi démontré que l'ARNmessager de cette isoenzyme se retrouve de façon variable dans les microsomes de tissu ventriculaire cardiaque humain.<sup>12</sup> Afin de déterminer l'implication des différentes isoenzymes, l'ajout de l'inhibiteur sélectif envers l'isoenzyme CYP2E1, le 4-méthylpyrazole<sup>42</sup>, n'a pas engendré d'inhibition de l'activité enzymatique pour 7 différents échantillons mis à part pour un échantillon où celle-ci a diminué d'environ 60%. Pour ce même échantillon, des incubations avec un anticorps dirigée contre l'isoenzyme CYP1A1 a diminuée l'hydroxylation de la chlorzoxazone de 15% tandis qu'aucune inhibition par l'anticorps CYP1A2 chez un autre individu n'a pas été observée. Le chauffage des microsomes à 60°C et 90°C, 10 minutes avant l'incubation n'a pas permis d'inactiver l'activité enzymatique d'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH. Ces résultats ne permettent pas d'établir hors de tout doute la contribution de l'isoenzyme CYP2E1, 1A1 ou 1A2 dans l'hydroxylation de la chlorzoxazone par la fraction microsomale ventriculaire cardiaque humaine. Par contre, la réaction enzymatique reste un processus enzymatique NADPH dépendant suggérant la participation d'autres enzymes dotées d'une capacité d'hydroxylation NADPH-dépendante et insensible à la chaleur. Des études plus approfondies seraient nécessaires afin de s'assurer de la contribution relative des enzymes impliquées. Un défi de taille compte tenu de la très grande variabilité interindividuelle que démontre le profil d'hydroxylation atypique de la chlorzoxazone entre différents les patients.

Finalement, les données de clairance intrinsèque d'hydroxylation du substrat ébastine et chlorzoxazone obtenue *in vitro* ( $CL_{int,MCH}$ ) ont été extrapolées *in vivo* afin d'obtenir une

clairance intrinsèque ventriculaire gauche ( $CL_{int,vg}$ ).<sup>43</sup> La  $CL_{int,vg}$  a été comparée à celle du foie ( $CL_{int,foie}$ ) et la contribution réelle du métabolisme cardiaque extrahépatique dans la clairance de ces substrats a pu être mis en perspective à l'échelle *in vivo*.<sup>25</sup> Il est connue que le paramètre de clairance est beaucoup plus distinctif d'une cinétique enzymatique que les paramètres de base  $K_m$  et  $V_{max}$ . L'extrapolation des données *in vitro* de clairance intrinsèque calculée pour différents échantillons de ventricule a été effectuée selon la technique décrite dans l'ouvrage de Proctor *et al.*<sup>44</sup> La quantité de protéines microsomales par gramme de tissu est en moyenne de 3 mg/g comparativement au foie ou en moyenne elle est rapportée être de 30 mg/g.<sup>16,17</sup> La valeur de clairance intrinsèque *in vivo* extrapolée ( $CL_{int,vg}$ ) s'applique à tous les processus enzymatiques impliqués dans la clairance métabolique du substrat ébastine. Compte tenu que nos résultats suggèrent que le CYP2J2 soit l'enzyme majoritairement responsable du processus d'hydroxylation de l'ébastine dans le ventricule gauche, la clairance intrinsèque extrapolée *in vivo* pour le ventricule gauche est suggérée refléter celle que du CYP2J2.

Ultimement, la clairance intrinsèque du ventricule peut être introduite dans l'équation du modèle '*well-stirred*' et permettre d'évaluer la contribution métabolique de l'organe à la clairance totale du tissu ( $CL_{vg}$ ) pour simuler les concentrations locales de l'ébastine en fonction du débit sanguin coronarien et de la fraction libre dans le plasma.<sup>45</sup> De façon simple, l'utilisation du modèle '*well-stirred*' permet d'intégrer la clairance intrinsèque extrapolée à l'échelle *in vivo*, i.e., pour l'organe entier, qui dans notre cas est la clairance du ventricule et de la comparer au débit de la circulation coronarienne. Cela indique si l'élimination est débit- ou enzyme-dépendante. La clairance intrinsèque ( $CL_{int,vg}$ ) extrapolée pour le ventricule gauche est d'environ 17 mL/min. Le débit de la circulation coronarienne est de 280 mL/min<sup>46</sup>. Il est ainsi clair que selon le modèle '*well-stirred*', la clairance extrahépatique du ventricule est limitée par le processus enzymatique ( $CL_{vg} = CL_{int,vg} * f_u$ ) car le débit coronarien est beaucoup plus grand que la clairance intrinsèque. Ceci suggère ainsi que l'hydroxylation du substrat ébastine dans le ventricule de cœur humain dépend majoritairement de la vitesse d'hydroxylation par le CYP2J2. Une variation dans la clairance métabolique du substrat ébastine au niveau ventriculaire

pourrait contribuer à faire fluctuer les concentrations intracellulaires locales du médicament en affectant la clairance total du ventricule ( $CL_{vg}$ ). Pour la première fois, un lien entre les données *in vitro* et l'implication du ventricule gauche dans la clairance métabolique est établie et suggère que le ventricule gauche participe à la clairance locale de l'ébastine et ce de façon enzyme-dépendante pour les substrats hautement métabolisés. Malgré que le foie possède une capacité beaucoup plus grande que le ventricule à métaboliser le substrat ébastine (2860 mL/min), sa distribution au niveau cardiaque est gérée différemment qu'au niveau hépatique. Lorsque distribué dans les cellules endothéliales et dans les cardiomyocytes, ce sont les mécanismes de transports et enzymatiques locaux qui peuvent contrôler le devenir de l'ébastine se rendant au cœur. Nos résultats peuvent s'appliquer à plusieurs substrats, dont la terfénadine ainsi que l'astémizole, deux substrats de l'isoenzyme CYP2J2.

L'extrapolation *in vitro/in vivo* de la clairance associée à l'hydroxylation chlorzoxazone dans la fraction microsomale cardiaque est en moyenne 0,02 ml/min. La capacité globale des microsomes de cœurs humains d'hydroxyler le substrat chlorzoxazone est négligeable dans un contexte de clairance métabolique comparativement à la clairance intrinsèque extrapolée ( $CL_{int,vg}$ ) pour le foie qui varie de 1640-9610 ml/min.<sup>41</sup> Malgré la faible participation globale à la clairance de la chlorzoxazone par le ventricule humain, l'activité observée est décrite par plusieurs composantes enzymatiques et la contribution locale sur de faibles concentrations reste à être démontrée.

En conclusion, nous avons observé une grande variabilité entre les différents individus étudiés du fait que la clairance intrinsèque du métabolisme de l'ébastine dans les MCH varie de 1,4 à 38  $\mu$ l/min/mg de protéines avec un coefficient de variation de plus de 69 %. Les causes de la variabilité interindividuelle observée pour chaque échantillon seront étudiées dans le prochain chapitre. Nos travaux démontrent que la fraction microsomale du ventricule gauche de cœurs humains est dotée d'une activité métabolique impliquant une composante enzymatique dans l'hydroxylation du substrat ébastine dont l'isoenzyme CYP2J2 est suggérée comme la principale responsable. En contrepartie, l'hydroxylation de la chlorzoxazone n'a pas été démontrée être dépendante de

l'isoenzyme CYP2E1. L'hydroxylation du substrat chlorzoxazone est d'ailleurs décrite par au moins deux composantes enzymatiques. Les résultats mitigés et fortement variables nécessitent des études métaboliques plus approfondies afin d'établir la source enzymatique qui pour l'instant est reconnue comme étant NADPH-dépendante, résistante à la chaleur et capable de transformer la chlorzoxazone en un métabolite hydroxylé. Les données *in vitro* de clairance intrinsèque extrapolées *in vivo* au niveau du ventricule démontre pour la première fois que le ventricule gauche a une capacité métabolique non négligeable dans l'élimination métabolique du substrat ébastine au niveau locale. Ces données pourront servir d'outil dans l'élaboration de modèle de prédiction de la pharmacocinétique et pharmacodynamie de substrats du CYP2J2 au niveau extrahépatique.

### 3.7 Références

1. Doogue, M.P. & Polasek, T.M. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Therapeutic Advances in Drug Safety* **4**, 5-7 (2013).
2. Chiu, J.-J. & Chien, S. *Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives*, Vol. 91 (2011).
3. Wu, B. *et al.* Endocardial Cells Form the Coronary Arteries by Angiogenesis through Myocardial-Endocardial VEGF Signaling. *Cell* **151**, 1083-1096.
4. Tirziu, D., Giordano, F.J. & Simons, M. Cell Communications in the Heart. *Circulation* **122**, 928-937 (2010).
5. Sasabe, H., Kato, Y., Suzuki, T., Itose, M., Miyamoto, G. & Sugiyama, Y. Differential Involvement of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 and P-Glycoprotein in Tissue Distribution and Excretion of Grepafloxacin in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 648-655 (2004).
6. Couture, L., Nash, J.A. & Turgeon, J. The ATP-Binding Cassette Transporters and Their Implication in Drug Disposition: A Special Look at the Heart. *Pharmacol. Rev.* **58**, 244-258 (2006).
7. Mitchell, S.C. Flavin mono-oxygenase (FMO)--the 'other' oxidase. *Current drug metabolism* **9**, 280-284 (2008).
8. Guengerich, F.P. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* **266**, 10019-10022 (1991).
9. DeLozier, T.C. *et al.* Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 682-688 (2007).
10. Evangelista, E.A., Kaspera, R., Mokadam, N.A., Jones, J.P. & Totah, R.A. Activity, Inhibition, and Induction of Cytochrome P450 2J2 in Adult Human Primary Cardiomyocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **41**, 2087-2094 (2013).
11. Ortiz de Montellano, P.R. Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **110**, 932 (2010).
12. Michaud, V., Frappier, M., Dumas, M.-C. & Turgeon, J. Metabolic Activity and mRNA Levels of Human Cardiac CYP450s Involved in Drug Metabolism. *PLoS One* **5**, e15666 (2010).
13. Larsen, B.T. *et al.* Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BKCa channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition, Vol. 290 (2006).
14. Motulsky, H. *Intuitive Biostatistics.* , New York, 1995. No. of pages: xxi+386. Price: \$26. ISBN 0-1950-8607-4. 1 edn. (Oxford University Press, USA 1998).
15. RACKLEY, C.E., DODGE, H.T., COBLE, Y.D. & HAY, R.E. A Method for Determining Left Ventricular Mass in Man. *Circulation* **29**, 666-671 (1964).
16. Rostami-Hodjegan, A. & Tucker, G.T. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 140-148 (2007).
17. Chen, Y., Liu, L., Nguyen, K. & Fretland, A.J. Utility of Intersystem Extrapolation Factors in Early Reaction Phenotyping and the Quantitative Extrapolation of Human Liver Microsomal Intrinsic Clearance Using

- Recombinant Cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition* **39**, 373-382 (2011).
18. Matsumoto, S., Hiramata, T., Matsubara, T., Nagata, K. & Yamazoe, Y. Involvement of CYP2J2 on the Intestinal First-Pass Metabolism of Antihistamine Drug, Astemizole. *Drug Metabolism and Disposition* **30**, 1240-1245 (2002).
  19. Lafite, P. *et al.* Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2777-2780 (2006).
  20. Lafite, P., Dijols, S., Zeldin, D.C., Dansette, P.M. & Mansuy, D. Selective, competitive and mechanism-based inhibitors of human cytochrome P450 2J2. *Arch. Biochem. Biophys.* **464**, 155-168 (2007).
  21. Lasseter, K., Dilzer, S., Vargas, R., Waldman, S. & Noveck, R. Pharmacokinetics and Safety of Ebastine in Patients with Impaired Hepatic Function Compared with Healthy Volunteers. *Clin. Pharmacokinet.* **43**, 121-129 (2004).
  22. Baek, S., Park, S., Jang, Y.-j., Lim, M. & Kang, W. Effect of Telmisartan on the Pharmacokinetics of Ebastine. *Korean Journal of Clinical Pharmacy* **23**, 322-326 (2013).
  23. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 414-423 (1994).
  24. Prompila, N., Wittayalertpanya, S. & Komolmit, P. A study on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in healthy Thai volunteers. *J. Med. Assoc. Thai.* **90**, 160-166 (2007).
  25. Venkatakrisnan, K., von Moltke, L.L. & Greenblatt, D.J. Human Drug Metabolism and the Cytochromes P450: Application and Relevance of In Vitro Models. *The Journal of Clinical Pharmacology* **41**, 1149-1179 (2001).
  26. Sakurai, E., Sakurada, T., Ochiai, Y., Yamakami, J. & Tanaka, Y. *Stereoselective transport of histidine in rat lung microvascular endothelial cells*, Vol. 282 (2002).
  27. Court, M.H., Duan, S.X., Hesse, L.M., Venkatakrisnan, K. & Greenblatt, D.J. Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology* **94**, 110-119 (2001).
  28. Takenaga, N., Hasegawa, T., Ishii, M., Ishizaki, H., Hata, S. & Kamei, T. In Vitro Metabolism of a New Anticancer Agent, 6-N-formylamino-12,13-dihydro-1,11-dihydroxy-13-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)5H-indolo [2,3-a]pyrrolo [3,4-c]carbazole-5,7(6H)-dione (NB-506), in Mice, Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metabolism and Disposition* **27**, 213-220 (1999).
  29. Upadhyaya, S.C., Tirumalai, P.S., Boyd, M.R., Mori, T. & Ravindranath, V. Cytochrome P4502E (CYP2E) in Brain: Constitutive Expression, Induction by Ethanol and Localization by Fluorescence in Situ Hybridization. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 23-34 (2000).
  30. Voznesensky, A.I. & Schenkman, J.B. The cytochrome P450 2B4-NADPH cytochrome P450 reductase electron transfer complex is not formed by charge-pairing. *J. Biol. Chem.* **267**, 14669-14676 (1992).

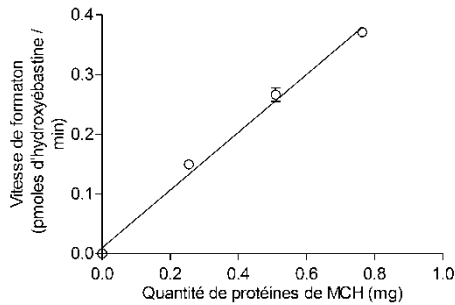


31. Cashman, J.R. Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 599-604 (2005).
32. Guengerich, F.P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70-83 (2008).
33. Krueger, S.K. & Williams, D.E. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **106**, 357-387 (2005).
34. Grothusen, A., Hardt, J., Bräutigam, L., Lang, D. & Böcker, R. A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Arch. Toxicol.* **71**, 64-71 (1996).
35. Kennedy, E.P. & Lehninger, A.L. INTRACELLULAR STRUCTURES AND THE FATTY ACID OXIDASE SYSTEM OF RAT LIVER. *J. Biol. Chem.* **172**, 847-848 (1948).
36. Barski, O.A., Tipparaju, S.M. & Bhatnagar, A. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug Metab. Rev.* **40**, 553-624 (2008).
37. Person, R.E., Chen, H., Fantel, A.G. & Juchau, M.R. Enzymic catalysis of the accumulation of acetaldehyde from ethanol in human prenatal cephalic tissues: evaluation of the relative contributions of CYP2E1, alcohol dehydrogenase, and catalase/peroxidases. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **24**, 1433-1442 (2000).
38. Liu, K.-H. *et al.* Characterization of Ebastine, Hydroxyebastine, and Carebastine Metabolism by Human Liver Microsomes and Expressed Cytochrome P450 Enzymes: Major Roles for CYP2J2 and CYP3A. *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 1793-1797 (2006).
39. Peter, R., Bocker, R., Beaune, P.H., Iwasaki, M., Guengerich, F.P. & Yang, C.S. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 566-573 (1990).
40. Koop, D.R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *The FASEB Journal* **6**, 724-730 (1992).
41. Draper, A.J., Madan, A., Latham, J. & Parkinson, A. Development of a Non-High Pressure Liquid Chromatography Assay to Determine [<sup>14</sup>C]Chlorzoxazone 6-Hydroxylase (CYP2E1) Activity in Human Liver Microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **26**, 305-312 (1998).
42. Hartman, J.H., Boysen, G. & Miller, G.P. CYP2E1 Metabolism of Styrene Involves Allostery. *Drug Metabolism and Disposition* **40**, 1976-1983 (2012).
43. Venkatakrisnan, K., von Moltke, L.L., Court, M.H., Harmatz, J.S., Crespi, C.L. & Greenblatt, D.J. Comparison between Cytochrome P450 (CYP) Content and Relative Activity Approaches to Scaling from cDNA-Expressed CYPs to Human Liver Microsomes: Ratios of Accessory Proteins as Sources of Discrepancies between the Approaches. *Drug Metabolism and Disposition* **28**, 1493-1504 (2000).
44. Proctor, N.J., Tucker, G.T. & Rostami-Hodjegan, A. Predicting drug clearance from recombinantly expressed CYPs: intersystem extrapolation factors. *Xenobiotica* **34**, 151-178 (2004).

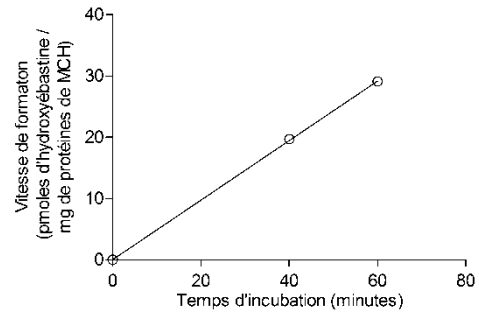
45. Nagilla, R., Frank, K.A., Jolivette, L.J. & Ward, K.W. Investigation of the utility of published in vitro intrinsic clearance data for prediction of in vivo clearance. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **53**, 106-116 (2006).
46. Caru, B., Colombo, E., Santoro, F., Laporta, A. & Maslowsky, F. Regional flow responses to exercise. *Chest* **101**, 223s-225s (1992).

**Figure 1. Conditions de linéarité en fonction de la quantité de protéine et du temps d'incubation dans l'échantillon #21 de microsomes de cœur humain avec le cocktail 1 (Ébastine, chlorzoxazone, bupropion et midazolam)**

**1A.**

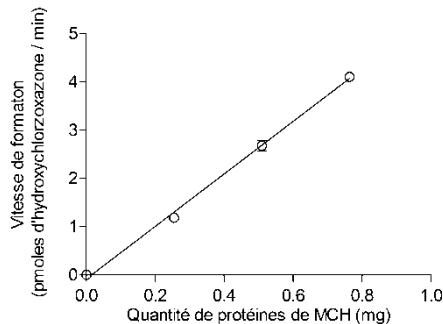


**1B.**

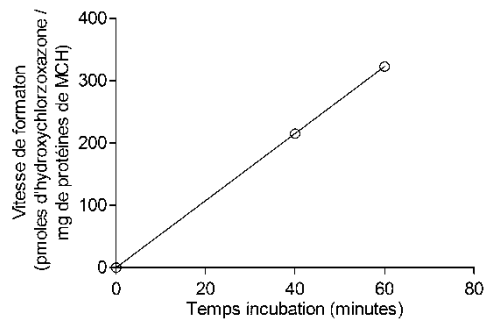


**Figure 1A et 1B. Conditions de linéarité du substrat ébastine dans l'échantillon microsomal de cœur humain (MCH#21)** **1A.** Conditions de linéarité en fonction de la quantité de protéines de MCH (incubation de 60 minutes). **1B.** Conditions de linéarité en fonction du temps d'incubation (quantité de protéines : 0.7635 mg). Les incubations ont été effectuées à 15  $\mu$ M d'ébastine dans un tampon 100 mM PO<sub>4</sub>. La formation d'hydroxyébastine est linéaire pour un intervalle de 0.2545 à 0.7635 mg de protéines de MCH ( $r^2$  0.99) et pour un intervalle de 0 à 60 minutes ( $r^2$  0.99).

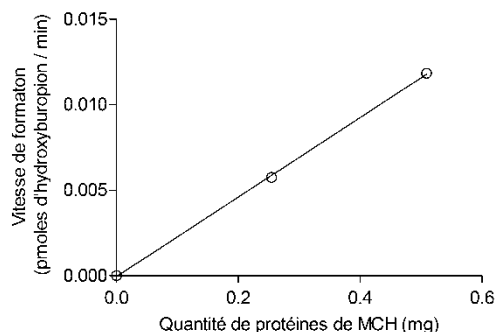
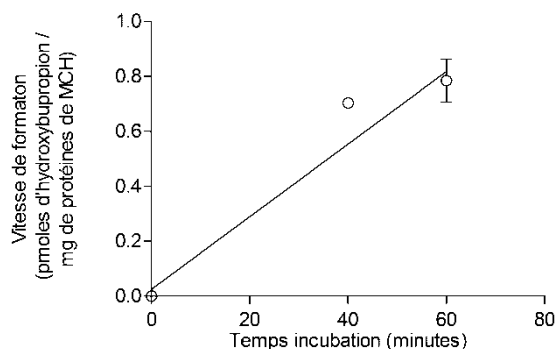
**1C.**



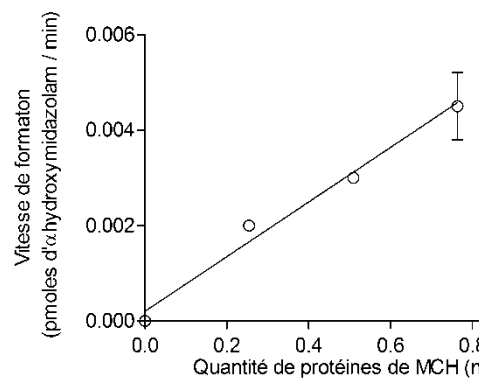
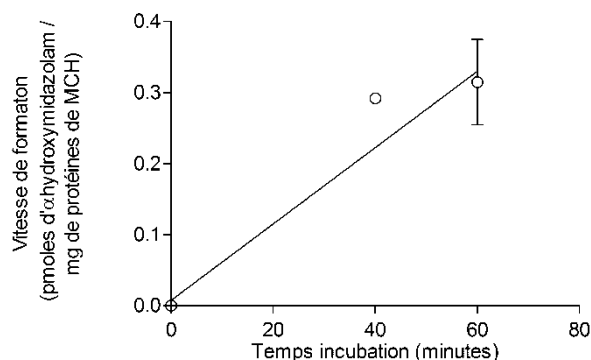
**1D.**



**Figure 1C et 1D. Conditions de linéarité du substrat chlorzoxazone dans l'échantillon microsomal de cœur humain (MCH#21)** **1C.** Conditions de linéarité en fonction de la quantité de protéines de MCH (incubation de 60 minutes). **1D.** Conditions de linéarité en fonction du temps d'incubation (quantité de protéines : 0.7635 mg). Les incubations ont été effectuées à 378  $\mu$ M de chlorzoxazone dans un tampon 100 mM PO<sub>4</sub>. La formation d'hydroxychlorzoxazone est linéaire pour un intervalle de 0.2545 à 0.7635 mg de protéines de MCH ( $r^2$  0.99) et pour un intervalle de 0 à 60 minutes ( $r^2$  0.99).

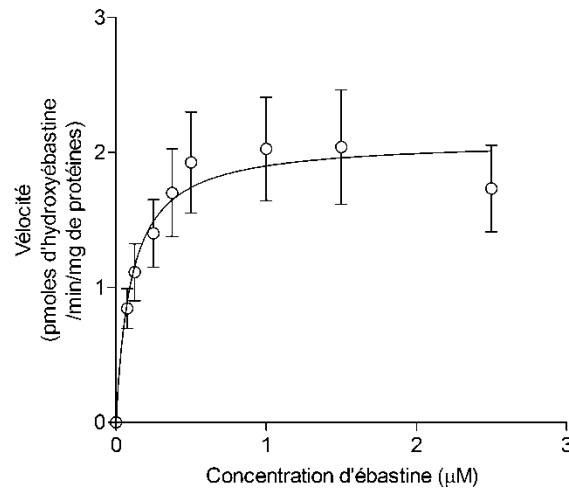
**1E.****1F.**

**Figure 1E et 1F. Conditions de linéarité du substrat bupropion dans un échantillon microsomal de cœur humain (MCH) 1E.** Conditions de linéarité en fonction de la quantité de protéines de MCH (incubation de 60 minutes). **1F.** Conditions de linéarité en fonction du temps d'incubation (quantité de protéines : 0.7635 mg). Les incubations ont été effectuées à 465  $\mu$ M de bupropion dans un tampon 100 mM  $\text{PO}_4$ . Une régression linéaire a été calculée pour un intervalle de 0.2545 à 0.509 mg de protéines de MCH ( $r^2$  0.99) et pour un intervalle de 0 à 60 minutes ( $r^2$  0.95).

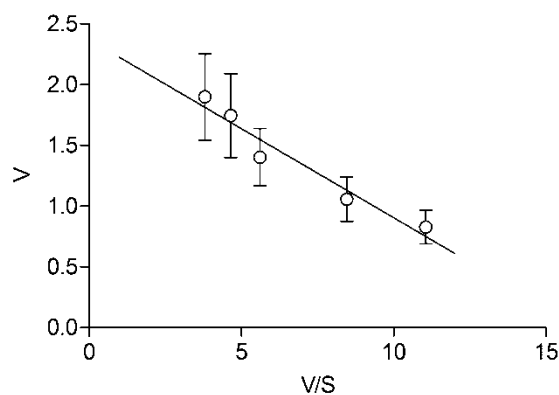
**1G.****1H.**

**Figure 1G et 1H. Conditions de linéarité du substrat midazolam dans l'échantillon microsomal de cœur humain (MCH#21) 1E.** Conditions de linéarité en fonction de la quantité de protéines de MCH (incubation de 60 minutes). **1F.** Conditions de linéarité en fonction du temps d'incubation (quantité de protéines : 0.7635 mg). Les incubations ont été effectuées à 3  $\mu$ M de midazolam dans un tampon 100 mM  $\text{PO}_4$ . Une régression linéaire a été calculée pour un intervalle de 0.2545 à 0.7635 mg de protéines de MCH ( $r^2$  0.96) et pour un intervalle de 0 à 60 minutes ( $r^2$  0.924).

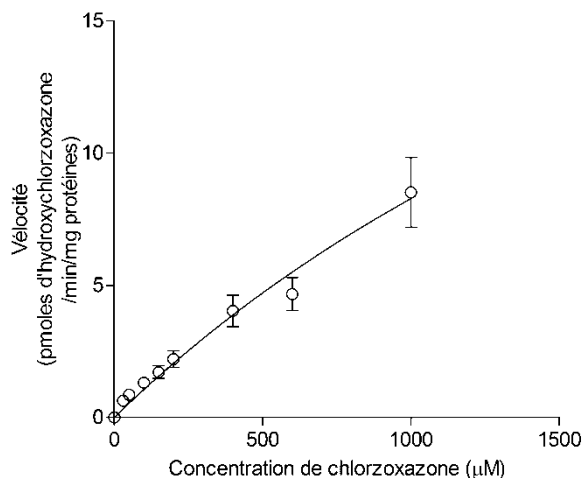
**Figure 2A.** Cinétique moyenne d'hydroxylation de l'ébastine (0,075 à 2,5  $\mu\text{M}$ ) dans les microsomes de 18 cœurs humains ventriculaires (#1 à 18). (Chaque point est une moyenne  $\pm$  SEM de 18 échantillons de cœurs où chaque concentration est initialement une moyenne de triplicata  $\pm$  SD par échantillon).



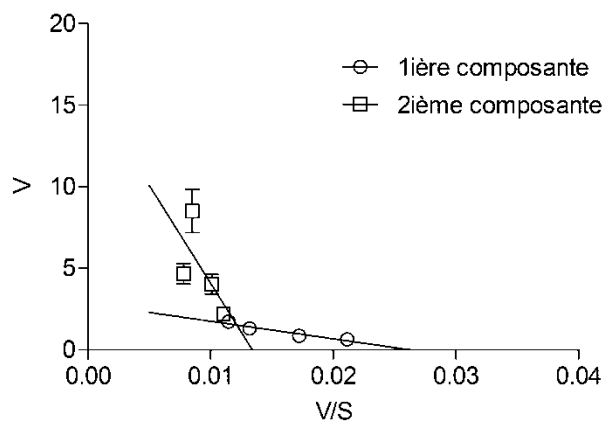
**Figure 2B.** Représentation graphique selon le modèle Eadie-Hosftée des données des échantillons #1 à 18. La valeur de vélocité associée à la concentration d'ébastine de 1, 1,5 et 2,5  $\mu\text{M}$  ont été retirées afin d'obtenir un profil de composante cinétique sans la participation de point où l'activité est inhibée par le substrat. ( $V$  = vélocité : pmoles d'hydroxyébastine / min / mg de protéines,  $S$  = concentration de substrat ébastine :  $\mu\text{M}$ )



**Figure 3A.** Cinétique moyenne d'hydroxylation de la chlorzoxazone (30 à 1000  $\mu\text{M}$ ) dans les microsomes de 14 ventricules de cœurs humains (#1, 4 à 15 et 18). (Chaque point est une moyenne  $\pm$  SEM de 14 échantillons de cœurs où chaque concentration est initialement une moyenne de triplicata  $\pm$  SD par échantillon)



**Figure 3B.** Représentation graphique selon le modèle Eadie-Hosftee des données des échantillons #1 à 15 et 18. (V = vitesse : pmoles d'hydroxychlorzoxazone / min / mg de protéines, S = concentration de substrat chlorzoxazone :  $\mu\text{M}$ )



**Figures 4. Essais d'inhibition de l'hydroxylation du substrat ébastine dans les rhCYP2J2, HLM et MCH**

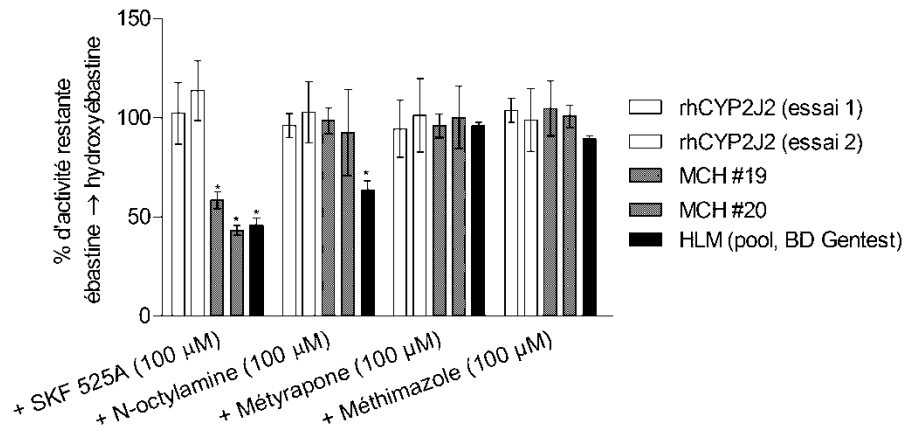


Figure 4A. Pourcentage d'activité restante suivant des incubations avec l'ébastine dans les rhCYP2J2, les HLM et les MCH avec des inhibiteurs chimiques. Chaque colonne est présentée sous forme de pourcentage d'une moyenne de triplicata  $\pm$  écart-type. Statistiques; test de t par rapport au contrôle sans inhibiteur (100%); légende \* $p < 0,05$ .

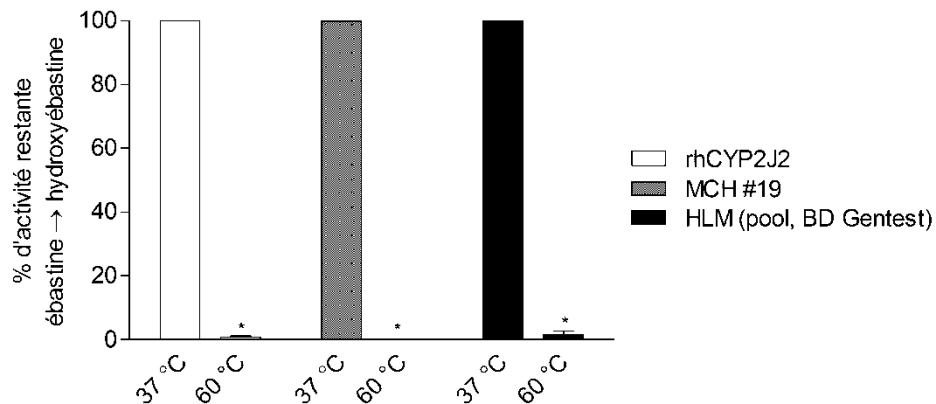


Figure 4B. Inhibition de l'hydroxylation de l'ébastine lors du chauffage des isoenzymes recombinants rhCYP2J2, les HLM et les MCH à 60°C 10 minutes avant la pré-incubation. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle à 37 °C (100%); légende \* $p < 0,05$ .

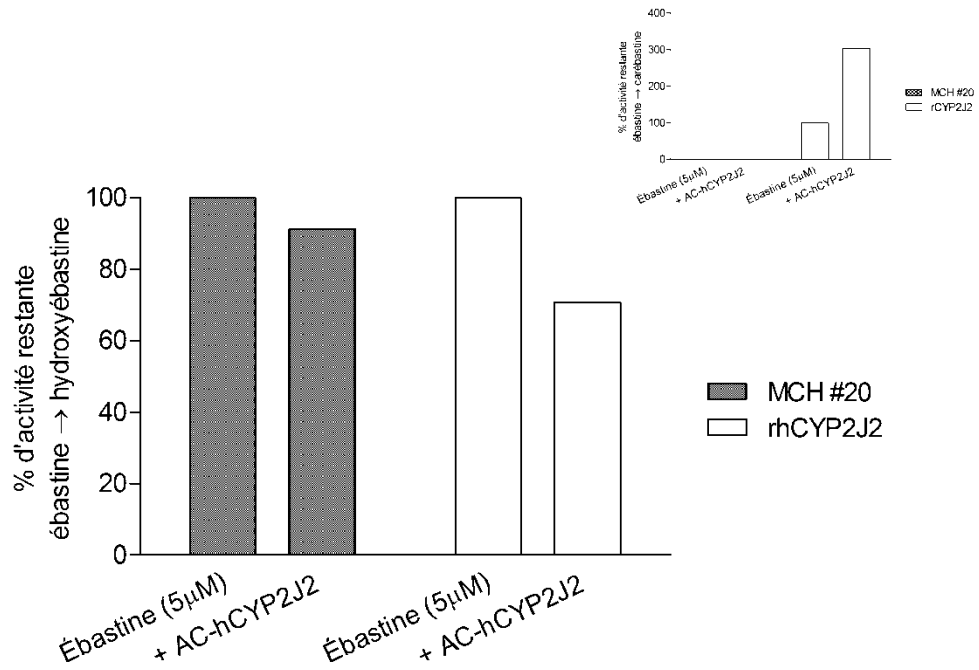


Figure 4C. Inhibition de l'hydroxylation de l'ébastine avec l'anticorps anti-CYP2J2 humain (gracieuseté du Dr. Darryl C. Zeldin, M.D., NIH) incubé 10 minutes avec les isoenzymes recombinants rhCYP2J2 et les MCH avant la pré-incubation. Aucune statistique n'a été effectuée car l'incubation avec anticorps est une donnée unique. Insertion : Pourcentage d'activité de formation de carbébastine par rapport au contrôle sans anticorps anti-CYP2J2 suite à des incubations d'ébastine.



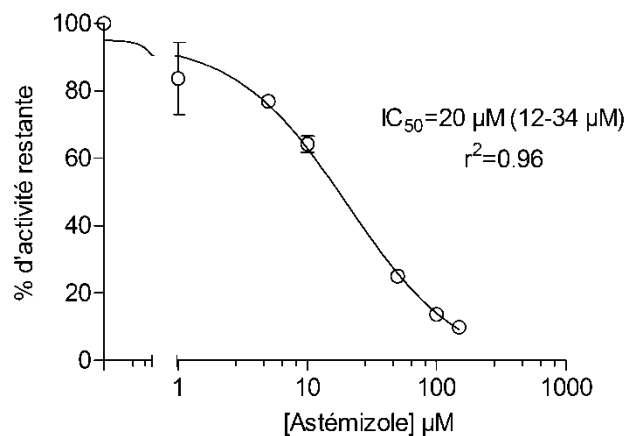


Figure 4D. Courbe d'inhibition de l'hydroxylation de l'ébastine dans les MCH avec différentes concentration d'astémizole (1 à 150 μM) incubée en même temps que l'ébastine et les MCH lors de la pré-incubation. (Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne ± écart-type)

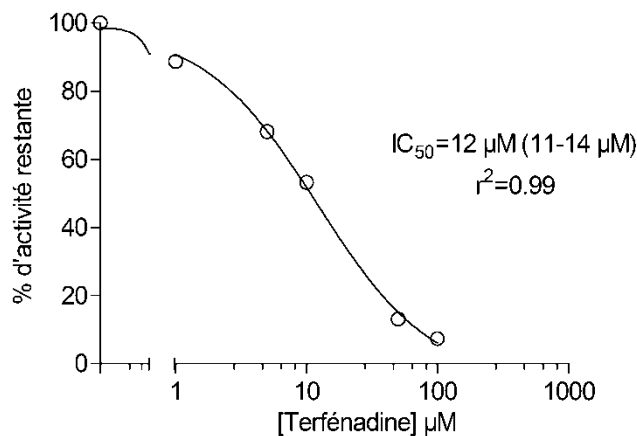


Figure 4E. Courbe d'inhibition de l'hydroxylation de l'ébastine dans les MCH avec différentes concentration de terfénadine (1 à 100 μM) incubée en même temps que l'ébastine et les MCH lors de la pré-incubation. (Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne ± écart-type)

Figures 5. Essais d'inhibition de l'hydroxylation du substrat chlorzoxazone dans les rhCYP2J2, HLM et MCH.

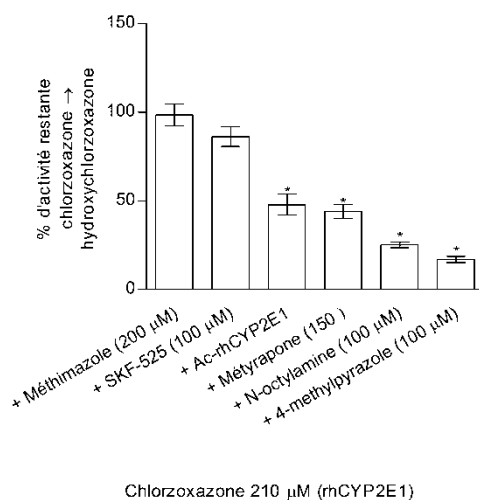


Figure 5A. Pourcentage d'activité restante suivant des incubations avec la chlorzoxazone dans les rhCYP2E1, les HLM et les MCH avec des inhibiteurs chimiques. Chaque colonne est présentée sous forme de pourcentage d'une moyenne de triplicata  $\pm$  écart-type. Statistiques; test de t par rapport au contrôle sans inhibiteur (100%); légende \* $p < 0,05$ .

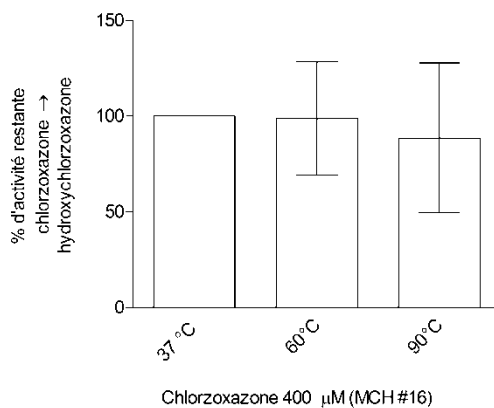


Figure 5B. Essai d'inhibition avec la chlorzoxazone incubée avec les MCH soumis à des températures de 60°C et 90°C 10 minutes avant l'incubation. Chaque donnée est un

triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle à 37 °C (100%); légende \* $p < 0,05$ .

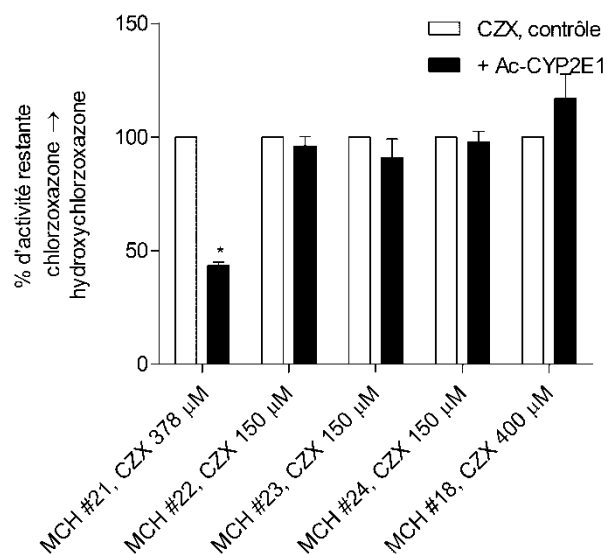


Figure 5C. Inhibition de l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec l'anticorps anti-CYP2E1 humain (MAB-rhCYP2E1, BD Gentest) incubé 10 minutes avec les MCH de 5 échantillons différents avant la pré-incubation. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle (100%); légende \* $p < 0,05$ .

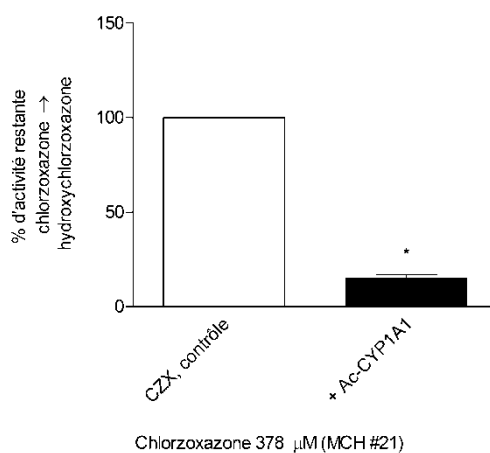


Figure 5D. Inhibition de l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec l'anticorps anti-CYP1A1 humain (MAB-rhCYP1A1, BD Gentest) incubé 10 minutes avec les MCH d'un échantillon avant la pré-incubation. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle (100%); légende \* $p < 0,05$ .

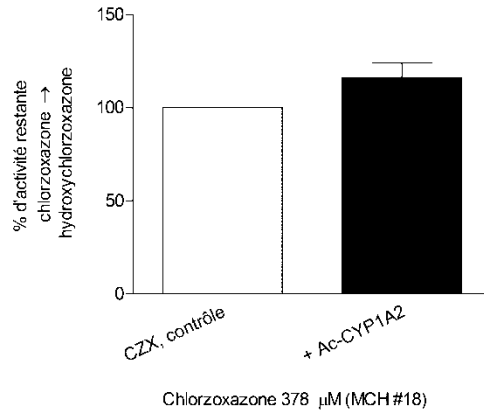


Figure 5E. Inhibition de l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec l'anticorps anti-CYP1A2 humain (MAB-rhCYP1A2, BD Gentest) incubé 10 minutes avec les MCH d'un échantillon avant la pré-incubation. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle (100%); légende \* $p < 0,05$ .

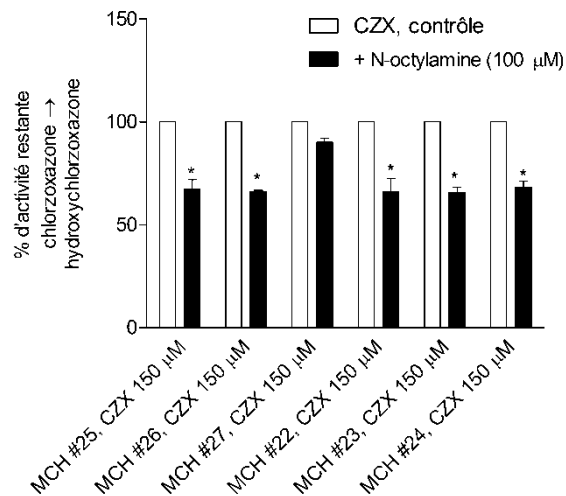


Figure 5F. Inhibition de l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec un inhibiteur non sélectif des CYP450 incubé 10 minutes avec les MCH de 6 échantillons différents avant la pré-incubation. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle (100%); légende \* $p < 0,05$ .

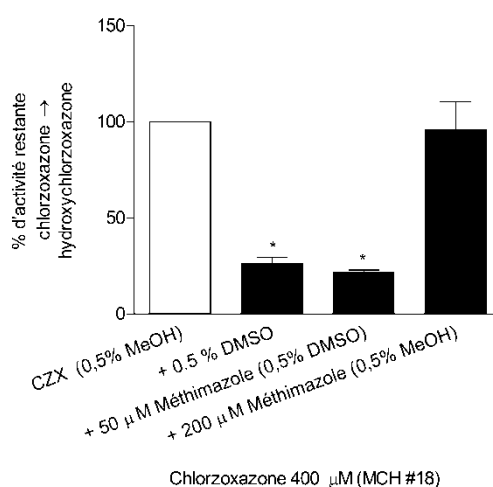


Figure 5G. Inhibition de l'hydroxylation de la chlorzoxazone par le solvant DMSO (total de 1% de solvant dans l'incubation : 0,5 % MeOH + 0,5 % DMSO) incubé 10 minutes avec les microsomes d'un échantillon de cœur humain. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle (100%); légende \* $p < 0,05$ .

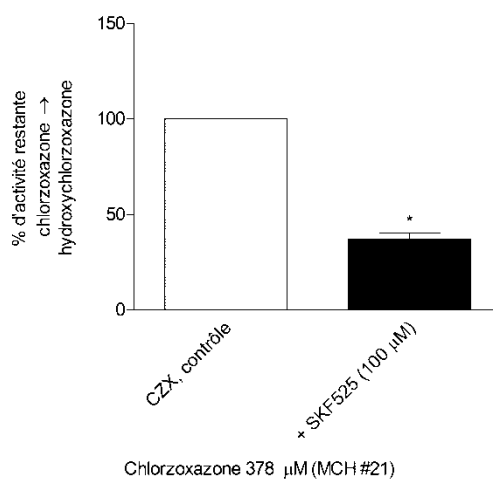


Figure 5H. Inhibition de l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec l'inhibiteur non sélectif des CYP450 SKF525 incubé 10 minutes avec les MCH d'un échantillon avant la pré-incubation. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle (100%); légende \* $p < 0,05$ .

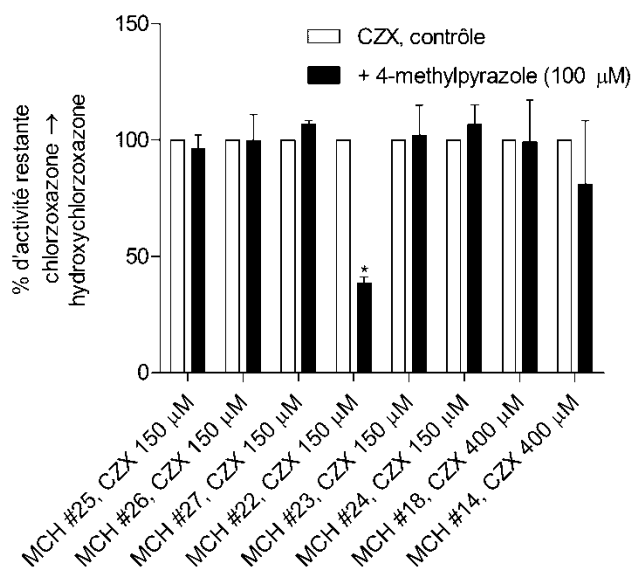


Figure 5I. Inhibition de l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec l'inhibiteur sélectif de l'isoenzyme CYP2E1 incubé 10 minutes avec les MCH de 8 échantillons différents avant la pré-incubation. Chaque donnée est un triplicata présenté par une moyenne  $\pm$  écart-type. Statistique ; test de t par rapport au contrôle (100%); légende \* $p < 0,05$ .

**Table 1. Paramètres de cinétiques enzymatiques d'hydroxylation de l'ébastine dans les MCH**

# d'échantillon de MCH	Modèle d'ajustement des courbes utilisées	V <sub>max</sub> (pmoles OHEBA/min/mg de protéines)	K <sub>m</sub> (μM)	CL <sub>int</sub> calculée (μl/min/mg de protéines)	CL <sub>int</sub> extrapolée Modèle Eadie-Hofstee
1	Substrate inhibition	0,4	0,10	4	5,
2	Substrate inhibition	3,3	0,36	10	10
3	Substrate inhibition	6,1	0,39	16	16
4	Substrate inhibition	1,2	0,09	14	18
5	Substrate inhibition	9,4	0,30	32	33
6	Substrate inhibition	2	0,23	9	10
7	Michaelis-Menten	0,6	0,08	7	9
8	Substrate inhibition	2,2	0,16	14	17
9	Substrate inhibition	1	0,11	9	10
10	Michaelis-Menten	2,1	0,11	20	19
11	Substrate inhibition	4	0,11	38	40
12	Substrate inhibition	9	0,33	28	42
13	Michaelis-Menten	0,9	0,68	1	7
14	Substrate inhibition	0,7	0,12	6	20
15	Substrate inhibition	3	0,17	18	7
16	Substrate inhibition	0,9	0,15	9	28
17	Substrate inhibition	4,2	0,18	24	12
18	Substrate inhibition	1,8	0,19	10	n.c
	Moyenne	2,9	0,21	15	18
	É.T.	2,7	0,15	10	12
	CV %	94	71	69	65

Légende : CV : coefficient de variation é.t. : écart-type, K<sub>m</sub>; constante d'affinité, n.c. : non calculée, nl : nanolitre, μM : micromolaire, V<sub>max</sub> : vélocité maximale

**Table 2. Paramètres de cinétiques enzymatiques d'hydroxylation de la chlorzoxazone dans les MCH**

# d'échantillon de MCH	Modèle Michaelis Menten			Modèle Eadie-Hofstee					
	Composante enzymatique			Composante enzymatique 1			Composante enzymatique 2		
	V <sub>max</sub> (pmoles OHCZX/min/ mg de protéines)	K <sub>m</sub> (μM)	CL <sub>int</sub> (nl/min/ mg de protéines)	V <sub>max</sub> (pmoles OHCZX/min/ mg de protéines)	K <sub>m</sub> (μM)	CL <sub>int</sub> (nl/min/ mg de protéines)	V <sub>max</sub> (pmoles OHCZX/min/ mg de protéines)	K <sub>m</sub> (μM)	CL <sub>int</sub> (nl/min/ mg de protéines)
1	30,6	3472	9,7	1,9	91,4	22,9	25,9	2860	9,9
2	n.c.	n.c.	n.c.	3,3	145,2	24,6	97,7	7056	15,1
3	n.c.	n.c.	n.c.	2,1	143,1	16,0	85,4	11840	7,9
4	74,9	9192	8,9	2,4	159,1	16,2	37,4	4310	9,5
5	14,3	1062	14,8	14,2	1048,0	14,8	n.c.	n.c.	n.c.
6	195,7	13863	15,4	3,2	60,7	57,0	30,5	1701	19,6
7	9,5	864	12,1	8,9	775,5	12,6	n.c.	n.c.	n.c.
8	14,1	1995	7,7	3,4	400,2	9,4	12,6	1676	8,2
9	11,1	1156	10,5	2,8	148,4	20,6	13,8	1647	9,2
10	13,4	3654	4,0	1,1	102,0	11,4	29,1	8967	3,6
11	8,6	1872	5,0	1,1	89,7	13,5	7,5	1564	5,2
12	11,2	1134	10,8	1,9	57,7	37,0	17,8	2275	8,5
13	177,5	10469	18,6	31,1	1717,0	19,8	44,2	2287	21,2
14	52,2	4233	13,5	2,4	42,1	62,9	38,3	3078	13,6
15	61,9	1956	34,6	12,3	255,4	52,5	61,0	1948	34,3
16*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
17*	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
18	57,9	2283	27,8	10,9	401,6	29,7	36,6	1270	31,6
Moyenne	52,4	4086	13,8	6,4	352,3	26,3	38,4	3749	14,1
É.T.	61,3	4084	8,4	7,8	459,9	17,1	26,6	3241	9,4
CV %	117	100	61	122	131	65	69	86	67

Légende : CV : coefficient de variation é.t. : écart-type, K<sub>m</sub>: constante d'affinité, n.c. : non calculée, nl : nanolitre, μM : micromolaire, V<sub>max</sub> : vitesse maximale. \*les échantillons #16 et 17 n'ont pu être calculés car un nombre de points insuffisants étaient disponibles pour l'estimation. La majorité des concentrations de chlorzoxazone incubées ont donné un signal non détectable de formation d'hydroxychlorzoxazone.



**Table 3A. Extrapolation *In Vitro/In Vivo* de la clairance d'hydroxylation de l'ébastine chez l'humain**

# de l'échantillon	Matrice	1. CL <sub>int-In Vitro</sub>	2. Facteur d'extrapolation A <sup>§</sup>	3. CL <sub>int</sub> / poids du tissu (colonne 1 X 2)	4. Facteur d'extrapolation B <sup>§</sup>	5. CL <sub>int-In Vivo</sub> (colonne 3 X 4)
		µl / min / mg protéines	mg / g	µl / min / g tissu	g	ml / min
Pool	HLM	132*	30,0	3630,0	1820,0	7207
		24**	30,0	600,0	1820,0	1310
1	MCH	4	4,5	18,0	285,5	5,1
2	MCH	10	3,2	32,4	285,5	9,3
3	MCH	16	3,7	58,5	285,5	16,7
4	MCH	14	3,7	51,2	285,5	14,6
5	MCH	32	2,9	93,9	285,5	26,8
6	MCH	9	3,2	28,5	285,5	8,1
7	MCH	7	2,1	14,4	285,5	4,1
8	MCH	14	4,5	63,0	285,5	18,0
9	MCH	9	3,2	29,2	285,5	8,3
10	MCH	20	4,1	81,4	285,5	23,2
11	MCH	38	4,7	177,1	285,5	50,6
12	MCH	28	3,4	96,0	285,5	27,4
13	MCH	1	2,4	2,4	285,5	0,7
14	MCH	6	2,5	15,2	285,5	4,3
15	MCH	18	1,5	27,7	285,5	7,9
16	MCH	9	1,5	13,7	285,5	3,9
17	MCH	24	1,3	30,4	285,5	8,7
18	MCH	10	2,4	24,2	285,5	6,9
	Moyenne	14,9	3,0	47,6		13,6
	Écart-type	10,1	1,0	42,8		12,2
	CV	67,4	34,4	89,9		89,9

\* composante 1, \*\* composante 2. <sup>§</sup>Facteur A = quantité de protéines microsomales / poids du tissu, Facteur B = poids du tissu. \*Calculé selon les données internes, V<sub>max</sub> = 152 pmoles d'OHEBA / min / mg protéine et K<sub>m</sub> = 3 µM. **Légende** : CL<sub>int</sub> : Clairance intrinsèque, g : gramme, min : minutes, µl : microlitre

**Table 3B. Extrapolation *In Vitro/In Vivo* de la clairance d'hydroxylation de la chlorzoxazone chez l'humain**

# de l'échantillon	Matrice	1. CL <sub>int-In Vitro</sub>	2. Facteur d'extrapolation A <sup>§</sup>	3. CL <sub>int</sub> / poids du tissu (colonne 1 X 2)	4. Facteur d'extrapolation B <sup>§</sup>	5. CL <sub>int-In Vivo</sub> (colonne 3 X 4)
		µl / min / mg protéines	mg / g	µl / min / g tissu	g	ml / min
Pool HLM (BD, Gentest)	FOIE	37-176	30,0	1110,0	1820,0	1640-9610
<i>composante enzymatique 1</i>						
1	MCH	0,0229	4,5	0,1	285,5	0,0294
2	MCH	0,0246	3,2	0,1	285,5	0,0227
3	MCH	0,0160	3,7	0,1	285,5	0,0167
4	MCH	0,0162	3,7	0,1	285,5	0,0169
5	MCH	0,0148	2,9	0,0	285,5	0,0124
6	MCH	0,0570	3,2	0,2	285,5	0,0516
7	MCH	0,0126	2,1	0,0	285,5	0,0074
8	MCH	0,0094	4,5	0,0	285,5	0,0121
9	MCH	0,0206	3,2	0,1	285,5	0,0191
10	MCH	0,0114	4,1	0,0	285,5	0,0133
11	MCH	0,0135	4,7	0,1	285,5	0,0180
12	MCH	0,0370	3,4	0,1	285,5	0,0362
13	MCH	0,0198	2,4	0,0	285,5	0,0138
14	MCH	0,0629	2,5	0,2	285,5	0,0454
15	MCH	0,0525	1,5	0,1	285,5	0,0231
16	MCH	n.c.	1,5	n.c.	285,5	n.c.
17	MCH	n.c.	1,3	n.c.	285,5	n.c.
18	MCH	0,0297	2,4	0,1	285,5	0,0205

<sup>§</sup>Facteur A = quantité de protéines microsomales / poids du tissu, Facteur B = poids du tissu. \*Calculé à partir de : Draper, A.J., Madan, A., Latham, J. & Parkinson, A. Drug Metabolism and Disposition 26, 305-312 (1998). **Légende** : CL<sub>int</sub> : Clairance intrinsèque, g : gramme, min : minutes, µl : microlitre

Figure supplémentaire 1A. Activité d'hydroxylation du substrat midazolam dans les MCH.

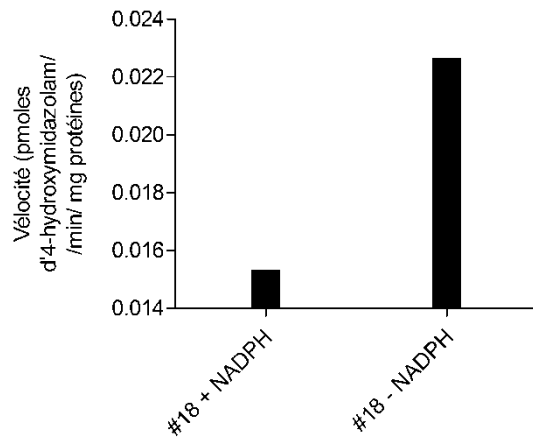


Figure supplémentaire 1B. Activité d'hydroxylation du substrat bupropion dans les MCH.

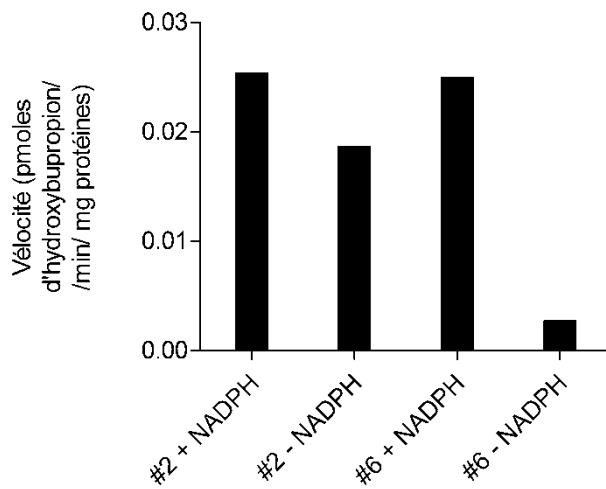


Figure supplémentaire 2A. Cinétique d'hydroxylation de l'ébastine dans un pool d'HLM (BD, Gentest). Chaque point est représenté par une moyenne  $\pm$  écart-type d'un triplicata.

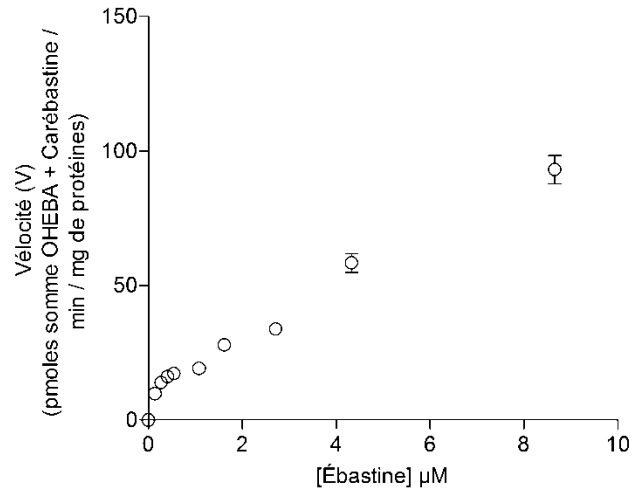
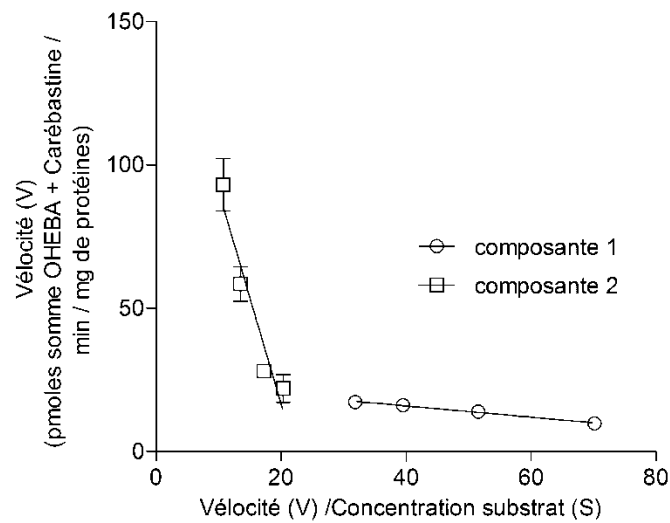


Figure supplémentaire 2B. Représentation Eadie-Hofstee de la cinétique d'hydroxylation de l'ébastine dans un pool d'HLM (BD, Gentest). Chaque point est représenté par une moyenne  $\pm$  écart-type d'un triplicata.



### 3.8 Discussion

Les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis d'établir deux grands aspects essentiels de mes études doctorales. L'observation de la capacité oxydative à très faible concentration du substrat ébastine (200 nM) par les MCHs est essentiellement médiée par l'isoenzyme CYP2J2. De plus, l'existence d'une grande variabilité associée à cette activité enzymatique (>70%) chez 18 individus avec cardiomyopathies appuie la participation significative du métabolisme extrahépatique médié par cette isoenzyme et démontre que les différences existantes entre les individus pourraient agir comme déterminants majeurs dans le contrôle des concentrations intracellulaires de composés endogènes ou de médicaments substrats du CYP2J2. Ces découvertes marquent un tournant majeur établissant, pour la première fois, que l'isoenzyme CYP2J2 catalyse l'hydroxylation de l'ébastine à des concentrations similaires à celles observées en clinique dans la fraction microsomale isolée de ventricules de cœurs humains explantés provenant de patients avec différentes cardiomyopathies.

Nos résultats démontrent que l'isoenzyme CYP2J2 est active dans le ventricule de cœurs humains confirmant que le système de fraction microsomale (MCH) peut être utilisé comme base pour étudier le profil métabolique de substrats exogènes et endogènes du CYP2J2, tels que la terféndine ou l'acide arachidonique impliqués dans la formation de métabolites vasoactifs ou associés à une toxicité cardiaque.

Les profils cinétiques des substrats chlorzoxazone et ébastine ont été obtenus en incubant le cocktail #1 avec les MCH. Il fut préalablement établi que le cocktail #1 pouvait être utilisé comme outil pour observer les voies métaboliques sélectives des CYP2B6, 2E1, 2J2 et 3A avec les substrats bupropion, chlorzoxazone, ébastine et midazolam dans un système d'isoenzymes CYP450s recombinantes humaines. Dans le système de la fraction sous-cellulaire microsomale, les interactions entre les substrats pouvaient être différentes. Étant donné la limitation dans la disponibilité en tissu et des résultats mitigés, nous avons validé l'interaction du cocktail#1 sur l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec les MCH dans un seul échantillon. Le même exercice a été effectué pour le substrat ébastine dans 12 échantillons de cœurs humains. La validation des

substrats bupropion et midazolam n'a pas été effectuée compte tenu de leur trop faible activité observée lorsqu'incubé avec les MCH.

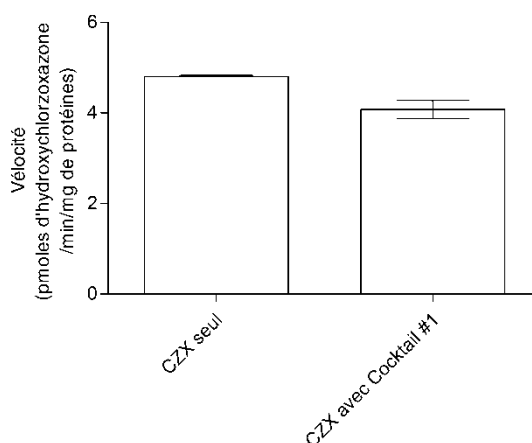
Le **Tableau 3** présente les valeurs des paramètres cinétiques calculés pour la voie d'hydroxylation du substrat ébastine avec les MCH lorsqu'incubé seul ou en présence du cocktail #1. Les analyses ont été effectuées avec les mêmes 12 premiers échantillons présentés dans ce chapitre (#1 à 12).

**Tableau 3.** Paramètres de cinétique enzymatique de l'hydroxylation de l'ébastine avec les MCH incubée seule ou en présence du cocktail #1 (n=12).

Ébastine Solo				Ébastine avec le cocktail #1				
#	Modèle cinétique	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	CL <sub>int</sub> (95% IC)	Modèle cinétique	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	CL <sub>int</sub> (95% IC)
		μM	pmol OHEBA / min / mg prot	μl / min / mg prot		μM	pmol OHEBA / min / mg prot	μl / min / mg prot
1	M-M	0,09 ± 0,01	0,4 ± 0,01	4,8 (3,8-5,9)	S-I	0,102 ± 0,018	0,399 ± 0,025	4,04 (2,47-5,6)
2	M-M	0,25 ± 0,03	3,3 ± 0,1	13,4 (9,9-16,9)	S-I	0,355 ± 0,063	3,277 ± 0,330	9,6 (5,5-13,6)
3	M-M	0,18 ± 0,01	4,9 ± 0,1	28 (24-32)	S-I	<b>0,392 ± 0,061 ***</b>	<b>6,104 ± 0,567 *</b>	16 (10-22) <sup>‡</sup>
4	M-M	0,078 ± 0,004	1,38 ± 0,01	18 (16-20)	S-I	0,086 ± 0,013	<b>1,164 ± 0,057 ***</b>	14 (9-19)
5	M-M	0,13 ± 0,01	8,5 ± 0,2	67 (53-82)	S-I	<b>0,300 ± 0,089*</b>	9,403 ± 1,441	32 (10-55)
6	M-M	0,11 ± 0,01	2,34 ± 0,04	22 (17-26)	S-I	<b>0,224 ± 0,019 ***</b>	<b>1,921 ± 0,050 ***</b>	8,9 (7,3-10,5) <sup>‡</sup>
7	M-M	0,07 ± 0,02	0,53 ± 0,02	8 (3-12)	M-M	0,083 ± 0,013	0,559 ± 0,017	6,96 (4,63-9,3)
8	M-M	0,076 ± 0,011	1,69 ± 0,04	23 (16-30)	S-I	<b>0,156 ± 0,027 *</b>	<b>2,172 ± 0,157 **</b>	14,39 (8,8-19,9)
9	M-M	0,11 ± 0,01	1,10 ± 0,02	10 (8-13)	S-I	0,113 ± 0,017	<b>0,967 ± 0,054 *</b>	8,9 (5,9-11,9)
10	M-M	0,23 ± 0,02	2,9 ± 0,1	13 (10-16)	M-M	<b>0,108 ± 0,015 ***</b>	<b>2,057 ± 0,063 ***</b>	19,79 (13,9-25,6)
11	M-M	0,18 ± 0,02	4,3 ± 0,1	25 (19-31)	S-I	<b>0,11 ± 0,02***</b>	<b>4,01 ± 0,21***</b>	38 (26-50)
12	M-M	0,2 ± 0,02	6,02 ± 0,14	31 (24-37)	S-I	0,330 ± 0,116	8,957 ± 1,794	28 (5-52)

Légende : CL<sub>int</sub>; clairance intrinsèque. IC; intervalle de confiance. K<sub>m</sub>; constante d'affinité. M-M; Michaelis-Menten. pmol; picomoles. μM; micromolaire. S-I; substrate inhibition. V<sub>max</sub>; vitesse maximale  
Statistique (test-t non paire) : \*p<0.01 à 0.05, \*\*p<0.001 à 0.01, \*\*\* p<0,001 comparé au même paramètre de la cinétique solo. <sup>‡</sup> : Intervalle de confiance à 95% ne chevauche pas celui de la condition solo.

Les résultats obtenus pour le substrat chlorzoxazone avec les MCH étaient non concluants et m'ont restreint à ne tester qu'un seul échantillon de cœurs humains pour l'effet de cocktail. La Figure 23 démontre qu'il n'y a pas de différences significatives dans le métabolisme NADPH-dépendant de la chlorzoxazone avec les MCH lorsqu'incubée seule ou en présence du cocktail #1.



**Figure 23.** Activité d'hydroxylation du substrat chlorzoxazone avec les MCH de l'échantillon #14 (présentée dans ce chapitre). La chlorzoxazone fut incubée à 400  $\mu$ M et les substrats du cocktail à 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M et 310  $\mu$ M pour l'ébastine, le midazolam et le bupropion, respectivement.

Bref, ces résultats démontrent que les substrats ébastine et chlorzoxazone peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec le cocktail #1 afin d'étudier le métabolisme sélectif des isoenzymes CYP2J2 et 2E1 dans la fraction microsomale de tissu humain et ce malgré la possible présence d'autres isoenzymes du CYP450 où source enzymatique.

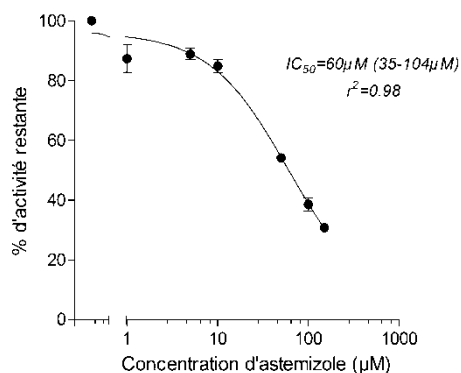
### **Hydroxylation de l'ébastine et CYP2J2 avec la matrice MCH**

Nos résultats permettent d'associer l'isoenzyme CYP2J2 comme source majoritaire responsable de l'hydroxylation du substrat ébastine avec les MCH. Une brève preuve de concept sera présentée dans cette discussion. Premièrement, le substrat ébastine est sélectif envers l'isoenzyme CYP2J2. L'isoenzyme CYP2J2 est spécifique de par les caractéristiques de réaction, soit la formation d'un métabolite hydroxylé. L'ajout d'un substrat du CYP2J2 (astémizole et terfénadine), agissant comme inhibiteur compétitif,

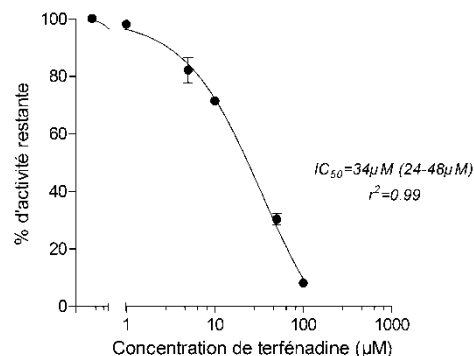


inhibe à plus de 90% l'hydroxylation de l'ébastine dans les rhCYP2J2 (Figure 24). Le même scénario a été observé avec les MCH présenté dans ce chapitre.

23-A.



23-B.



**Figure 24.** Profil d'inhibition de l'hydroxylation du substrat ébastine avec des concentrations ascendantes d'astémizole et de terfénadine dans les rhCYP2J2. L'activité restante est représentée par le % d'activité par rapport au contrôle sans inhibiteur.

De plus, nos résultats suggèrent que l'hydroxylation de l'ébastine avec les MCH implique une seule composante (source) enzymatique observée lorsque les données ont été transformées selon la représentation Eadie-Hofstee. Les essais d'inhibitions utilisant des inhibiteurs non sélectifs des CYP450s avec les MCH ont démontré la même tendance d'inhibition avec les rhCYP2J2 et HLM envers la réaction d'hydroxylation du substrat ébastine. Le chauffage des MCH à 60°C avant incubation de l'ébastine a complètement aboli l'activité enzymatique d'hydroxylation. Des résultats identiques ont été obtenus dans les systèmes rhCYP2J2 et HLM. Ceci suggère que la source enzymatique est non-résistante à la chaleur. Les CYP450s sont reconnus comme étant non-résistants à des températures dépassant 60°C.<sup>415</sup> L'utilisation de l'anticorps sélectif envers CYP2J2 n'a pas diminué la formation du métabolite hydroxyébastine de façon significative (9%) avec les MCH tandis qu'aucun métabolite séquentiel (carébastine) ne fut détecté, avec ou sans anticorps, nous limitant à discuter de ce résultat.. Avec les rhCYP2J2, la formation d'hydroxyébastine a diminué de 30% tandis que la formation de carébastine a augmentée de 300%. Étant donné que la carébastine est séquentielle à l'hydroxyébastine, il est suggéré que la diminution de formation d'hydroxyébastine a

favorisé la transformation d'hydroxyébastine en carébastine par le CYP2J2. Ceci se traduit par une augmentation des concentrations de carébastine.

Le Tableau 4 présente un aperçu de la cinétique enzymatique de l'ébastine dans trois systèmes étudiés; rhCYP2J2, MCH et HLM. Les paramètres cinétiques  $K_m$  du substrat ébastine avec les rhCYP2J2 sont similaires qu'avec les MCH suggérant que le complexe enzyme-substrat atteint 50% de sa vitesse maximale d'hydroxylation à une concentration similaire (0,34  $\mu\text{M}$  vs 0,21  $\mu\text{M}$ ). Étant donné que le  $V_{\text{max}}$  et le  $K_m$  sont indépendants l'un de l'autre, il est évident que les similitudes de valeurs obtenues suggèrent que l'isoenzyme responsable de l'hydroxylation de l'ébastine avec les MCH fonctionne à des concentrations similaires mais le pool d'enzyme disponible pourrait être moindre justifiant les valeurs de  $V_{\text{max}}$  plus faibles et par le fait même les valeurs de clairance intrinsèque. D'ailleurs, l'identification de la responsabilité du métabolisme d'une enzyme en particulier dans une fraction microsomale s'effectue entre autres par la comparaison des  $K_m$  qui restera le même, peu importe le système utilisé.<sup>416</sup> Bref, ces résultats permettent de confirmer que la source enzymatique responsable de la formation d'hydroxyébastine avec les MCH est CYP2J2-dépendante.

**Tableau 4.** Paramètres de cinétique enzymatique de l'hydroxylation de l'ébastine dans trois différentes matrices ; MCH, HLM et rhCYP2J2.

Métabolite quantifié	Modèle cinétique	$CL_{\text{int}}$	$K_m$	$V_{\text{max}}$
<b><i>MCH</i></b>				
Hydroxyébastine (OHEBA)	M-M	16	0.21	3.1
<b><i>HLM</i></b>				
Somme (OHEBA + carebastine)	E-H (1 <sup>st</sup> component)	132	0.2	24
	E-H (2 <sup>nd</sup> component)	24	8.4	169
<b><i>rhCYP2J2</i></b>				
Somme (OHEBA + carebastine)	Allostérique/Sigmoïdale	48	0.34	16

### Activité NADPH-indépendante

L'oxydation de substrats dans la fraction microsomale nécessite un système générant le cofacteur soluble source d'électrons NADPH. *In vitro*, on obtient le NADPH à partir de la réduction (acquisition d'un H<sup>+</sup>) de la forme oxydée  $\beta$ -nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate ( $\beta$ -NADP<sup>+</sup>) lors de la déshydrogénation du glucose-6-phosphate au carbone 1 en 6-phosphoglucunolactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) NADP<sup>+</sup> dépendante.<sup>417</sup> Ce processus enzymatique fait partie de la voie du pentose phosphate se produisant naturellement dans le cytosol des cellules qui est absent dans la fraction microsomale.<sup>417,418</sup> [ENREF 324](#) L'objectif ultime de provoquer cette réaction *in vitro* est de générer du NADPH, cofacteur essentiel à l'enzyme microsomale NADPH-CYP450 oxydoréductase (CYPOR), co-localisée<sup>419</sup> avec le CYP450 agissant comme navette d'électrons pour le CYP450.<sup>420</sup> *In vitro*, la fraction microsomale exprime le complexe enzymatique (CYPOR-CYP450). Par contre, le cofacteur soluble NADPH normalement généré de façon endogène est absent après l'isolation de la fraction microsomale cellulaire. De façon artificielle, le NADPH est donc généré *in vitro* à l'aide de la voie du pentose phosphate avec la G6PD.

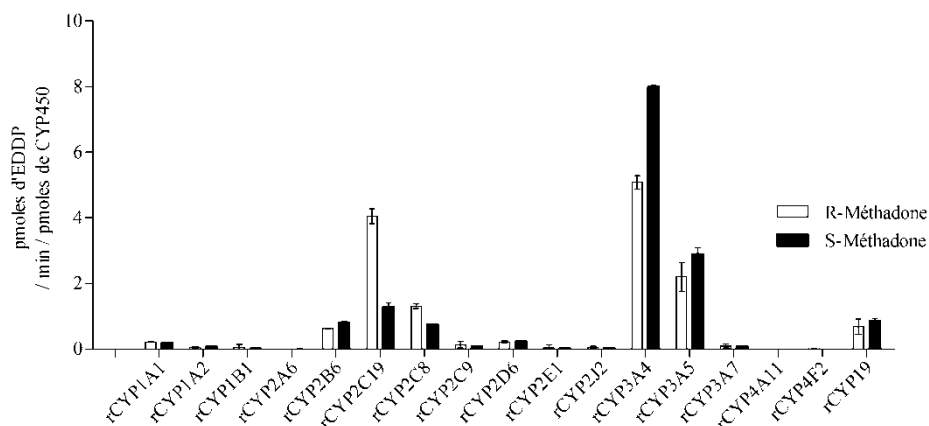
En enzymologie, il est reconnu qu'une activité d'oxydation NADPH dépendante dans une fraction microsomale est majoritairement associée aux CYP450s.<sup>94</sup> De façon inattendue, une certaine activité NADPH-indépendante fut observée lorsque le midazolam et le bupropion furent incubés avec la fraction microsomale des ventricules de cœurs humains. Peu d'informations reliées à ce type d'activité sont retrouvées dans la littérature où ce phénomène est souvent étudié dans les mollusques.<sup>421-423</sup> L'activité hydroxylase du benzo- $\alpha$ -pyrène dans les microsomes de foie de 4 espèces de poissons fut observée avec et sans NADPH.<sup>424</sup> L'ajout d'un traitement préalable à la  $\beta$ -naphthoflavone, inducteur des CYP450s, n'a pas augmenté l'activité hydroxylase NADPH-indépendante tandis que l'activité NADPH-dépendante a plus que doublé chez certaines espèces de poissons suggérant que l'activité NADPH-indépendante n'est pas inductible par la  $\beta$ -naphthoflavone. Malgré tout, les auteurs mentionnent que l'activité NADPH-indépendante associée à l'hydroxylation du benzo- $\alpha$ -pyrène est CYP450-dépendante basée sur des essais, effectués par d'autres chercheurs, avec inhibiteurs

sélectifs des CYP450s.<sup>421</sup> Par ailleurs, le métabolisme de la bicifadine, un inhibiteur de la recapture triple de la norépinephrine, sérotonine et dopamine, en métabolite M12 par les microsomes de foie est similaire avec ou sans NADPH.<sup>425</sup> De plus, deux composantes enzymatiques sont suggérées être responsables de la formation de bicifadine en M12 et ce, de manière NADPH-indépendante dans les microsomes hépatiques humains.<sup>425</sup> La formation du métabolite M12 NADPH-indépendante est suggérée relever des monoamines oxydases (MAO) vue la complète inhibition par la sélégiline, inhibiteur sélectif des MAO.<sup>425</sup> Le phénomène NADPH-indépendant dépasse les objectifs de mes travaux de recherche et nécessite d'autres analyses afin de comprendre les mécanismes impliqués, qui encore à ce jour sont très peu observés et identifiés. Par contre, ce phénomène ne peut être omis lorsqu'observée lors d'études métaboliques dans une fraction microsomale.

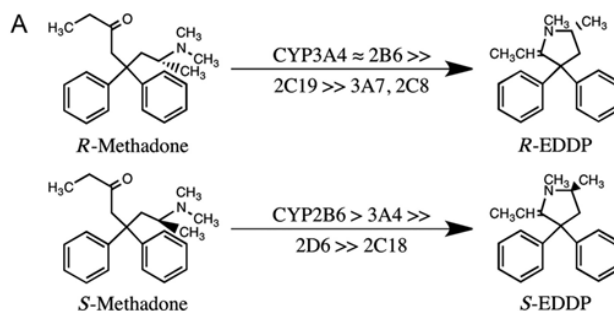
Fait intéressant, il fut observé que l'activité d'hydroxylation du benzo- $\alpha$ -pyrène NADPH-indépendante dans des microsomes fut inhibée par l'ajout de cofacteurs NADPH.<sup>421</sup> De façon inattendue, ce phénomène fut aussi observé dans notre laboratoire lors d'essais exploratoires de métabolisme envers la méthadone dans la fraction microsomale des ventricules de cœurs humains **Figure 27**.

### **Métabolisme de la méthadone avec les MCH**

Nous avons réalisé des études exploratoires afin d'étudier la capacité métabolique du tissu ventriculaire cardiaque envers la méthadone, opioïde synthétique prescrit pour l'analgésie ou pour le traitement de la dépendance aux opioïdes.<sup>426</sup> La méthadone est administrée sous forme de mélange racémique (1 :1 R,S-méthadone) et est métabolisée de façon énantiosélective par plusieurs isoenzymes des CYP450s (Figure 25).<sup>427</sup> Le principal métabolite formé est le 2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3 diphénylpyrrolidine (EDDP) (**Figure 26**). La méthadone est un puissant bloqueur du canal  $I_{Kr}$  dont le S-isomère est plus puissant que le R-isomère.<sup>428</sup> Le bloc de ce canal est une des causes sous-jacente au prolongement de l'intervalle QT.<sup>429</sup>



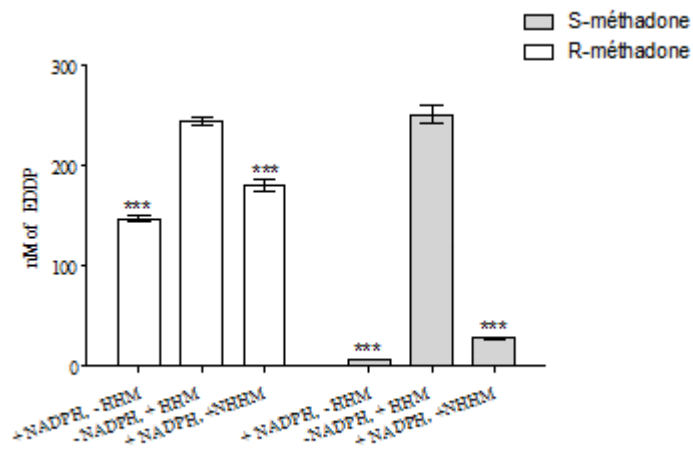
**Figure 25.** Formation d'EDDP résultant du métabolisme de la R- et S-méthadone dans les isoenzymes recombinantes humaines rhCYP450.3,5 pmol de rhCYP450 ont été incubées, en triplicata, avec 200  $\mu$ M de R- et S-méthadone dans un tampon phosphate 100 mM pendant 30 minutes. La réaction fut arrêtée avec 1000  $\mu$ l de méthanol froid contenant l'IS. L'EDDP fut analysé par LC-MSMS, méthode développée dans notre laboratoire. Brièvement, 10  $\mu$ l du surnageant de l'incubation était injecté sur une colonne Phenomenex Luna PFP (2) 150\*3mm 3 $\mu$ m, chauffée à 40°C à travers une phase mobile de 70 :30 méthanol:10 mM  $\text{NH}_4\text{COOH}$  à pH 3.0/ $\text{HCOOH}$  selon un débit de 350  $\mu$ l/min. La détection en spectrométrie de masse par un TSQ Quantum Ultra était en mode positif et les transitions de masses étaient : EDDP = 278.1  $\rightarrow$  234.1, EDDP- $\text{d}_3$  = 281.1  $\rightarrow$  234.1, méthadone = 310.2  $\rightarrow$  265.2, méthadone- $\text{d}_9$  = 319.2  $\rightarrow$  268.2.



**Figure 26.** Voies métaboliques connues dépendantes des CYP450s pour la R- et S- méthadone.<sup>429</sup> (Licence de publication # 3713301042325)

Compte tenu de son potentiel de toxicité cardiaque ainsi que sa capacité à être métabolisée par les CYP450s, dont certains sont présents dans le cœur, nous avons exploré la capacité du cœur à métaboliser ce médicament. La méthadone a été mise en présence d'un pool de MCH contenant 12 tissus de ventricules de cœurs humains

explantés. La **Figure 27** présente la concentration du métabolite EDDP formée (nM). La contribution du substrat R-méthadone par rapport au signal obtenue du métabolite EDDP est substantielle comparativement au S-méthadone. La contribution serait associée à la présence du métabolite dans le produit utilisée pour faire l'incubation (la poudre blanche). Cette contribution a été prise en considération dans le calcul d'activité présentée dans la **Figure 28**.

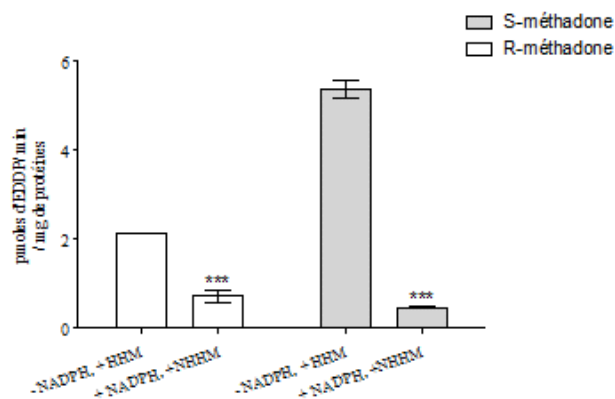


**Figure 27.** Concentrations (nM) formées suivant des incubations avec 100  $\mu$ L (0,76 mg) d'un pool de 12 échantillons de ventricules gauches de cœurs humains avec cardiomyopathies non-ischémiques de patients de sexe masculin. Les incubations ont été effectuées en triplicata avec 120  $\mu$ M de R- (A) et S-méthadone (B) séparément dans un tampon phosphate 100 mM pendant 30 minutes. Le premier type d'incubation est un blanc sans microsome (+NADPH, - HHM), le deuxième type est une incubation sans système générateur de NADPH avec les HHM (- NADPH, + HHM) et le dernier est une incubation avec HHM et avec système générateur de NADPH (+NADPH, +HHM). (Les incubations sans substrat méthadone n'ont donné aucun signal). Légende : \*\*\*; statistiquement significatif ( $p < 0,05$  par rapport au puit -NADPH, + HHM).

La **Figure 28** présente l'activité résiduelle corrigée pour la contribution de la poudre. Fait intéressant, une activité NADPH-indépendante est supérieure à l'activité NADPH-dépendante pour les deux énantiomères R- et S-méthadone (**Figure 28**). L'activité NADPH-dépendante est quant à elle similaire pour les deux.

Les données dans la littérature mentionnent qu'une activité NADPH-indépendante peut être présente et peut provoquer une oxydation de substrats formant les mêmes métabolites que ceux formés par les CYP450s. Normalement, le CYP450 nécessite le

cofacteur NADPH pour exercer son activité oxydative. Dans le cas présent, la diminution flagrante de l'activité NADPH-dépendante par rapport à celle sans NADPH suggère que le NADPH inhibe l'activité NADPH-indépendante. En effet, si les deux activités étaient indépendantes l'une de l'autre, une synergie aurait eu lieu et les deux activités NADPH-dépendante et indépendante seraient additionnées en présence du cofacteur NADPH. Comprendre les différents systèmes enzymatiques impliqués dans la formation du métabolite EDDP avec et sans NADPH implique différentes études métaboliques en dehors de l'objectif principal de mes études doctorales. Par contre, élucider ce phénomène est pertinent et est un des objectifs poursuivis dans mon laboratoire d'accueil. Bref, les résultats de ces études exploratoires démontrent que la fraction microsomale cardiaque est dotée d'une activité métabolique envers un médicament connu pour provoquer un prolongement de l'intervalle QT, la méthadone, en plus de démontrer que la formation d'EDDP est énantiosélective et plus grande pour la S-méthadone.



**Figure 28.** Activité d'hydroxylation résiduelle de la R- et S- méthadone avec les HHM du pool de 12 patients présentée à la **Figure 27**. Légende : \*\*\*, statistiquement significatif ( $p < 0,05$  par rapport au puit - NADPH, + HHM).

### **Extrapolation IVIVE**

Les différentes techniques d'extrapolation *in vitro/in vivo* permettent d'obtenir des valeurs prédictives semi-quantitatives et qualitatives où le flux sanguin et la liaison aux protéines plasmiqes ne sont pas pris en considération. Ainsi les extrapolations *in vitro/in vivo* doivent s'incorporer dans des modèles prédictifs beaucoup plus larges qui dépassent les objectifs de cette thèse. Par contre, tester certaines techniques d'extrapolation de nos données à l'échelle *in vivo* et nous permettre de mettre en relation la clairance intrinsèque du ventricule gauche et le débit coronarien représentait la preuve de concept que le métabolisme est présent et pertinent en situation physiologique. La pertinence et l'utilité d'extrapoler les données obtenues *in vitro* à l'échelle humaine *in vivo* faisaient partie intégrante de l'hypothèse de recherche voulant déterminer la contribution du ventricule gauche dans la clairance locale d'un substrat des CYP450s.

Parmi les deux techniques d'extrapolation *in vitro/in vivo*, la méthode basée sur la cinétique dans les microsomes fut celle utilisée dans notre analyse présentée dans ce chapitre. Nous n'avons pas utilisé celle basée sur l'abondance des CYP450s dans le ventricule gauche humain compte tenu que cette donnée était non disponible pour nos échantillons. Par contre, une étude effectuée par l'équipe de Golstein et Zeldin en 2007 explore l'abondance du CYP2J2 dans le tissu cardiaque complet de 8 personnes par Western blot.<sup>214</sup> La quantité obtenue de CYP2J2 dans le tissu cardiaque varie de 30% entre 8 individus ( $\bar{x} = 0,17 \pm 0.05$  pmol / mg, variant de 0.05-0.4 pmol/mg).<sup>214</sup> L'exercice d'extrapolation selon l'abondance du CYP2J2 dans le cœur a été effectué et est présenté dans le Tableau 5. Brièvement, cette technique nécessite la connaissance de la cinétique d'un substrat marqueur dans les rhCYP450. Le calcul s'effectue selon l'équation suivante :

$$CL_{int, in vivo} = CL_{int, rhCYP450} * abondance\ CYP450_{tissu} * MMPGT * poids\ du\ tissu^{430}$$

, où le MMPGT représente le *microsomal protein per gram of tissue*.

Afin de valider notre technique d'extrapolation, les microsomes de foie ont été utilisés comme référence. Le Tableau 5 démontre le calcul d'extrapolation dans le foie de toutes



les voies métaboliques de l'ébastine par les différents CYP450s (3A et 2J2). L'analyse présentée dans le Tableau 6 démontre qu'en moyenne les deux méthodes permettent d'obtenir des valeurs similaires en termes de clairance intrinsèque hépatique *in vivo* ( $CL_{int,h,in vivo}$ ). En effet, la méthode microsomale évalue la  $CL_{int,h,in vivo}$  à 9,99 L/min représentant la somme des voie métaboliques du substrat ébastine dans le foie tandis que la méthode utilisant l'abondance des rhCYP450 permet une estimation du même paramètre à 5,77 L/min. Cliniquement, la clairance totale suite à une administration orale de 20 mg d'ébastine est estimée à environ 7,752 L/min<sup>431</sup> ( $CL/F=Dose/AUC=43 \text{ ng/ml}\cdot\text{h}/20 \text{ mg}$ ). Les extrapolations *in vitro/in vivo* sont comparables à la clairance totale orale de l'ébastine validant la technique d'extrapolation *in vitro/in vivo*. Il est à noter que la valeur calculée de la clairance intrinsèque dans le foie est souvent plus grande que le débit hépatique. En effet, cette valeur reste relative en ce sens qu'elle est une indication de la tendance à épurer le composé. Lorsque la valeur est intégrée dans le modèle 'well-stirred' si la clairance est plus grande que le débit (Q), elle sera éliminé de l'équation et la clairance de l'organe sera dépendante du débit. À l'inverse, si la  $CL_{int}$  est plus petite que le débit (Q), le terme Q sera éliminé de l'équation et la CL de l'organe sera enzyme dépendant ( $CL_{int}\cdot fu$ ) (introduction, section 1.4.5).

Basée sur cette technique, l'estimation de la clairance *in vivo* cardiaque ( $CL_{int,vg}$ ) associée au CYP2J2 est d'environ 6,6 ml/min (variant de 1,9-15,4 ml/min) selon la technique d'abondance du CYP2J2 dans le cœur comparativement à une moyenne de 13,6 ml/min (variant de 0,7-50,6 ml/min) calculée selon la méthode microsomale présentée dans ce chapitre. La similitude d'étendue des valeurs pour les deux méthodes suggère que les données de cinétique enzymatique du substrat ébastine avec les MCH corrént uniquement avec l'isoenzyme CYP2J2 et donc rajoute une preuve que l'hydroxylation du substrat ébastine est dépendante du CYP2J2 dans le cœur humain. Localement, la clairance intrinsèque du substrat ébastine extrapolée *in vivo* représente environ 5% (0,3% à 18%) du débit local coronarien (280 ml/min) pouvant aller jusqu'à 18 % de celui-ci. Tel que mentionné dans ce chapitre, l'utilité des extrapolations est d'ultimement introduire ces paramètres dans des modèles prédictifs de clairance totale de l'organe tel que le modèle 'well-stirred'. Selon ce modèle, le débit coronarien étant

beaucoup plus grand que la clairance intrinsèque, la clairance totale du ventricule devient  $CL_{vg} = f_u * CL_{int,vg}$ . La fraction libre ( $f_u = \text{concentration libre} / \text{concentration plasmatique [libre + liée]}$ ) ne peut être plus grande que 1. Ainsi, selon nos calculs, la clairance totale du ventricule gauche ne pourrait dépasser la valeur de  $CL_{int,vg}$  soit 5% du débit coronarien (0,3% à 18%) dans nos échantillons. Étant donné que le débit coronarien représente environ 5% du débit cardiaque (5.6 L/min), la clairance totale du ventricule gauche ne pourrait contribuer à plus de 0.09% (5,6 / 5600 ml/min) de la clairance totale chez les 18 individus étudiés.

Malgré tout, l'importance de cette contribution doit être interprétée dans un contexte local. Ainsi, nous suggérons que la contribution du CYP2J2 dans la clairance de l'ébastine, substrat du CYP2J2 ( $K_m \bar{x} = 0.21 \mu\text{M}$ ), peut s'élever à 18% du débit coronarien dans notre population d'échantillons. Au maximum, cette contribution peut faire varier les concentrations du substrat/métabolite intracellulaires de 18%. Sachant que la concentration intracellulaire nécessaire pour créer une inhibition de 50% du canal  $I_{Kr}$  par l'ébastine est de  $3 \mu\text{M}$ <sup>432</sup> et que la concentration plasmatique générale est de  $2,3 \text{ nM}$ <sup>433</sup> le potentiel de blocage d' $I_{Kr}$  est faible pour le composé ébastine.<sup>433</sup> Par contre, notre méthode permet d'effectuer des estimations hautement informatives avec des techniques simples et non invasives. La contribution du CYP2J2 peut s'avérer plus importante pour des substrats de haute affinité dont la concentration plasmatique est similaire à l' $IC_{50}$  d' $I_{Kr}$ . Advenant l'inhibition complète de l'activité du CYP2J2 dans les cellules de ventricules une diminution de sa capacité métabolique pourrait engendrer une augmentation de concentrations à un seuil critique de toxicité cardiaque.

Finalement, l'estimation des clairances dans les microsomes de cœurs humains et dans les rhCYP2J2 ont permis d'estimer le paramètre RAF. Ceui-ci représente un facteur d'activité relative entre les deux systèmes utilisés (microsomes et rhCYP450) pour pondérer l'activité microsomale de substrats par la voie du CYP2J2. L'équation<sup>430</sup> est le quotient de la clairance intrinsèque dans les microsomes de cœurs du substrat ébastine (moyenne des 18 patients =  $15 \mu\text{l} / \text{min} / \text{mg}$  de protéines) par sa clairance dans les rhCYP2J2 (chapitre 2;  $47,7 \mu\text{l} / \text{min} / \text{pmoles CYP2J2}$ ). Le RAF obtenue de  $0.31 \pm 0.21$

pmoles de CYP2J2 / mg de protéines (CV 69%) peut ensuite être utilisé avec d'autres substrats pour pondérer leur clairance relative associée avec le CYP2J2 dans les microsomes de ventricules de cœurs humains. Bien qu'il ne s'agisse pas de la quantité exacte de pmoles de CYP2J2 exprimée dans le tissu microsomal, ce paramètre donne une idée de la contribution de l'isoenzyme dans le pool métabolique des microsomes étudiés.<sup>181</sup> D'ailleurs, la valeur calculée de 0.31 est comparable à la quantité estimée de CYP2J2 dans le cœur de 8 individus ( $\bar{x} = 0,17 \pm 0.05$  pmol / mg, variant de 0.05-0.4 pmol/mg).<sup>214</sup> Il est probable que l'expression du CYP2J2 dans le ventricule de cœurs humains pourrait être encore plus variable chez différentes sous-populations avec des pathologies ou facteurs génétiques connus pour influencer l'expression des CYP450s. De plus, la variabilité des paramètres cinétiques d'hydroxylation d'ébastine entre les 18 patients étudiés (> 60%) suggère que la fonction métabolique du CYP2J2 est influencée par certains facteurs encore inconnus. Il était donc pertinent de poursuivre mes études doctorales sur l'étude des facteurs pouvant expliquer l'expression du CYP2J2 et son activité dans les microsomes de cœurs humains.

**Tableau 5.** Extrapolation *in vitro/in vivo* de la clairance intrinsèque d'ébastine à partir de la cinétique avec les rhCYP450s selon la méthode d'abondance des CYP450s.

Organe	Réaction	rhCYP450	1. CL <sub>int,in vitro</sub>	2. Abondance CYP450 dans la matrice	3. Facteur d'extrapolation A	4. CL <sub>int</sub> / poids du tissu (colonne 1x2x3)	5. Facteur d'extrapolation B	6. CL <sub>int-In Vivo</sub> (colonne 4 X 5)
			μL/min/ pmol rhCYP450	pmoles P450 / mg	mg / g	μl / min / g tissu	g	ml / min
Foie	Hydroxylation	CYP2J2	47,7	1,7 <sup>434,435</sup>	30	2295	1561 <sup>436</sup>	3582,5
		CYP3A4	0,02 <sup>259</sup>	68,10 <sup>437</sup>	30	41		63,8
		CYP3A5	0,06 <sup>259</sup>	14,20 <sup>437</sup>	30	26		39,9
	Désalkylation	CYP3A4	0,44 <sup>259</sup>	68,10	30	899		1403,2
		CYP3A5	0,13 <sup>259</sup>	14,20	30	55		86,4
Coeur	Hydroxylation	CYP2J2	45	0,17 <sup>214</sup>	3	23	285 <sup>438</sup>	6,6

**Tableau 6.** Comparaison des méthodes d'extrapolation *in vitro/in vivo* basées sur la 1) cinétique microsomale versus 2) cinétique/abondance d'isoenzymes recombinantes (rhCYP450).

		Méthode 1 (microsomale)	Méthode 2 (cinétique/abondance CYP450)		
		CL <sub>int,in vivo</sub>			CL <sub>int,in vivo</sub>
Organ	Réaction	composante 1	composant e 2	isoenzyme	composant e 1
Foie	hydroxylation	7207	1310	CYP2J2	4177
				CYP3A4	63,8
				CYP3A5	39,9
	N-désalkylation	1474*		CYP3A4	1403,2
				CYP3A5	86,4
Somme des voies métaboliques		9991			5770
Cœur	hydroxylation	13,6 (0,7-50,6)		CYP2J2	6,6 (1,9- 15,4)
	N-désalkylation	<i>non détectable</i>			

\*calculé selon la technique mentionnée dans le manuscrit II avec une CL<sub>int,In Vitro</sub> de 27 µL/min/mg de protéines (données internes)

#### **4. Chapitre 4 – Manuscrit 3**

**Étude des facteurs prédictifs de la variabilité observée dans la clairance du CYP2J2 dans le ventricule de cœurs humains.**

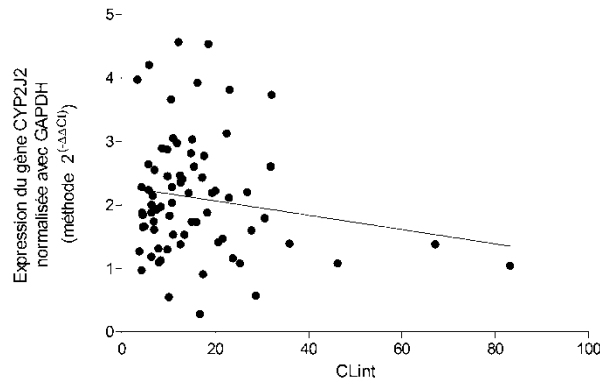
## 4.1 Avant-propos

### 4.1.1 Introduction

Nous avons pu établir dans le chapitre précédent que l'hydroxylation du substrat marqueur ébastine reflète l'activité de l'isoenzyme CYP2J2 dans la fraction microsomale de ventricules de cœurs humains explantés de patients ayant des cardiomyopathies. Ces résultats ont aussi permis d'établir pour la première fois que la clairance du substrat ébastine avec les MCH était hautement variable entre les individus. Il est connu qu'une grande variabilité existe dans l'expression et l'activité des isoenzymes du CYP450 dans le foie mais au niveau extrahépatique, peu d'études ont évalué l'ampleur de la variabilité entre les individus au niveau de leurs expressions mais aussi de leur activité sur de larges cohortes de tissus.

Les facteurs responsables de la variabilité associée à l'expression et à l'activité sont souvent imputés aux polymorphismes génétiques existant pour chacune des isoenzymes.<sup>439</sup> Malgré tous les efforts effectués d'associer les variations génétiques à l'expression et à l'activité des CYP450s, celles-ci ne peuvent souvent qu'expliquer moins de 30% de la variabilité entre les individus.<sup>440</sup> D'autres facteurs sont connus pour influencer l'expression et l'activité des CYP450s tel que le sexe (genre), la maladie, l'environnement, la race et l'âge.<sup>441,442</sup> [ENREF 350](#)

Au niveau du CYP2J2, le premier facteur introduit dans le modèle fut le facteur génétique. Seulement un des 4 polymorphismes étudiés était exprimé dans les cœurs étudiées donc seul le variant allélique CYP2J2\*7 fut intégré dans le modèle. Les informations sur les patients étant limitées, nous avons introduit le maximum de données disponibles dans le modèle afin de pouvoir prédire au maximum la variabilité autant dans l'expression de l'isoenzyme CYP2J2 que dans son activité.



**Figure 29.** Corrélation entre l'expression de l'ARNm du CYP2J2 et l'activité d'hydroxylation du substrat ébastine associée avec les MCH obtenue dans la cohorte des 74 patients étudiés dans le manuscrit suivant.

Il est à noter que la corrélation entre l'expression de l'ARNm du CYP2J2 et l'activité associée est moins de 2,5 % ( $r^2$ ) (**Figure 29**). Cette absence de corrélation entre l'ARNmessenger d'une isoenzyme et son activité métabolique associée est expliquée dans la littérature par l'existence de mécanismes post-transcriptionnels influençant l'activité de la protéine indépendamment de ces niveaux d'ARNm.<sup>442</sup> Il fut, par exemple, démontré que la corrélation entre la capacité d'hydroxyler le midazolam en 1-hydroxymidazolam par les HLM et la quantité de protéines du CYP3A4 était beaucoup plus proche de l'unité que celle entre l'expression de l'ARNm du CYP3A4 et la quantité de protéines du CYP3A4.<sup>443</sup> Par ailleurs, une autre étude démontre une faible corrélation (<20%) entre la quantité d'ARNm et les protéines des CYP1A2, 2A6, 2C9, 2E1 et 4A11 dans les HLM.<sup>444</sup> De façon similaire à l'exemple précédent, la corrélation entre l'activité enzymatique avec des substrats marqueurs et la quantité de protéines de l'isoenzyme associée a fait grimper la corrélation à plus de 60% pour toutes les isoenzymes à l'exception du CYP4A11 et son substrat marqueur l'acide dodécanoïque.<sup>444</sup> Ceci suggère une meilleure corrélation entre la quantité de protéines d'isoenzymes et l'activité enzymatique de substrats-types versus la corrélation entre l'expression de l'ARNm d'une isoenzyme et l'activité enzymatique associée par un substrat-type.<sup>444</sup> Ces observations ne concordent pas avec les résultats rapportés par Temesvári et ses collègues démontrant une forte corrélation entre l'ARNm exprimé dans les HLM des isoenzymes CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A et la réaction métabolique spécifique



et respective des substrats marqueurs phénacétine, tolbutamide, méphénytoïne, dextrométorphane et midazolam.<sup>442</sup>

La technique de quantification de protéines des isoenzymes du CYP450 par LC-MSMS était inaccessible dans notre laboratoire lors de mes études doctorales. Ainsi, nous avons rapporté l'activité enzymatique selon la quantité de protéines totales ce qui peut diminuer la précision des résultats. Par contre, l'utilisation de marqueurs sélectifs envers le CYP2J2 diminue l'ampleur de cette limite. Finalement, l'absence d'une corrélation entre l'expression de l'ARNm de l'isoenzyme CYP2J2 et l'activité métabolique envers le substrat ébastine avec les MCH (Figure 29) suggère que différents facteurs sont responsables de son comportement et par défaut génèrent une variabilité entre les individus.

Connaître les facteurs prédictifs responsables de la variabilité interindividuelle dans l'expression et l'activité des CYP450s au niveau des tissus extrahépatiques permettrait de comprendre la susceptibilité d'un individu à réagir différemment lorsqu'exposé à un substrat potentiel et de prévenir une toxicité éventuelle. Également, nous pourrions mieux comprendre les facteurs qui peuvent influencer le comportement d'une isoenzyme dans le ventricule de cœurs humains et ainsi comprendre les situations physiologiques générant des changements dans son expression et son activité. Le manuscrit suivant expose les résultats des essais effectués pour répondre à ces objectifs.

#### **4.1.2 Statut actuel du manuscrit**

En préparation pour soumission dans *Circulation*.

## 4.2 Manuscrit III

## TITLE PAGE

**Title:** CYP2J2 mRNA levels and activities in human cardiac ventricular tissues.

**Short title:** CYP2J2 activities in human heart microsomes.

**Author's Name, degrees and affiliations:**

Jade Huguet : Ph.D. Candidate, 1-2

Véronique Michaud; B.Pharm., Ph.D., 1-2

Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D., FCAHS. 1-2

Affiliations:

1. CRCHUM (Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal) Montréal, Qc, Canada.
2. Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montréal, Qc, Canada.

**Address correspondence:**

Jacques Turgeon, BPharm., Ph.D., FCAHS

Tabula Rasa Health Care

110 Marter Avenue, Suite 309

Moorestown, NJ 08057, USA

**Number of text pages: 30**

**Number of figures (MAX: 8): 2 (1 in main text, 1 in sup files)**

**Number of tables: 6 (5 in main text, 1 in sup files)**

**Number of references (MAX 50): 64**

**Number of words in the Abstract (MAX 250): 227**

**Number of words in the Introduction: 759**

**Number of words in the Discussion: 2089**

**Number of words in the References: 2040**

**Number of words in the Results: 1138**

**Number of words in the Methods: 1618**

**Number of words in tables: 947**

**Overall (MAX 7000): 7984**

**Subject Code:**

118 Cardiovascular Pharmacology

## Abstract

**Background:** Intersubject variability in extra-hepatic CYP450 activity could influence, in a tissue-specific manner, drug actions. CYP2J2 is the major CYP450 isoenzyme expressed in human heart. Our objectives were to determine CYP2J2 mRNA levels and activities in a large cohort of human cardiac ventricular samples using ebastine as a probe substrate for this isoenzyme. We also determined the impact of *CYP2J2* variant alleles and performed a multivariate analysis to identify major determinants of intersubject variability in CYP2J2 activity.

**Methods and results:** Human ventricular tissues (away from scar zones) were obtained from 74 patients undergoing cardiac transplantation. Experiments performed with human heart microsomes (HHM), human liver microsomes (HLM) and recombinant human CYP2J2 (rhCYP2J2) demonstrated that CYP2J2 is the major enzyme responsible for ebastine metabolism in human heart with  $K_m$  and  $V_{max}$  values of  $0.19 \pm 0.23 \mu\text{M}$  and  $3.1 \pm 4.0 \text{ nmol/mg protein/min}$ , respectively. The *CYP2J2*\*7 variant allele was observed only in tissues from patients with a non-ischemic disease (15%;  $p > 0.05$ ). No difference in CYP2J2 mRNA expression levels and ebastine kinetics parameters was observed between patients with a *CYP2J2*\*1\*1 or \*1\*7 genotypes. High inter-patient variability in CYP2J2 mRNA levels (CV=44%), ebastine  $CL_{int}$  (CV = 83%) and  $K_m$  (CV=119%) were observed. Multivariate analyses considering twelve patients' variables could explain 21%, 16%, 8% and 19% of inter-patient variability observed in CYP2J2 mRNA levels, ebastine  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $CL_{int}$ , respectively.

Conclusions: Our results suggest that cardiac drug metabolism could be relevant for the control of intracellular drug concentrations and thereby could modulate drug response in human heart.

Keywords (3-5): pharmacology, ventricles, CYP450.

## Introduction

Inter-individual variability in CYP450-mediated metabolism influences drug systemic clearance and hence, drug action.<sup>1</sup> Mostly governed by the intestines and the liver, drug clearance is also known to occur in extra-intestinal and extra-hepatic tissues.<sup>2-6</sup> CYP450 isoenzymes are expressed in various tissues such as the kidneys, brain, lung, skin and the heart.<sup>7-9</sup> The tissue diversity in which CYP450s are expressed may lead to local control of intracellular drug concentrations and tissue-specific formation of active/toxic metabolites.

Human heart cells, such as endothelial cells and cardiomyocytes, express at different levels and with unique profiles the CYP450 enzymatic system.<sup>5, 10, 11</sup> For instance, CYP2J2 mRNA is the most abundant CYP450 mRNA in the human heart.<sup>5</sup> The first report pertaining to the expression of CYP2J2 in the human heart was in 1996.<sup>12</sup> It was also the first time that high inter-individual variability in CYP2J2 protein expression was demonstrated using tissues from three normal human hearts.<sup>12</sup> Following this report, Delozier *et al.* reported a large inter-individual variability in CYP2J2 mRNA and protein expression in eight human hearts.<sup>13</sup> Indeed, there was a 9-fold variation in CYP2J2 mRNA expression among heart samples although no correlation was observed between mRNA levels and protein expression.<sup>13</sup> A much larger study was performed by our group with 66 explanted human hearts showing also a 9-fold variation in CYP2J2 mRNA expression levels in ventricular samples.<sup>5</sup> Segregation into different groups did not explain this variability as there was no difference in mRNA expression levels in samples obtained from patients with ischemic *versus* non-ischemic cardiomyopathies nor between samples from the left and right ventricles.<sup>5</sup>

Specific epoxyeicosatrienoic acid (EETs) metabolites formed by the arachidonic acid epoxygenase pathway are endogenous biomarkers of CYP2J2 activity.<sup>14</sup> A 30 to 90-fold variation in the cleared stable down products of the epoxygenase pathway, dihydroxyeicosatrienoic acid (DHET), was observed in urine of pregnant women with induced hypertension.<sup>15</sup> This was the first report to acknowledge, *in vivo*, inter-patient variability in CYP2J2 activity.<sup>12</sup>

CYP2J2 is a polymorphic enzyme with the most frequent single nucleotide polymorphism (SNP) located 50 base pairs upstream of the transcription start site (*CYP2J2*\*7: *G-50T*). This variant allele might reduce CYP2J2 promoter activity and gene transcription.<sup>16</sup> Spiecker *et al.* showed lower 14,15-DHET concentrations in patients carrying the *CYP2J2*\*7 variant (n=8) compared to *CYP2J2*\*1\*1 genotype (n=7) suggesting that the mutation decreases the production of CYP2J2-dependent arachidonic acid metabolites.<sup>16</sup> There was a 2-fold variation in plasma concentrations of DHET metabolites in both groups suggesting that other mechanisms are responsible for the observed variability.<sup>16</sup> The same cohort study (544 patients) demonstrated a close (p=0.026) association between *CYP2J2*\*7 (*GT* and *TT*) genotype and cardiovascular disease (CAD).<sup>16</sup> In another study involving 576 patients, *CYP2J2*\*7 was associated with an increased risk of hypertension (OR 4.03, 95% CI 1.8-9.04, p = 0.0004).<sup>17</sup> Such results were not reproduced in 5740 patients from the Malmö Diet and Cancer study showing no association between *CYP2J2*\*7 polymorphism and cardiovascular events or hypertension.<sup>18</sup> Yet, in another study, controversial results were obtained where *CYP2J2*\*7 genotype was associated with a decreased risk of hypertension in Caucasian males.<sup>19</sup> Fava and colleagues reviewed all *CYP2J2*\*7 genotype associated studies



performed in human and could not come to a consensus in regards of the protective, deleterious or neutral effects of the *CYP2J2*\*7 variant allele nor on its potential association with cardiovascular events, hypertension or ischemia.<sup>20</sup>

To date, there is no report relating variability in human heart *CYP2J2* enzyme activity to intrinsic or extrinsic factors responsible for this variability. Our study objectives were to 1) determine *CYP2J2* mRNA levels and activities in a large cohort of human cardiac ventricular samples using ebastine as a probe substrate for this isoenzyme, 2) determine the impact of *CYP2J2* variant alleles on *CYP2J2* activity, and, 3) perform a multivariate analysis to identify major determinants of intersubject variability in *CYP2J2* activity.<sup>21-28</sup>

## **Methods**

### **Reagents**

All reagents were obtained from commercial sources. Details are provided in Supplemental file.

### **Microsome isolation from explanted human hearts.**

Explanted human hearts were obtained from the Réseau d'Échange de Tissus et d'Échantillons Biologiques (RETEB), from the Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec. Written consent was signed by patients and the use of human heart tissues was approved in accordance with regulation of the Ethic Review Board of the Montreal Heart Institute. Human hearts were obtained from 74 subjects suffering from end-stage heart failure undergoing heart transplantation. Immediately after explantation, the hearts were immersed in a cold transplantation buffer, rapidly mounted on an extracorporeal circulation and perfused for 10 minutes with the same buffer. Left and right ventricular

samples (5-20 g) were prepared from samples of the apex region or slightly above but outside of apparent ischemic scars. These samples were immediately frozen in liquid nitrogen.

Before use, human heart samples were thawed slowly, on ice, to prepare human heart microsomes (HHM) as described previously.<sup>5</sup> Samples from the left ventricle (n=57): twenty of them were male patients with a clinical diagnostic of ischemia, twenty were male with other clinical diagnostic of cardiomyopathies and seventeen of them were women with cardiomyopathies. Samples from the right ventricle (n=17): 7 were from male patients with ischemic cardiomyopathy and ten were from male non-ischemic hearts.

**Microsomal incubations with HHM, Human Liver Microsomes (HLM), human recombinant CYP2J2 (rhCYP2J2) microsomes.**

Microsomes were thawed on ice. Incubations were performed in an incubating microplate shaker in 2 mL Eppendorf tubes containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.4), a NADPH-regenerating system and the substrate ebastine at various concentrations (0.075, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 4 and 8  $\mu$ M ). This mixture was preincubated at 37°C for 10 min in a shaking bath at 300 rpm. Reaction was initiated with the addition of HHM (50-75  $\mu$ l; 370 – 555  $\mu$ g of proteins), HLM (0.12 mg of proteins / ml), rhCYP2J2 (0.3 pmol of CYP2J2 / ml). Reaction was stopped by the addition of ice-cold methanol containing internal standards for all metabolites (refer to LC-MSMS method section for details). Incubation mixture was centrifuged at 13 000 rpm for 10 minutes. Supernatant was injected into the LC-MSMS.

### **LC-MSMS Analysis Methods: quantification of hydroxyebastine, carebastine and desalkylebastine.**

Analyses were performed using an isocratic mobile phase with a Thermo Scientific Aquasil C18 column (100 x 2.1 mm I.D., 5 m) operating at 40°C. The mobile phase conditions consisted of acetonitrile and 10 mM ammonium formate in type 1 water pH 3.0 at a ratio of 40:60, respectively. The flow rate was fixed at 0.30 mL/min. Ten microliters of the extracted solution was injected and the total run time was set at 10.0 min. The mass spectrometer was interfaced with a Shimadzu Prominence series UFLC pump and auto sampler (Kyoto, Japan) using a pneumatic assisted heated electrospray ion source (HESI). MS detection was performed in positive ion mode, using selected reaction monitoring (SRM). The precursor-ion reactions were set at 486 → 167 for hydroxyebastine, 500 → 167 for carebastine, 268 → 167 for desalkylebastine. The SRM transitions selected for the internal standards were set at 273 → 172, 505 → 172 and 491 → 172 for <sup>2</sup>H5-desalkylebastine, <sup>2</sup>H5-carebastine and <sup>2</sup>H5-hydroxyebastine, respectively. The HESI electrode was set to 3500 V. The capillary temperature was set at 300°C. Argon was used as collision gas at a pressure of 1.5 mTorr.

### **Protein quantification in microsomal preparations.**

Protein quantification was performed with the Pierce® BCA Protein Assay Kit following the standard protocol.

### **CYP2J2 mRNA extraction.**

RNA extraction was performed with approximately 50-100 mg of human heart tissues homogenized in 1 mL of Trizol (Life Technologies Inc, Burlington, USA) and transferred to a 2 mL tube. Chloroform (200 µl) was added, the mixture shaken for 15

seconds, and then centrifuged at 13 000g for 30 minutes (at 4°C). The upper aqueous layer was transferred and ethanol was added (1:1) in a fresh collecting tube. This solution was extracted using the RNA Qiagen kit (RNeasy Mini kit; Qiagen, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions and kept frozen at -80°C until quantified.

RNA concentration was quantified using a spectrophotometer at  $\lambda=260$  nm. Following quantification, 1  $\mu$ g of total RNA from each sample was used to create the complementary DNA (cDNA) by reverse transcriptase reaction. Briefly, transcription was performed using 6  $\mu$ g of random primer (Life Technologies Inc, Burlington, USA), 1.25 mM of dNTP (Wisent, St-Bruno, CAN), 4 $\mu$ L of first-strand 5X buffer, 2 $\mu$ L of DTT at 0,1mM and the reverse transcription was performed using 200 units of Reverse Transcriptase SuperScript® II (Life Technologies Inc, Burlington, USA) in water. Reverse transcription was carried out for 50 minutes at 42°C and stopped by heating to 70°C for 15 minutes. PCR was performed with the PCR Thermal Cycler model PTC-100 from MJ Research (Watertown, MA, USA). The resulting cDNA (50  $\mu$ g/ $\mu$ L) was frozen at -80°C until analyzed.

#### **CYP2J2 mRNA quantification.**

cDNA analysis was performed using the TaqMan® Gene Expression Assay. The probe used for CYP2J2 gene was Hs00951113\_m1 (Life Technologies, Pleasanton, CA, USA). The cDNA was amplified following a sequence of thermal cycling (Taqman® qRT-PCR): a 10 minute holding period at 95°C followed by a sequence of thermal cycling consisting in 45 cycles of denaturation (95°C, 10 seconds) followed by annealing and extension (60°C, 45 seconds).

The calibrator (pool of human heart RNA, Clontech, San-Francisco, USA) was introduced in the experiment using the exact same technic enabling us to quantify the CYP2J2 mRNA levels between individuals as per the comparative Ct method ( $2^{-\Delta Ct}$ ,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method), where the  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  of a human heart sample -  $\Delta Ct$  of the reference (calibrator, pool human heart RNA). The  $\Delta Ct$  of a human heart sample =  $Ct$  of the CYP2J2 –  $Ct$  of the housekeeping gene (GAPDH), and  $\Delta Ct$  of the reference (calibrator, pool human heart RNA) =  $Ct$  of the pool -  $Ct$  of the housekeeping gene (GAPDH). PCR was performed with the Rotagene 6000 and results analyzed using the Rotagene 6000 software (Corbett Research, Mortlake, Australia).

#### **CYP2J2 SNP Genotyping Assay**

DNA isolation was performed as per the GenElute™ Blood Genomic DNA manufacturer protocol. Genotyping for the four known variants, *i.e.*, CYP2J2\*2, \*3, \*6 and \*7 was performed by Taqman® qRT-PCR SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems [ABS]). The probe used for the SNP Genotyping Assay were C\_27859819\_10 for CYP2J2\*2 (427A>G), C\_27859818\_20 for CYP2J2\*3 (472C>T), C\_2785821\_10 for CYP2J2\*6 (1210A>T) and C\_9581699\_80 for CYP2J2\*7 (-50G>T) (Life Technologies, Thermo Fisher, USA). The DNA was mixed with the probe and the Taqman enzyme. The mix was submitted to a sequence of thermal cycling (Taqman® qRT-PCR) consisting of a 10 minute holding period 95°C followed by 50 cycles for denaturation of the DNA strand (92°C, 15 seconds) followed by annealing of the probe and extension with signal generation (60°C, 90 seconds) using the Rotagene 6000 and Rotagene 6000 software (Corbett Research).

#### **Data and statistical analysis.**

All assays were performed in triplicate and the velocity (V) was estimated by dividing the metabolite concentration obtained from the LC-MSMS analysis by the incubation time and the quantity of proteins (in mg).

Apparent kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) of ebastine hydroxylation were calculated by fitting the velocity (V) against the associated concentration of ebastine with nonlinear regression analysis. All data were plotted, fitted and statistically analyzed with GraphPad Prism Software Version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Intrinsic clearance was manually calculated by the equation:

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m + [S]}$$

Comparisons of mRNA levels,  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $CL_{int}$  between groups or between CYP2J2 genotype groups was performed using an unpaired t-test where  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### **Multivariate Analysis.**

Baseline characteristics and clinical events are presented as means $\pm$ SD for continuous variables and frequencies with proportions for categorical variables. Different characteristics variables were investigated to predict the linear relationship with mRNA levels,  $CL_{int}$ ,  $K_m$  and  $V_{max}$  (response variables). The selection process was performed using univariate analysis of each variable. Nominal variables were analyzed using Student's t-tests. Continuous variables were analyzed using univariate regression models. Continuous variables were checked for the assumption of linearity.

Different diagnosis approaches were investigated to ensure the normality and homogeneity of variance assumptions. All the dependent variables were log transformed to fulfill the assumptions. Variables whose univariate test had a p-value  $< 0.25$  were

candidate for the multivariate model building. The selection variables were performed using two statistical approaches. First, the forward and backward variable selections were used in the linear regression model. Both methods gave similar results. An alternative procedure to select variables was to use the best subset selection containing up to seven variables. The same approach was used for selection of interactions with main effects forced into the initial model. Using the 20 percent level of significance, no interaction effect was added to the linear model. A robust statistical regression approach (M-estimation) was performed for each response variable to investigate the stability of estimates. Both regression approaches gave similar estimates. The results were considered significant with  $p\text{-values} \leq 0.05$ . All analyses were conducted using the statistical package SAS, version 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC, U.S.A.) and R software, version 3.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## Results

Table 1 describes the demographic characteristics of patients used in this study. Patients were mostly men, with non-ischemic heart failure and samples were mostly obtained from the left ventricle. More than one third of patients (28/74) received chronic amiodarone treatment.

***CYP2J2 mRNA expression levels and ebastine hydroxylation by HHM prepared from explanted human hearts of patients with cardiomyopathies (Table 2).***

CYP2J2 relative mRNA levels were  $2.1 \pm 0.9$  as determined by the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  with a calibrator method. *In vitro* intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) of hydroxyebastine formation was  $16 \pm 13$   $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  protein with a coefficient of variation (CV) of 83%. The affinity constant ( $K_m$ ) was  $0.19 \pm 0.23$   $\mu\text{M}$  (CV 119%) and the maximal velocity was 3.1 pmol of hydroxyebastine /min/mg of proteins (CV 132%).

***Kinetic parameters obtained for ebastine hydroxylation and N-dealkylation-metabolism in HHM, HLM and rhCYP2J2 (Table 3).***

Our results, based on Eadie-Hofstee data transformation, showed that hydroxyebastine formation in HLM is mediated by at least two CYP450 isoenzymes. One component has high affinity/low capacity (1<sup>st</sup>) while the second component (2<sup>nd</sup>) has lower affinity and higher capacity. The  $K_m$  obtained for the formation of hydroxyebastine by HHM, HLM (Eadie-Hofstee analysis, 1<sup>st</sup> component) and rhCYP2J2 (sum of hydroxyebastine and its sequential metabolite carebastine) were very close at 0.19  $\mu\text{M}$ , 0.22  $\mu\text{M}$  and 0.34  $\mu\text{M}$ , respectively. The  $K_m$  of the 2<sup>nd</sup> component observed from our Eadie-Hofstee kinetic analysis was 8.4  $\mu\text{M}$ : this value is similar to a  $K_m$  of 6.5  $\mu\text{M}$  estimated if a conventional



Michaelis-Menten analysis is performed. Desalkylebastine was not formed when incubated with HHM or rhCYP2J2.

***CYP2J2\*7 genotype and kinetics for hydroxyebastine formation (Table 4).***

This analysis was performed in samples obtained from male patients' left ventricles (n=40: 20 ischemic and 20 non-ischemic hearts), from male patients' right ventricles (n=17: 7 ischemic and 10 non-ischemic hearts) and women left ventricles (n=17: 17 non-ischemic). *CYP2J2\*2*, *\*3* and *\*6* variants were not observed in any of the heart samples analyzed. *CYP2J2\*7* variant was observed only in non-ischemic left ventricular samples with an allele frequency of 15% (n=6/40). Among subjects with a *CYP2J2\*1\*1* genotype, *CYP2J2\*1\*1* mRNA expression levels were lower in male ischemic left ventricular tissues compared to women non ischemic left ventricular samples (p<0.05). Ebastine intrinsic clearance values for the *CYP2J2\*1\*1* and *CYP2J2\*1\*7* genotypes tended to be higher in non-ischemic hearts compared to all other groups (23±20µl/min/mg of proteins in *\*1\*1* and 29±20 in *\*1\*7* > 14±11 in ischemic patients > 13±8 in women > 12.5±4.8 in right ventricular samples ) without being significant (p>0.05).

***Multivariate analyses (Table 5).***

Twelve different characteristics were estimated in a multiple linear regression analysis on 4 different dependent variables (*CYP2J2* mRNA levels,  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $CL_{int}$ ). *CYP2J2* mRNA inter-patient variability was significantly associated with weight, left ventricle samples and male gender as independent variables and one interaction was observed with ventricle side and weight. The predictive value of the multivariate model including the 3 independent variables was 21% (Supplementary Figure 1A). The fitted values were

symmetrically distributed along the regression line with a tendency of the model to overestimate the fitted values (Supplementary Figure 2A).

Inter-patient variability for  $K_m$  was best explained by 3 characteristics pertaining to medications taken by the patients: use of amiodarone, use of strong substrates of CYP3A and use of corticosteroids. Those 3 characteristics were able to explain 16% of the variability observed between patients (Supplementary Figure 1B). Residuals computed versus predicted values are all positive suggesting that the model underestimate the fitted values (Appendix, Figure 2B).

Amiodarone use was the only independent factor able to describe 8% of variability observed in  $V_{max}$  values (Supplementary Figure 1C). Amiodarone usage was associated with an increase in  $V_{max}$  values. The error of prediction was evenly distributed across the residual zero line and the spread of the left residuals ( $X=0$ , no amiodarone) was similar to the right ( $X=1$ , + amiodarone). (Supplementary Figure 2C).

The scattered plot created from the predicted values against the observed values for the  $CL_{int}$  exposes the multivariate model where together, the BMI, ventricle side (left), ischemia and gender (male) contribute to 19% of the inter-patient variability observed in the CYP2J2-mediated intrinsic clearance of ebastine in HHM (Supplementary Figure 1D). The model tended to overestimate the intrinsic clearance (Supplementary Figure 2D).

## Discussion

This is the first study measuring CYP2J2 mRNA levels and ebastine hydroxylation metabolism, a probe substrate of CYP2J2, in microsomes prepared from a large cohort of human explanted hearts. We compared kinetics behavior of ebastine metabolism from five different systems (HHM, HLM, rhCYP2J2) enabling us to conclude that ebastine hydroxylation in HHM reflects CYP2J2 activity. We showed no difference between *CYP2J2\*1\*1* and *\*1\*7* genotypes for CYP2J2 mRNA expression levels and ebastine kinetics parameters. However, *CYP2J2\*7* was only observed in non-ischemic hearts. A statistically significant difference was observed between *CYP2J2\*1\*1* mRNA levels between ischemic men vs non-ischemic women left ventricular samples ( $p < 0.05$ ). Our results revealed high inter-patient variability in CYP2J2 mRNA levels (44%),  $CL_{int}$  (CV = 83%),  $K_m$  (CV=119%), and  $V_{max}$  (CV=132%) among patients with cardiomyopathies. The multivariate analysis explained 21%, 16%, 8% and 19% of the inter-patient variability observed in CYP2J2 mRNA levels and kinetic parameters ( $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $CL_{int}$ ). Associations were also found between CYP2J2 mRNA levels or ebastine kinetic parameters and weight, BMI, ventricle side (left), gender (male), clinical diagnostic of ischemic heart or drug history (use of amiodarone, verapamil/cyclosporine or corticosteroids).

Genotype, protein expression and catalytic activity for CYP450s do not always correlate.<sup>29, 30</sup> Hence, a direct measure of enzymatic activity is a better indicator of the influence independent variables have on a specific metabolic pathway.<sup>30</sup> Still this evaluation may remain technically difficult requiring tissue accessibility, very sensitive analyses and relevant probe for selective metabolic pathways, and known metabolites.

Ebastine is metabolized through two different pathways: a sequential oxidative pathway which produces hydroxyebastine and carebastine and an oxidative dealkylation leading to the formation of the N-dealkylated metabolite.<sup>28</sup> The contribution of each pathway in ebastine clearance could vary depending on tissue specific pattern of expression of CYP450 isoenzymes. In our study, kinetics determined in liver microsomes for the hydroxyebastine pathway using a Michaelis-Menten approach yielded similar results of  $K_m$  (6.5  $\mu\text{M}$ ) compared to previously published results: 3  $\mu\text{M}$ ,<sup>31</sup> 5.1  $\mu\text{M}$ ,<sup>28</sup> and 5.3  $\mu\text{M}$ .<sup>32</sup> On the other hand, use of Eadie-Hofstee transformation of data led us to suggest that a two component enzymatic process is involved in the hydroxylation of ebastine in HLM. One of high affinity/low capacity (CYP2J2). Liver<sup>28, 31</sup>, intestine<sup>33</sup> and heart ventricular enzyme kinetics ( $K_m$ ,  $V_{\max}$  and  $CL_{\text{int}}$  values) when compared, indicate the importance of CYP2J2 and 3A4/5 pathways in ebastine clearance and clearly showed that ebastine hydroxylation in HHM is CYP2J2-dependent. For instance,  $K_m$  constants for both rhCYP2J2 and HHM (0.24 vs 0.19  $\mu\text{M}$ ) are similar,<sup>34</sup> and the CYP2J2 pathway prevailed in HHM where CYP3A pathway is absent (no desalkylebastine formed). CYP2J2 protein is expressed in the endothelium of coronary arteries as well as in the cardiomyocytes of the heart but not in the aorta nor the vena cava.<sup>12, 13, 35</sup> CYP2J2 expression in cardiomyocytes of human heart was further confirmed by immunohistochemistry.<sup>5, 11</sup> Using the whole ventricular tissue could be a limitation in our study to conclude that the metabolism observed is essentially occurring in the cardiomyocytes as we could not discriminate between cell types responsible for the observed activity. Indeed, homogenization of the whole ventricular tissue abled us to isolate the microsomal fraction expressing different CYP450 isoenzymes<sup>5</sup> of all the

diverse cell pool in the ventricle i.e., cardiac muscle cells, endothelial cells, smooth muscle cells from the coronary vasculature and endocardium, mast cells, fibroblasts, cells related to the immune system and more recently discovered pluripotent cardiac stem cells.<sup>36</sup>

Heart transplantation is generally performed on hearts diagnosed with ischemic cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomyopathy.<sup>37</sup> Ischemia is an important clinical condition known to influence CYP450 expression and activity because of the inflammatory processes involved that alter CYP450 epoxygenase pathways, including CYP2J isoforms.<sup>38</sup> Among the CYP450 epoxygenase isoenzymes expressed in the heart, CYP2J2 metabolizes free arachidonic acid to biologically active epoxide metabolites, epoxyeicosatreinoic acids (EET).<sup>12</sup> Many studies have focused on the effects of CYP2J2-derived arachidonic acid metabolites (EET) from endothelial cells or from cardiomyocytes on metabolism, inflammation, vascular tone, angiogenesis and cell proliferation increasing the importance of CYP2J2 for the vascular homeostasis.<sup>39, 40</sup> Ischemia can trigger the activation of phospholipase A2 which releases membrane bound arachidonic acid.<sup>35, 41</sup> Therefore, there is a probable association between ischemia and EET formation from CYP2J2-arachidonic acid epoxidation under pathophysiological conditions. Alteration in CYP2J2 capacity can therefore compromise the EET production and in the meantime, their anti-inflammatory, vasodilatory and cardioprotective effects on the heart.<sup>35, 42</sup> Indeed, one of the most interesting finding in our study is that ischemia is statistically associated ( $p=0.0118$ ) with a negative effect ( $\beta=-0.43$ ) on the interpatient variability observed for the  $CL_{int}$  of ebastine hydroxylation among patients. Together with BMI, gender (male) and ventricle side (left), ischemia

was able to explain 19% of the variability in ebastine  $CL_{int}$ . The decrease in metabolic capacity of CYP2J2-mediated ebastine hydroxylation and ischemia suggests a possible decrease in the CYP2J2-mediated EETs formation known to have cardioprotective effects.<sup>26</sup>

Gender stood out as a significant negative predictor of CYP2J2 mRNA levels ( $\beta = -0.471$ ,  $p=0.0027$ ) while positively related with the  $CL_{int}$  of ebastine hydroxylation ( $\beta = 0.69$ ,  $p=0.0014$ ). The left ventricular side also appeared to be a positive predictor of interpatient variability observed in CYP2J2 mRNA levels ( $\beta = 1.955$ ,  $p=0.0345$ ) and  $CL_{int}$  of ebastine hydroxylation ( $\beta = 0.345$ ,  $p=0.068$ ). This is the first report establishing a clear influence of the left ventricle side related to higher expression of CYP2J2 mRNA and intrinsic clearance of ebastine hydroxylation.

The use of amiodarone by 28 patients over 74 was significantly associated with the interindividual variability observed on ebastine affinity for CYP2J2 ( $\beta = 0.325$ ,  $p=0.012$ ) and maximal velocity of the enzyme ( $\beta = 0.56$ ,  $p=0.0126$ ). Amiodarone is an antiarrhythmic drug known to be a strong substrate of CYP3As and an inhibitor of CYP1A2, 2C9, 2D6 and CYP3As.<sup>43</sup> Amiodarone 4-hydroxylation appears to be mainly mediated by CYP2J2.<sup>28, 44, 45</sup> Amiodarone is highly involved in drug-drug interactions.<sup>46</sup>

The exact mechanism by which amiodarone is associated with interpatient variability seen for  $K_m$  and  $V_{max}$  of ebastine hydroxylation is not known but should most likely have occurred before transplantation. Amiodarone, being highly lipophilic, is known to distribute within the cardiomyocytes and could potentially have modulated CYP2J2 expression. Together with the use of amiodarone, strong substrates of CYP3As as well

as corticosteroids were able to explain approximately 16% of the variability observed between patients on the affinity of ebastine toward CYP2J2 in HHM.

Another possible source of variability was the allelic variant *CYP2J2\*7*. Since its discovery in 2002 it has become the subject of several studies trying to demonstrate its implication in the risk of cardiovascular diseases.<sup>20, 47</sup> A complete review of all studies performed (n=12) trying to correlate *CYP2J2\*7* polymorphism and the risk of cardiovascular disease or hypertension revealed that two studies showed higher prevalence in cardiovascular diseases (CAD)<sup>16, 48</sup>, two demonstrated lower risk of CAD<sup>49</sup> and hypertension,<sup>50</sup> one showed deleterious effects in hypertension<sup>17</sup> and seven studies failed to correlate the polymorphism and CAD<sup>18, 51-54</sup> or hypertension.<sup>55, 56</sup> Results from our cohort of patients showed that the heterozygous *CYP2J2\*1\*7* genotype frequency is 8 % (6/74) but no *CYP2J2\*7* variant was found in the ischemic group compared to 15% (6/40) in the non-ischemic samples. Our study revealed that the *CYP2J2\*7* polymorphism expressed in the non-ischemic cohort showed no statistical difference in the CL<sub>int</sub> of ebastine hydroxylation in HHM between the heterozygous *CYP2J2\*1\*7* (29±20 μL/min/mg of proteins) and wild type *CYP2J2\*1\*1* (23±20 μL/min/mg of proteins) genotype groups (p=0.55).

One very important area to which our studies could be applied is the drug-induced Long QT Syndrome. Indeed, it is well known that drugs bind to the HERG potassium protein mostly from an intracellular binding site.<sup>57</sup> It is also known that several CYP3A4 substrates show great affinity for HERG and can induce torsade de pointes.<sup>58</sup> And finally, there seems to exist a significant overlapping between CYP3As and CYP2J2 substrates.<sup>59</sup> Hence, a decrease in CYP3A4 and/or CYP2J2 activities would not only

lead to an increase in systemic concentrations of CYP3A4 substrates-HERG blockers (due to intestine/liver inhibition) but also to an increase in intracellular cardiac concentrations of CYP2J2 substrates-HERG blockers (due to cardiac inhibition of CYP2J2 activity), leading to an increased risk of torsade de pointes.

In conclusion, variability in extrahepatic CYP450-mediated metabolism needs to be more recognized and studied because of its relevance on local drug metabolism, even though the difficulty to obtain human tissue limits its development. Our results together with recent studies suggest that extrahepatic drug metabolism is relevant for the control of intracellular drug concentrations and consequently, for drug response.



## ACKNOWLEDGEMENTS

The corresponding author, Jacques Turgeon, certifies that:

Fleur Gaudette and François Bélanger have participated significantly to the analysis of samples in the course of this study. Their contribution should be acknowledged.

(1) all persons who have made substantial contributions in the manuscript (eg, data collection, analysis, or writing or editing assistance), but who do not fulfill authorship criteria, are named with their specific contributions in the Acknowledgments section of the manuscript;

(2) all persons named in the Acknowledgments section have provided the corresponding author with written permission to be named in the manuscript; and

(3) if an Acknowledgments section is not included, no other persons have made substantial contributions to this manuscript.

DISCLOSURES

None

## REFERENCES

1. Ma Q and Lu AYH. Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and Individualized Medicine. *Pharmacol Rev.* 2011;63:437-459.
2. Ding X and Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:149-73.
3. Park BK, Pirmohamed M and Kitteringham NR. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther.* 1995;68:385-424.
4. Krishna D and Klotz U. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. *Clin Pharmacokinet.* 1994;26:144-160.
5. Michaud V, Frappier M, Dumas M-C and Turgeon J. Metabolic Activity and mRNA Levels of Human Cardiac CYP450s Involved in Drug Metabolism. *PLoS One.* 2010;5:e15666.
6. Thum T and Borlak J. Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Br J Pharmacol.* 2000;130:1745-52.
7. de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP and Beaune PH. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253:387-394.
8. Pavek P and Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current drug metabolism.* 2008;9:129-43.
9. Miksys S and Tyndale RF. Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *J Psychiatry Neurosci.* 2013;38:152-63.
10. Chaudhary KR, Batchu SN and Seubert JM. Cytochrome P450 enzymes and the heart. *IUBMB Life.* 2009;61:954-960.
11. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS and Grant DF. Distribution of Soluble Epoxide Hydrolase and of Cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in Human Tissues. *J Histochem Cytochem.* 2004;52:447-454.

12. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR and Zeldin DC. Molecular Cloning and Expression of CYP2J2, a Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Highly Expressed in Heart. *J Biol Chem*. 1996;271:3460-3468.
13. DeLozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, Dai D, Foley JF, Bradbury JA, Murphy E, Steenbergen C, Zeldin DC and Goldstein JA. Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007;35:682-688.
14. Schuck RN, Zha W, Edin ML, Gruzdev A, Vendrov KC, Miller TM, Xu Z, Lih FB, DeGraff LM, Tomer KB, Jones HM, Makowski L, Huang L, Poloyac SM, Zeldin DC and Lee CR. The Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway Regulates the Hepatic Inflammatory Response in Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2014;9:e110162.
15. Catella F, Lawson JA, Fitzgerald DJ and FitzGerald GA. Endogenous biosynthesis of arachidonic acid epoxides in humans: increased formation in pregnancy-induced hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87:5893-5897.
16. Spiecker M, Darius H, Hankeln T, Soufi M, Sattler AM, Schaefer JR, Node K, Börgel J, Mügge A, Lindpaintner K, Huesing A, Maisch B, Zeldin DC and Liao JK. Risk of Coronary Artery Disease Associated With Polymorphism of the Cytochrome P450 Epoxygenase CYP2J2. *Circulation*. 2004;110:2132-2136.
17. Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Khoroshaya IV, Kozhuhov MA, Ivakin VE, Katargina LN and Kolesnikova OgE. A Common Polymorphism G-50T in Cytochrome P450 2J2 Gene Is Associated with Increased Risk of Essential Hypertension in a Russian Population. *Dis Markers*. 2008;24.
18. Fava C, Montagnana M, Almgren P, Hedblad B, Engstrom G, Berglund G, Minuz P and Melander O. The common functional polymorphism -50G>T of the CYP2J2 gene is not associated with ischemic coronary and cerebrovascular events in an urban-based sample of Swedes. *J Hypertens*. 2010;28:294-9.
19. King LM, Gainer JV, David GL, Dai D, Goldstein JA, Brown NJ and Zeldin DC. Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15:7-13.

20. Fava C, Ricci M, Melander O and Minuz P. Hypertension, cardiovascular risk and polymorphisms in genes controlling the cytochrome P450 pathway of arachidonic acid: A sex-specific relation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011[Epub ahead of print].
21. Chehal MKCK and Granville DJGJ. Cytochrome p450 2C (CYP2C) in ischemic heart injury and vascular dysfunction This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young Investigator's Forum. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84:15-20.
22. Chen W, Yang S, Ping W, Fu X, Xu Q and Wang J. CYP2J2 and EETs Protect Against Lung Ischemia/Reperfusion Injury via Anti-Inflammatory Effects *in Vivo* and *in Vitro*. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35:2043-2054.
23. Gottlieb RA. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys.* 2003;420:262-267.
24. Li R, Xu X, Chen C, Yu X, Edin ML, Degraff LM, Lee CR, Zeldin DC and Wang DW. Cytochrome P450 2J2 is protective against global cerebral ischemia in transgenic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2012;99:68-78.
25. Nithipatikom K, DiCamelli RF, Kohler S, Gumina RJ, Falck JR, Campbell WB and Gross GJ. Determination of Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic Acid in Coronary Venous Plasma during Ischemia and Reperfusion in Dogs. *Anal Biochem.* 2001;292:115-124.
26. Seubert J, Yang B, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Gabel S, Gooch R, Foley J, Newman J, Mao L, Rockman HA, Hammock BD, Murphy E and Zeldin DC. Enhanced Postischemic Functional Recovery in CYP2J2 Transgenic Hearts Involves Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels and p42/p44 MAPK Pathway. *Circ Res.* 2004;95:506-514.
27. Seubert JM, Zeldin DC, Nithipatikom K and Gross GJ. Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;82:50-59.
28. Liu K-H, Kim M-G, Lee D-J, Yoon Y-J, Kim M-J, Shon J-H, Choi CS, Choi YK, Desta Z and Shin J-G. Characterization of Ebastine, Hydroxyebastine, and Carebastine Metabolism by Human Liver Microsomes and Expressed Cytochrome P450

Enzymes: Major Roles for CYP2J2 and CYP3A. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006;34:1793-1797.

29. Schaefer O, Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Sakamoto A, Ishiguro N, Matsumaru T, Terasaki T and Ebner T. Absolute Quantification and Differential Expression of Drug Transporters, Cytochrome P450 Enzymes, and UDP-Glucuronosyltransferases in Cultured Primary Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012;40:93-103.

30. Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T and Terasaki T. Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metab Dispos*. 2012;40:83-92.

31. Phyllis Yerino, Paul Toren and Parkinson A. Evaluation of Ebastine Hydroxylation as a Specific Probe of CYP2J2 in Human Liver Microsomes. Paper presented at: ISSX; International Society for the Study of Xenobiotics, 8th International Meeting; 2007; Sendai, Japan.

32. Hashizume T, Mise M, Terauchi Y, Fujii LO, Toshihiko, Miyazaki H and Inaba T. N-Dealkylation and Hydroxylation of Ebastine by Human Liver Cytochrome P450. *Drug Metabolism and Disposition*. 1998;26:566-571.

33. Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T and Funae Y. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the Metabolism of Ebastine in Human Intestinal Microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300:298-304.

34. Crespi CL and Miller VP. The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes— state of the art and prospects for the future. *Pharmacol Ther*. 1999;84:121-131.

35. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC and Liao JK. Anti-inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Science*. 1999;285:1276-1279.

36. Tirziu D, Giordano FJ and Simons M. Cell Communications in the Heart. *Circulation*. 2010;122:928-937.

37. Shanewise J. Cardiac transplantation. *Anesthesiology Clinics of North America*. 2004;22:753-765.
38. Theken KN, Deng Y, Kannon MA, Miller TM, Poloyac SM and Lee CR. Activation of the Acute Inflammatory Response Alters Cytochrome P450 Expression and Eicosanoid Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011;39:22-29.
39. Askari A, Thomson SJ, Edin ML, Zeldin DC and Bishop-Bailey D. Roles of the epoxygenase CYP2J2 in the endothelium. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013;107:56-63.
40. Elbekai RH and El-Kadi AO. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther*. 2006;112:564-87.
41. Westphal C, Konkel A and Schunck W-H. CYP-eicosanoids—A new link between omega-3 fatty acids and cardiac disease? *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011;96:99-108.
42. Wang Y, Wei X, Xiao X, Hui R, Card JW, Carey MA, Wang DW and Zeldin DC. Arachidonic Acid Epoxygenase Metabolites Stimulate Endothelial Cell Growth and Angiogenesis via Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314:522-532.
43. Ohyama K, Nakajima M, Suzuki M, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T. Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: Prediction of in vivo drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;49:244-253.
44. Matsumoto S, Hirama T, Matsubara T, Nagata K and Yamazoe Y. Involvement of CYP2J2 on the Intestinal First-Pass Metabolism of Antihistamine Drug, Astemizole. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002;30:1240-1245.
45. Lee CA, Jones J, Katayama J, Kaspera R, Jiang Y, Freiwald S, Smith E, Walker G and Totah RA. Identifying a Selective Substrate and Inhibitor Pair for the Evaluation of CYP2J2 Activity. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012.
46. Armahizer MJ, Seybert AL, Smithburger PL and Kane-Gill SL. Drug-drug interactions contributing to QT prolongation in cardiac intensive care units. *J Crit Care*. 2013;28:243-249.

47. King LM, Ma J, Srettabunjong S, Graves J, Bradbury JA, Li L, Spiecker M, Liao JK, Mohrenweiser H and Zeldin DC. Cloning of CYP2J2 Gene and Identification of Functional Polymorphisms. *Mol Pharmacol*. 2002;61:840-852.
48. Liu P-Y, Li Y-H, Chao T-H, Wu H-L, Lin L-J, Tsai L-M and Chen J-H. Synergistic effect of cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2\*7 polymorphism with smoking on the onset of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2007;195:199-206.
49. Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G and Zeldin DC. CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17:349-358 10.1097/FPC.0b013e32809913ea.
50. King LM, Gainer JV, David GL, Dai D, Goldstein JA, Brown NJ and Zeldin DC. Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15:7-13.
51. Xu Y, Ding H, Peng J, Cui G, Liu L, Cianflone K and Wang DW. Association between polymorphisms of CYP2J2 and EPHX2 genes and risk of coronary artery disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21:489-494 10.1097/FPC.0b013e3283485eb2.
52. Borgel J Fau - Bulut D, Bulut D Fau - Hanefeld C, Hanefeld C Fau - Neubauer H, Neubauer H Fau - Mugge A, Mugge A Fau - Epplen JT, Epplen Jt Fau - Holland-Letz T, Holland-Letz T Fau - Spiecker M and Spiecker M. The CYP2J2 G-50T polymorphism and myocardial infarction in patients with cardiovascular risk profile.
53. Zhang L, Ding H, Yan J, Hui R, Wang W, Kissling GE, Zeldin DC and Wang DW. Genetic variation in cytochrome P450 2J2 and soluble epoxide hydrolase and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:45-51.
54. Hoffmann MM, Bugert P, Seelhorst U, Wellnitz B, Winkelmann BR, Boehm BO and März W. The -50G>T Polymorphism in the Promoter of the CYP2J2 Gene in Coronary Heart Disease: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Clin Chem*. 2007;53:539-540.
55. Dreisbach AW, Japa S, Sigel A, Parenti MB, Hess AE, Srinouanprachanh SL, Rettie AE, Kim H, Farin FM, Hamm LL and Lertora JJJ. The Prevalence of CYP2C8,



2C9, 2J2, and Soluble Epoxide Hydrolase Polymorphisms in African Americans With Hypertension[ast]. *Am J Hypertens*. 2005;18:1276-1281.

56. Wu S-N, Zhang Y, Gardner CO, Chen Q, Li Y, Wang G-L, Gao P-J and Zhu D-L. Evidence for Association of Polymorphisms in CYP2J2 and Susceptibility to Essential Hypertension. *Ann Hum Genet*. 2007;71:519-525.

57. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC and January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res*. 1999;84:989-98.

58. Eap CB, Crettol S, Rougier JS, Schlöpfer J, Sintra Grilo L, Déglon JJ, Besson J, Croquette-Krokar M, Carrupt PA and Abriel H. Stereoselective Block of hERG Channel by (S)-Methadone and QT Interval Prolongation in CYP2B6 Slow Metabolizers. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81:719-728.

59. Lee CA, Neul D, Clouser-Roche A, Dalvie D, Wester MR, Jiang Y, Jones JP, Freiwald S, Zientek M and Totah RA. Identification of Novel Substrates for Human Cytochrome P450 2J2. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38:347-356.

## Tables

**Table 1. Demographic Characteristics**

<i>Patients undergoing heart transplant</i>	
Gender; Men : Women (n)	57 : 17
Ventricle Side; Left : Right ventricle (n)	57 : 17
Clinical diagnostic; non ischemic : ischemic (n)	47 : 27
Weight (kg)	74 ± 15.6
Height (m)	1.71 ± 0.09*
BMI (kg/ m <sup>2</sup> )	25.37 ± 4.99
Use of amiodarone (n)	28
Use of known CYP3A inhibitors (n)	2
Use of known strong substrates of CYP3A (n)	6
Use of corticosteroids (n)	4
Use of CYP450 inducers	1

\* n=73

Legend: n; number, kg; kilogram, m; meter

**Table 2. Descriptive statistics of the Kinetic parameters of ebastine hydroxylation and mRNA level of CYP2J2 in human heart microsomes.**

	$CL_{int} (V_{max}/K_m)$ <i>(<math>\mu</math>l/min/mg proteins)</i>	$K_m$ <i><math>\mu</math>M</i>	$V_{max}$ <i>pmol of OHEBA / mg proteins / min</i>	mRNA CYP2J2* <i>CYP2J2 relative mRNA levels : <math>2^{(-\Delta\Delta CT)}</math></i>
<b>Explanted hearts (n=74)</b>				
Mean $\pm$ SD	16 $\pm$ 13	0.19 $\pm$ 0.23	3.1 $\pm$ 4.0	2.1 $\pm$ 0.9
(%CV)	(83)	(119)	(132)	(44)
Min	3.41	0.07	0.40	0.28
Max	83.19	1.90	27.54	4.56

\*n=73

Legend:  $K_m$ ; constant. CV; coefficient of variation. CT; cycle threshold.  $\Delta$ ; delta.  $CL_{int}$ ; intrinsic clearance. mRNA; messenger ribonucleic acid.  $\mu$ ; micro. mg; milligram. min; minute. n; number. SD; standard deviation.  $V_{max}$ ; maximal velocity.

**Table 3A. Comparison of kinetics parameters obtained from ebastine metabolic hydroxy- and N-dealkylation-pathways in HHM, HIM, HLM, rhCYP2J2.**

Quantified metabolites	Kinetic Fitting Model	CL <sub>int</sub>	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>
<b>Human Heart Microsomes (HHM)</b>				
Hydroxyebastine	M-M	16	0.19	3.1
Desalkylebastine		Not formed		
<b>Human Liver Microsomes (HLM)</b>				
Sum (OHEBA + carebastine)	M-M	25	6.5	158
	E-H (1 <sup>st</sup> component)	132	0.2	24
	E-H (2 <sup>nd</sup> component)	24	8.4	169
Desalkylebastine	M-M	27	16	748
<b>rhCYP2J2</b>				
Sum (OHEBA + carebastine)	Allosteric/Sigmoidal	48	0.34	16
Desalkylebastine		Not formed		

HHM and HLM units for K<sub>m</sub>: μM, V<sub>max</sub>: pmoles of hydroxyebastine/min/mg of proteins and CL<sub>int</sub>: μl/min/mg of proteins.

rhCYP450 units: V<sub>max</sub>: pmoles of hydroxyebastine/ min/ pmol of rhCYP450 and CL<sub>int</sub>: μl/min/pmol of rhCYP450

Legend: K<sub>m</sub>; constant. CL<sub>int</sub>; intrinsic clearance. μ; micro. M-M; Michaelis Menten. mg; milligram. min; minute. n; number. SD; standard deviation. S-I; substrate inhibition. V<sub>max</sub>; maximal velocity.

**Table 3A. Comparison of kinetics parameters retrieved in literature from ebastine metabolic hydroxy- and N-dealkylation-pathways in HIM, HLM, rhCYP2J2, rhCYP3A4 and rhCYP3A5.**

Quantified metabolites	Kinetic Fitting Model	CL <sub>int</sub>	K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub>	Reference
<b><i>Human Intestine Microsomes (HIM)</i></b>					
Hydroxyebastine	M-M	14	2.6	30	(4)
Desalkylebastine	M-M	5.3	39	140	(4)
<b><i>Human Liver Microsomes (HLM)</i></b>					
Hydroxyebastine	M-M	2.14	5.1	10.9	(1)
Hydroxyebastine	M-M	52.4	3	152	(2)
Hydroxyebastine	M-M	31.3	5.3	167	(5)
Desalkylebastine	M-M	6.2	17.5	108	(1)
<b><i>rhCYP2J2</i></b>					
Hydroxyebastine	M-M	31	1.3	40.6	(4)
Hydroxyebastine	M-M	0.45	18.3	8.2	(1)
Hydroxyebastine	M-M	3.1	7.3	22.5	(2)
<b><i>rhCYP3A4</i></b>					
Hydroxyebastine	M-M	0.19	11	2.08	(2)
Hydroxyebastine	M-M	0.02	6.90	0.12	(1)
Hydroxyebastine	M-M	0.0023	10	0.023	(5)
Desalkylebastine	M-M	0.44	7.7	3.3	(1)
Desalkylebastine	M-M	0.024	11.5	0.284	(5)
<b><i>rhCYP3A5</i></b>					
Hydroxyebastine	M-M	0.06	2.3	0.14	(1)
Desalkylebastine	M-M	0.13	5.6	0.74	(1)

HIM, HLM and HLM units for K<sub>m</sub>: μM, V<sub>max</sub>: pmoles of hydroxyebastine/min/mg of proteins and CL<sub>int</sub>: μl/min/mg of proteins.

rhCYP450 units: V<sub>max</sub>: pmoles of hydroxyebastine/ min/ pmol of rhCYP450 and CL<sub>int</sub>: μl/min/pmol of rhCYP450

Legend: K<sub>m</sub>; constant. CL<sub>int</sub>; intrinsic clearance. μ; micro. M-M; Michaelis Menten. mg; milligram. min; minute. n; number. SD; standard deviation. S-I; substrate inhibition. V<sub>max</sub>; maximal velocity.

**Table 4. Enzyme kinetic parameters of ebastine hydroxylation relative to CYP2J2\*7 variant expression**

<sup>§</sup>mRNA levels expressed as normalized target gene expression level:  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  (GAPDH).

Dependent variables	NI hearts		I hearts	NI hearts	NI or I hearts
	LV		LV	LV	RV
	Men		Men	Women	Men
	CYP2J2*1/*1 (n=14)	CYP2J2*1/*7 (n=6)	CYP2J2*1/*1 (n=20)	CYP2J2*1/*1 (n=17)	CYP2J2*1/*1 (n=17)
CYP2J2 mRNA levels <sup>§</sup>	2.0±1.0	1.5±0.5	1.8±0.6*	2.8±0.9	2.08±1.02
K <sub>m</sub>	0.13±0.06	0.13±0.04	0.18±0.11	0.2±0.1	0.27±0.43
V <sub>max</sub>	3.0± 2.8	3.8±3.0	2.7±3.2	2.8±3.5	3.6±6.3
CL <sub>int</sub>	23±20	29±20	14±11	13±8	12.5±4.8

Enzyme kinetic parameters expressed as mean ± SD.

Units for K<sub>m</sub>: μM, V<sub>max</sub>: pmoles of hydroxyebastine/ min/ mg of proteins and CL<sub>int</sub>: μl/min/mg of proteins. Legend: CL<sub>int</sub>: intrinsic clearance. K<sub>m</sub>: constant. LV; left ventricle. RV; right ventricle. V<sub>max</sub>: maximal velocity.

One-way ANOVA statistics- Post-hoc Tukey test: \* p < 0.05 between samples from ischemic hearts-LV-Men and NI hearts-LV women.

**Table 5. Association of CYP2J2 mRNA levels and kinetic parameters (dependent variables) of ebastine hydroxylation with independent variables from the multivariate analysis**

Independent variables ( $\beta$ )	Dependent variables			
	logmRNA	logK <sub>m</sub>	logV <sub>max</sub>	logCl <sub>int</sub>
	<i>parameter estimate</i>			
Weight (X = Weight)	0.02960 (X1)			
BMI (X= BMI)				0.03471 (X1)
Left ventricle (left ventricle; X=1, right ventricle; X=0)	1.95482 (X2)			0.34540 (X2)
Ischemic diagnostic (ischemic; X=1, non-ischemic; X=0)				-0.43253 (X3)
Gender (male; X=1, female; X=0)	-0.47093 (X3)			0.69028 (X4)
Amiodarone use (used; X=1, not used; X=0)		0.32509 (X1)	0.56031 (X1)	
Strong CYP3A substrates* use (used; X=1, not used; X=0)		0.54644 (X2)		
Corticosteroids** use (used; X=1, not used; X=0)		-0.47035 (X3)		
Left ventricle*weight (left ventricle*weight; X=1*weight=weight, right ventricle*weight; X=0*weight=0)	-0.02729 (X4)			
Equation: $y$ (predicted) = $\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_x X_x$	$y = -2,1359 + 0,0296 * X1 + 1,95482 * X2 + 0,47093 * X3 + 0,02729 (X4)$	$y = -2,02518 + 0,32509 * X1 + 0,54644 * X2 + 0,47035 * X3$	$y = 0,41138 + 0,56031 * X1$	$y = 2,76412 + 0,03471 * X1 + 0,34540 * X2 + 0,43253 * X3 + 0,69028 * X4$
Overall $r^2$	0.2115	0.1624	0.0835	0.1967

$\beta_0$  = intercept.

Legend: BMI; body mass index, Cl<sub>int</sub>; intrinsic clearance, K<sub>m</sub>; affinity constant, mRNA; messenger ribonucleic acid, V<sub>max</sub>; maximal velocity.

\*clarithromycin, erythromycin, ketoconazole or itraconazole. \*\*prednisone, solucortef or solumetrol.

## **Supplemental Information**

### **Reagents**

Ebastine, hydroxyebastine, hydroxyebastine-d<sub>5</sub>, carebastine, carebastine-d<sub>5</sub>, desalkylebastine, desalkylebastine-d<sub>5</sub> were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium phosphate dibasic anhydrous (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), trishydroxymethylaminomethane (TRIS), potassium chloride (KCl) and phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), acetonitrile and methanol were purchased from Fisher Scientific (Toronto, On). Magnesium chloride was purchased from JT Baker (Philipsburg, NJ). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was purchased from Bioshop (Burlington, On). Dithiothreitol (DTT) was purchased from Gibco®, Life Technologies Ltd. (Eugene, OR). Recombinant human (cDNA-expressed) CYP2J2 Supersomes™ (rhCYP450) were purchased from Corning® (Tewksbury, MA). Human liver microsomes and Human intestinal microsomes were obtained from Corning® (Tewksbury, MA).



**Supplemental Figures.**

**Supplemental Figure 1. Predicted and observed mRNA levels and ebastine hydroxylation kinetic parameters,  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $CL_{int}$  from 74 explanted hearts of patients with cardiomyopathies based on the multivariate regression model.**

Figure 1A.

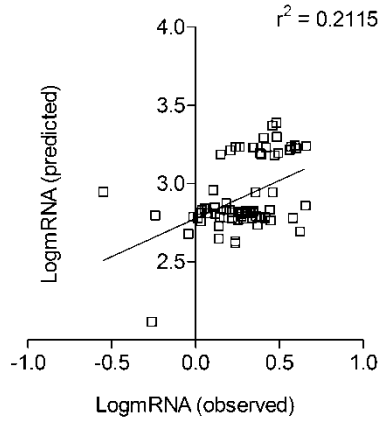


Figure 1B.

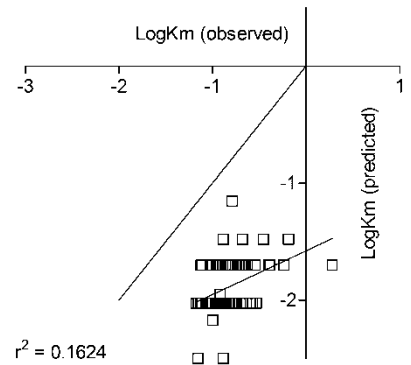


Figure 1C.

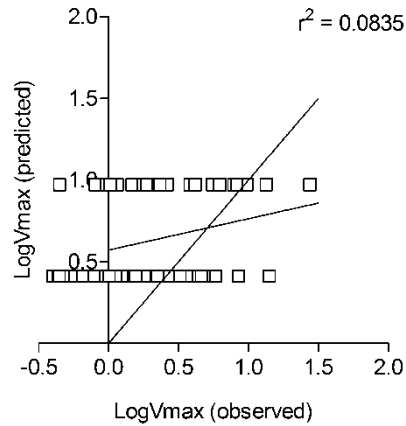
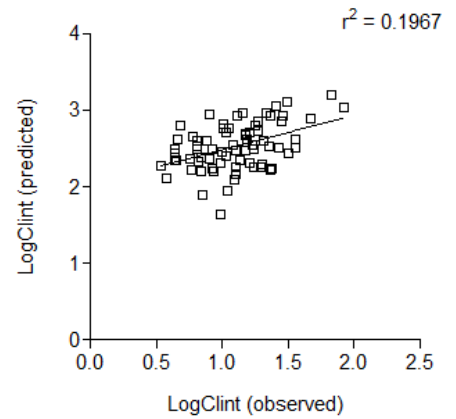


Figure 1D.



**Supplemental Figure2**

**Figure 2. Model validation plots; residuals versus fitted (predicted) values.**

Figure 2A.

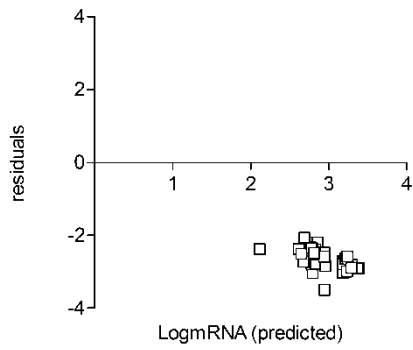


Figure 2B.

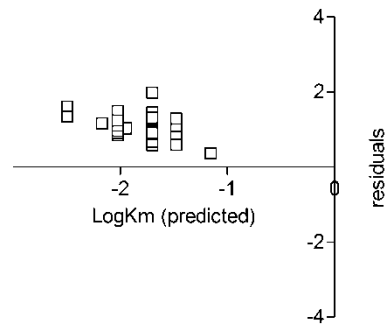


Figure 2C.

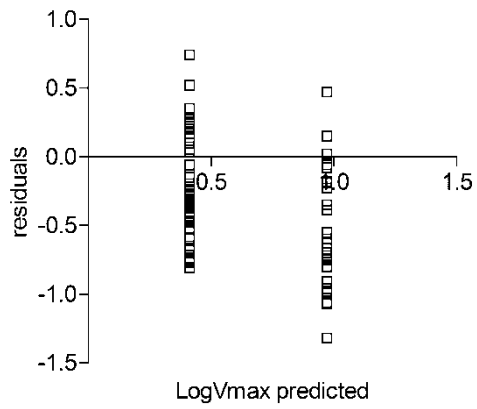
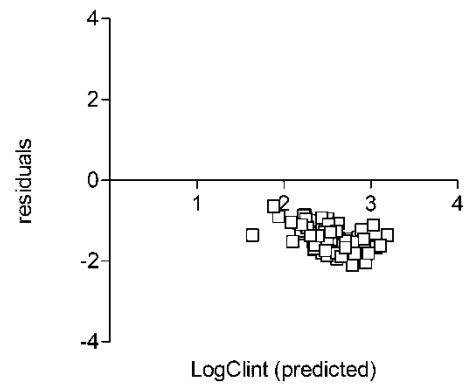


Figure 2D.



**Supplemental Table 1**

Contingency table and strength of association between the ischemic and non-ischemic status groups and the CYP2J2\*7 polymorphism

<i>CYP2J2</i> *7 genotype	Ischemic	Non-ischemic	p-value Fishers exact test	Odds Ratio (95% CI)
GT (variant)	0	6	p=0.0202	0.054 (0.002-1.044)
GG (wildtype)	20	14		

Legend: CI: confidence interval.

### 4.3 Discussion

Ce chapitre met en lumière l'implication de différentes caractéristiques intrinsèques et extrinsèques associées à l'expression de l'isoenzyme CYP2J2 dans les microsomes de ventricules humains et à son activité représentée de façon indirecte par l'hydroxylation du substrat marqueur ébastine. Nous avons premièrement établi une comparaison des paramètres cinétiques ( $K_m$ ,  $V_{max}$  et  $CL_{int}$ ) associés au métabolisme du substrat ébastine entre les différents systèmes enzymatiques MCH, HIM, HLM, rhCYP2J2, rhCYP3A4 et 3A5. Cette analyse conjointement avec les résultats des chapitres 2 et 3 nous permet d'associer la formation d'hydroxyébastine avec les MCH et l'isoenzyme CYP2J2.

Le présent chapitre révèle aussi pour la première fois qu'aucune association n'existe entre le polymorphisme CYP2J2\*7 et la variabilité observée dans l'expression de l'ARNm du CYP2J2 ainsi que dans son activité microsomale dans le ventricule de cœurs explantés de patients avec cardiomyopathies. Nos résultats illustrent aussi que certains facteurs sont associés à la variabilité de certains paramètres d'activité du CYP2J2. Il s'agit de la première étude, selon nos connaissances, à effectuer une analyse de régression multiple voulant expliquer la variabilité associée à l'expression de l'ARNm et à l'activité du CYP2J2 dans le ventricule de cœurs humains. Deux facteurs ont particulièrement attiré notre attention compte tenu leur importance dans les cardiomyopathies; le diagnostic clinique d'ischémie et la prise d'amiodarone.

Le BMI, le côté gauche du ventricule ainsi que le genre masculin ajoutés à l'état ischémique du diagnostic clinique du cœur explique 20% de la variabilité observée. L'ischémie est associée, de manière significative avec d'autres facteurs, à une diminution de la clairance intrinsèque du substrat ébastine avec les MCH. L'ischémie cardiaque est un état pathologique où le cœur manque d'oxygène dû à une mauvaise circulation coronarienne diminuant l'apport en oxygène aux cellules du cœur.<sup>445</sup> Une prolongation suffisante d'ischémie peut engendrer des dysfonctions dans la contractilité du cœur et créer un infarctus du myocarde (IM) entraînant la mort cellulaire (nécrose), l'insuffisance cardiaque et ultimement la mort. Suivant un infarctus du myocarde, différents mécanismes de la cascade inflammatoire sont déclenchés. Il y a premièrement

du remodelage myocardique dans le microenvironnement ayant subi l'infarctus, une augmentation de la réponse inflammatoire par la libération de cytokines (IL-6 et IL-8), une infiltration des myofibroblastes dans le tissu endommagé et plusieurs autres mécanismes.<sup>445</sup> Tous ces événements affectent l'intégrité de la cellule et sont susceptibles d'influencer l'expression et l'activité des enzymes CYP450s présentes. Ainsi, l'ischémie engendre possiblement une détérioration du microenvironnement pouvant affecter l'intégrité des cellules et par défaut les enzymes du CYP450 exprimées dans l'environnement affecté. De ce fait, l'ischémie est négativement associée à la variabilité dans la clairance intrinsèque du substrat ébastine avec les MCH.

Les années précédant une transplantation sont marquées par l'utilisation de différents médicaments afin de restaurer la fonction cardiaque. Des diurétiques, des vasodilatateurs, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, des bêta-bloquants, des antagonistes des récepteurs à l'angiotensine et des antiplaquettaires sont tous des traitements que les patients peuvent recevoir qui peuvent aussi moduler le microenvironnement du cœur.

D'ailleurs, l'amiodarone est un substrat de l'isoenzyme CYP2J2 et est administrée chez des patients présentant des arythmies cardiaques, représentant d'ailleurs 37 % de la cohorte de patients transplantés étudiée dans ce chapitre.<sup>446</sup> Le principal métabolite de l'amiodarone est le MDEA (mono-N-desméthylamiodarone) formé par le CYP3A4 et le CYP2C8. Le CYP2J2 est responsable de la formation du 3-hydroxyamiodarone avec le CYP3A4 tandis que le CYP2J2 est spécifiquement responsable de la formation du 4-hydroxyamiodarone avec un  $K_m$  de 5  $\mu$ M et une clairance intrinsèque de 0,92  $\mu$ l/min/pmol CYP2J2 (calculée manuellement avec l'équation  $CL_{int} = V_{max}/K_m$  selon Lee *et collègues*).<sup>446</sup> L'amiodarone n'inhibe pas de façon significative l'hydroxylation de la terfénadine dans des cardiomyocytes humains en culture primaire dérivées de tissus cardiaques humains<sup>142</sup> Selon nos résultats, la prise d'amiodarone est le seul facteur expliquant 8% de la variabilité observée sur la vitesse maximale de l'hydroxylation de l'ébastine avec les MCH avec un coefficient positif suggérant une tendance à une augmentation du  $V_{max}$  suivant la prise d'amiodarone. De façon opposée, l'amiodarone

est positivement associée à la variabilité de l'affinité du substrat ébastine avec les MCH. Globalement ce changement n'engendre aucun impact sur la clairance intrinsèque d'où l'absence d'association entre la prise d'amiodarone et la  $CL_{int}$  d'ébastine avec les MCH.

L'amiodarone n'a pas été co-incubée avec l'ébastine. Seul un impact mécanistique préalable a dû s'être produit pour que la conformation de l'isoenzyme soit modulée et engendre une différence dans les paramètres enzymatiques de l'ébastine avec les MCH. L'amiodarone n'est pas, à notre connaissance connue pour induire le CYP2J2. D'ailleurs, l'induction du CYP2J2 par l'amiodarone se serait traduite par une augmentation de la clairance intrinsèque. Il pourrait s'agir d'un phénomène de régulation de l'enzyme suite à l'exposition à l'amiodarone. Cette exposition pourrait modifier le site catalytique du CYP2J2 provoquant une augmentation du  $K_m$  de l'ébastine et une augmentation du seuil maximal de vitesse (augmentation du  $V_{max}$ ) ne générant aucun changement dans la clairance intrinsèque. Bref, les mécanismes moléculaires nécessitent des études plus approfondies comme que des essais avec l'amiodarone en tant que co-substrat incubé avec l'ébastine avec les MCH et rhCYP2J2 afin de bien caractériser l'interaction.

Il est parfois difficile de cibler les bons facteurs permettant d'expliquer la totalité de la variabilité associée à l'expression et l'activité des isoenzymes des CYP450s au niveau du foie et d'autant plus au niveau extrahépatique. Nos résultats ont ouvert une porte à de futures études ciblant différents facteurs responsables de la variabilité interindividuelle associée à l'activité des CYP450s particulièrement au niveau des ventricules de cœurs humains affectés par des cardiomyopathies.

## **Section III : Conclusion**

## 5. Chapitre 5

### 5.1 Discussion Générale

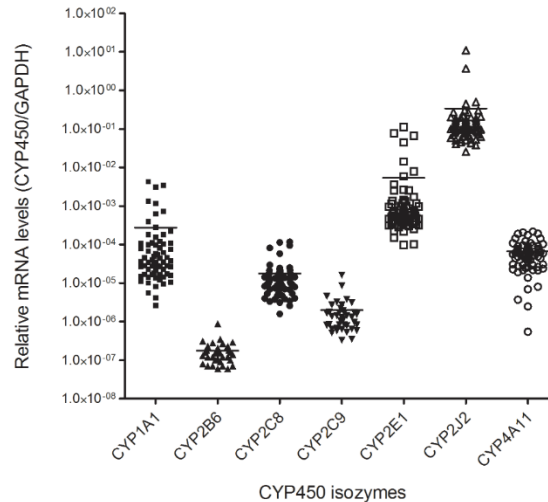
Ce projet s'est inscrit dans un objectif global de démontrer la participation du système des cytochromes P450 dans la gestion locale des médicaments au niveau du cœur et de caractériser les facteurs responsables de la variabilité associée à leur expression et leur activité. Le métabolisme par les CYP450s au niveau des organes extra-hépatiques est peu caractérisé malgré leur existence connue depuis plus de 40 ans.<sup>87,149</sup> Des évidences scientifiques démontrent que le métabolisme par les CYP450s est indépendant pour chacun des organes extra-hépatiques et provoque des effets locaux différents et souvent à des concentrations différentes que celles retrouvées dans le plasma.<sup>11,188,447-450</sup> Ces notions clés appuient la démarche entreprise dans ce projet de doctorat d'établir de façon claire et certaine cette participation locale. Afin de répondre à l'hypothèse de recherche voulant que les CYP450s exprimés dans les ventricules de cœurs humains soient dotés d'une activité métabolique particulière et variable influençant le devenir du médicament localement, mes recherches se sont divisées en trois volets d'études expérimentales *in vitro*. Tout d'abord, les recherches exhaustives effectuées auparavant dans mon laboratoire d'accueil ont permis de démontrer l'expression transcriptionnelle des isoenzymes CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 2J2, 3A5 et 4A11 dans le ventricule humain.<sup>91</sup> Le premier volet de mes recherches fut de poursuivre dans cet axe en développant et en testant des combinaisons de substrats-marqueurs sélectifs pour chacune des isoenzymes s'exprimant dans le tissu de ventricule de cœurs humains. Dans un deuxième temps, nos essais exploratoires nous ont permis de décrire le profil d'activité métabolique complet (essais enzymatiques d'activité et d'inhibition) de la chlorzoxazone et de l'ébastine avec les MCH. De ceux-ci, seule l'activité enzymatique d'hydroxylation de l'ébastine a pu être directement associée à l'isoenzyme CYP2J2. L'observation d'une très grande variabilité dans l'activité de l'isoenzyme CYP2J2 observée à travers le métabolisme de l'ébastine a contribué à développer le dernier volet de mes recherches. Ce volet décrit certaines variables intrinsèques et extrinsèques des patients pouvant être associées à la très grande variabilité observée dans l'expression et



l'activité du CYP2J2 dans les ventricules de cœurs d'une cohorte de 74 patients avec cardiomyopathies.

### **Bref résumé des trois volets de ces travaux de doctorat :**

Le premier projet de ces études doctorales fut de développer des combinaisons de substrats-marqueurs d'isoenzymes du CYP450 reconnues être exprimées dans les microsomes de ventricules humains (MCH). Les résultats obtenus préalablement à mes études doctorales ont démontré que les MCH expriment différentes isoenzymes du CYP450 (Figure 30).



**Figure 30.** Expression relative de l'ARNm dans les microsomes de cœurs humains. D'après Michaud et collègues.<sup>91</sup>

Mes études doctorales se sont appuyées sur les résultats de la **Figure 30**. Ainsi, le volet 1 de mon projet était de valider un 'cocktail' de médicaments sélectifs envers les isoenzymes CYP1A1, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1, 2J2, 4A11 et 3A5 *in vitro*. L'initiative de développer une approche 'cocktail' était d'optimiser le nombre de voies métaboliques des CYP450s étudié en une seule expérience utilisant un minimum de tissu ventriculaire. Ceci était appuyé sur le fait que le tissu de ventricule de cœurs humains est difficilement accessible en plus d'être disponible en petite quantité. Il est connu que les approches utilisant plusieurs substrats en combinaison n'évaluent pas de façon rigoureuse la sélectivité ainsi que les interactions entre les substrats prenant pour acquis les lignes

directrices des agences gouvernementales ou les différentes données présentées dans les articles scientifiques.<sup>392</sup> Nous avons donc voulu remédier à cet enjeu en validant de façon exhaustive l'utilisation de différents substrats combinés. Il s'agissait de la première étape logique dans mes études de doctorat considérant que tous les cocktails préalablement développés n'incluaient pas de substrats sélectifs envers certaines isoenzymes majoritairement exprimées dans le cœur humain. Les isoenzymes CYP1A1, 2J2 et 4A11 ne sont que très peu exprimées au niveau hépatique comparativement au tissu cardiaque et n'ont d'ailleurs jamais été utilisées dans le développement de cocktail de substrats-marqueurs.<sup>392</sup>

Le développement d'un cocktail de médicaments *in vitro* fait face à plusieurs contraintes. Les tampons (source de sels et pH), l'éventail de concentrations de substrats et leur solvant de dissolution, l'optimisation des méthodes analytiques devant mesurer tous les métabolites générés de façon ultrasensible et finalement les interactions entre les différents substrats représentaient les défis majeures à relever pour valider notre approche cocktail.<sup>392</sup> Compte tenu que notre approche se voulait un éventuel outil pour caractériser le profil enzymatique complet des substrats-marqueurs d'isoenzymes du CYP450 dans le tissu de ventricule humain, c'est-à-dire, d'obtenir des profils de cinétique enzymatique jusqu'à saturation, il était crucial de pouvoir utiliser les différents cocktails avec des concentrations de substrats suffisamment élevées pour saturer chacun des processus métaboliques étudiés sans interférer avec les autres. L'intervalle de concentrations utilisées variait de 0,15 à 5 fois le  $K_m$  pour chacun des substrats-marqueurs permettant d'atteindre une saturation enzymatique. Cette contrainte représentait un défi de taille compte tenu des difficultés de solubilité des substrats à hautes concentrations et des possibles interactions entre substrats-marqueurs. D'ailleurs, le développement des cocktails médicamenteux a représenté 45% de mes travaux de recherche où plus de 4000 incubations ont été effectuées pour y parvenir sur une période de plus de 2 ans.

Les résultats de ce premier volet furent le développement et la validation du cocktail #1 regroupant le bupropion, la chlorzoxazone, l'ébastine et le midazolam ciblant les isoenzymes CYP2B6, 2E1, 2J2 et 3A5. Le développement de ce cocktail permettra à la communauté scientifique d'étudier le métabolisme de façon sélective dans des tissus extrahépatiques exprimant les isoenzymes CYP2B6, 2E1, 2J2 et 3A5. De plus, l'application du cocktail #1 dans les microsomes de cœurs humains a démontré que le cœur était doué d'activité métabolique d'oxydation envers chacun des substrats et ce de manière variable. De plus, les 5 autres substrats marqueurs choisis furent testés dans les MCH et 3 (bufuralol, tolbutamide et répaglinide) des 5 substrats ont démontré une activité d'hydroxylation formant des métaboliques spécifiques formés par des CYP450s. Il s'agit, selon nos connaissances, des premières études métaboliques avec les MCH impliquant autant de substrats-marqueurs dans le tissu extrahépatique cardiaque permettant d'ajouter des résultats pertinents aux connaissances scientifiques dans ce domaine. Évidemment, la responsabilité des isoenzymes du CYP450 n'était pas encore établie dans ce volet de recherche, sujet qui fut l'objet du deuxième volet de recherche. Par ailleurs, l'interaction entre les différents substrats du cocktail #1 dans la matrice microsomale cardiaque représentait aussi un aspect à démontrer dans le deuxième volet de mes recherches. Finalement, la sélectivité des substrats choisis dans le cocktail #1 devait aussi être démontrée par des expériences d'inhibition avec des inhibiteurs chimiques sélectifs et des anticorps dans la matrice cardiaque afin d'être considérée comme un cocktail de substrats marqueurs sélectifs. Ceci malgré le fait que la réaction d'hydroxylation typique d'une isoenzyme envers un substrat participe à la définition de sa sélectivité.

Le deuxième volet de cette thèse de doctorat a ciblé deux substrats-marqueurs du cocktail #1, l'ébastine et la chlorzoxazone car ceux-ci ont démontré une activité métabolique avec les MCH suffisamment élevée et constante pour développer des analyses enzymatiques pertinentes. Nous avons caractérisé leur profil d'activité et obtenu des valeurs pour les paramètres  $K_m$ ,  $V_{max}$  et  $CL_{int}$ . En plus des essais avec inhibiteurs ayant permis de démontrer la responsabilité de l'isoenzyme du CYP2J2 dans l'hydroxylation de l'ébastine avec les MCH, des extrapolations de clairances

intrinsèques *in vitro* à *in vivo* ont mis la table pour permettre d'intégrer nos données à de futurs modèles prédictifs du métabolisme par le ventricule gauche du cœur humain. Pour la première fois, selon nos connaissances, nous avons démontré que la fraction microsomale de ventricule de cœurs humains est dotée d'une activité enzymatique envers l'ébastine où l'isoenzyme CYP2J2 y est majoritairement responsable. Cette démonstration suggère qu'au niveau cellulaire, l'expression intracellulaire du CYP2J2 dans les cellules cardiaques est dotée d'une activité métabolique pouvant influencer les concentrations locales intracellulaires de l'ébastine. Cette percée scientifique crée un pont entre les nombreuses données dans la littérature démontrant la participation du CYP2J2 dans le métabolisme de composés endogènes et la reconnaissance qu'une activité enzymatique est présente dans les cellules cardiaques (cardiomyocytes, endothéliales et musculaires lisses) du ventricule humain pouvant influencer la formation locale de métabolites.

Ce volet de recherche a aussi permis de démontrer que l'hydroxylation de la chlorzoxazone avec les MCH était un processus NADPH-dépendant mais insensible à la chaleur. Des études futures seront nécessaires afin d'approfondir certaines observations obtenues dans ce volet de recherche afin d'établir la réelle source enzymatique hydroxylant la chlorzoxazone. Finalement, le dernier volet de mes recherches fut d'étudier certains facteurs intrinsèques et extrinsèques associés à la variabilité d'expression et d'activité du CYP2J2. Ce volet représentait le point culminant de ce doctorat en termes de démonstration concrète des facteurs impliqués dans la grande variabilité (>69%) observée dans l'expression et l'activité du CYP2J2 dans la plus grande cohorte de patients jamais étudiée à cette fin scientifique (n=74).

L'avancée majeure que cette thèse apporte est une première démonstration d'activité d'hydroxylation dans la fraction microsomale cardiaque qui reflète l'expression réelle de la protéine CYP2J2 dans les MCH. L'expression locale majoritaire du CYP2J2 dans le cœur par rapport au foie n'est pas fortuite et se doit d'être reliée à une fonction biologique spécifique.<sup>404</sup> D'ailleurs, la présence locale de cette isoenzyme justifierait son rôle de régulateur d'homéostasie endogène par sa capacité à produire des métabolites

vasoactifs et mes travaux de recherches démontrent son comportement métabolique dans le ventricule de cœurs humains.

La présence et l'activité enzymatique du CYP2J2 dans les cellules du cœur humain peuvent engendrer un contrôle local de composés substrats du CYP2J2. Par exemple, le  $K_m$  ( $K_m = 0.34 \mu\text{M}$ ) obtenu de l'ébastine avec les MCH est variable mais reste dans le même intervalle que la concentration nécessaire pour engendrer un bloc de 50% des canaux  $I_{Kr}$  dans le cardiomyocytes ( $IC_{50} = 0.3 \mu\text{M}$ ).<sup>451</sup> Il est possible de suggérer qu'une fluctuation de l'activité du CYP2J2 pourrait directement influencer les concentrations intracellulaires de l'ébastine et par le fait même sa capacité à bloquer le canal  $I_{Kr}$ . Des études avec des modèles cellulaires plus complexes permettraient d'établir un lien entre les résultats de mes études doctorales et l'impact qu'un médicament, substrat du CYP2J2, aurait sur le canal  $I_{Kr}$  en présence d'une sur- ou sous-expression de l'isoenzyme CYP2J2. Ce modèle permettrait de comprendre l'influence qu'une diminution ou une activation métabolique d'un composé cardiotoxique aurait sur l'homéostasie de la cellule (courants ioniques) et ainsi prédire l'impact que des facteurs de variabilité identifiés dans mes études pourraient avoir au niveau du potentiel cardiotoxique de certains médicaments. D'ailleurs, mon laboratoire d'accueil est en co-association avec le laboratoire des Drs Benoît Drolet et Chantale Simard qui travaillent sur le développement de tels modèles.

Entre 1998 et 2008, 33 % des 51 médicaments furent retirés du marché américains pour des raisons de cardiotoxicité dont plusieurs étaient substrats des CYP3As.<sup>452</sup> De plus, des substrats connus de l'isoenzyme CYP2J2 sont souvent aussi substrats du CYP3A.<sup>260</sup> Cette homologie de substrats suggère que plusieurs médicaments métabolisés par le CYP3A seraient aussi susceptibles de l'être par le CYP2J2. Pour ces raisons, comprendre les interactions locales entre l'isoenzyme CYP2J2, les facteurs influençant son expression et son activité et les médicaments à potentiels cardiotoxique demeurent un enjeu majeur dans le développement de médicaments.

Par ailleurs, aucun des nouveaux modèles de cardiomyocytes (iPSC-CC, hPSC-CC, hESC-CC, HPC) développés *in vitro* permettant d'étudier la cardiotoxicité des médicaments fut utilisé pour étudier le métabolisme médié par les CYP450s et ce malgré l'introduction du cœur comme organe dans plusieurs modèles pharmacocinétiques-physiologiques.<sup>86,453-456</sup> Le contexte où la clairance extrahépatique devient un concept de plus en plus important, l'étude de l'influence des isoenzymes spécifiquement exprimées dans des tissus extrahépatique justifie la pertinence de mes études doctorales.

Effectuer des prédictions de concentrations dans tous les tissus/organes/cellules du corps humain et comprendre les comportements cinétique et dynamique qu'une molécule aura avant même de l'administrer est un domaine en pleine effervescence grâce à ses avantages aux niveaux méthodologique, économique et stratégique dans le développement d'un médicament. Nos résultats suggèrent aussi que le métabolisme local de composés endogènes substrats du CYP2J2 serait enclin à être influencé par une fluctuation de la capacité enzymatique de cette isoenzyme chez différents individus. D'ailleurs, mon laboratoire d'accueil poursuit les recherches afin d'évaluer le potentiel métabolique des MCH envers différents médicaments candidats (ilopéridone et olanzapine) connus pour avoir des toxicités cardiaques en plus d'étudier d'autres tissus extra-hépatiques humains tels que les poumons, l'intestin et les reins.

## 5.2 Commentaire général et contribution scientifique

Le métabolisme associé aux isoenzymes du CYP450 dans le cœur humain a fait l'objet de beaucoup de recherches de façon indirecte. Par exemple, nombreuses sont les recherches effectuées sur l'importance du CYP2J2/2C et 4A dans le métabolisme de l'acide arachidonique et la formation de métabolites vasoactifs dans l'homéostasie vasculaire. L'expression de certaines isoenzymes cardiaques associée à un impact physiologique est devenue le lien que les chercheurs utilisent pour démontrer que les isoenzymes du CYP450 ont un rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire. Par contre peu d'essais expérimentaux utilisant le tissu cardiaque humain ont été effectués au cours des dernières années. L'activité enzymatique dans le cœur humain a seulement été étudiée par deux laboratoires. Premièrement, Thum et Borlack ont démontré que seule la fraction microsomale du ventricule droit formait certains métabolites du vérapamil tandis que le ventricule gauche était inactif.<sup>9</sup> Deuxièmement, notre équipe de recherche a démontré que le vérapamil incubé avec les microsomes de ventricules de cœurs humains était métabolisé par le ventricule gauche et droit et que la formation de quatre métabolites était stéréosélective envers le R-vérapamil.<sup>91</sup> Aucune autre donnée de métabolisme dans le tissu cardiaque humain n'a été réalisée depuis. Il n'existe donc aucune donnée reliée à l'activité enzymatique des isoenzymes du CYP450 exprimées dans le ventricule de cœurs humains sujet devenu l'objectif de cette thèse. Ainsi, mes études doctorales permettent d'ajouter certaines connaissances au domaine de recherche sur le métabolisme extrahépatique, spécialement au niveau cardiaque.

Combinés aux techniques et aux données obtenues dans ces études doctorales, il serait possible, avec les outils de prédictions *PBPK* et les techniques de quantification protéomique LC-MSMS, d'obtenir l'abondance de CYP2J2 dans les cellules du cœur humain, de déterminer les profils enzymatiques de différents composés substrats du CYP2J2 et finalement de prédire de façon mathématique au niveau moléculaire les concentrations introduites dans la circulation coronarienne et le compartiment du 'cœur' ainsi que le profil d'élimination de ces concentrations au niveau local. D'autant plus que les prédictions deviennent encore plus précises et personnalisées pour chacun des patients à risque d'effets néfastes au niveau cardiaque avec l'ajout de facteurs reconnus

pouvant faire varier les niveaux des isoenzymes actives tels que la prise d'amiodarone ou le diagnostic clinique d'ischémie .

Globalement, une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans la variabilité interindividuelle de l'expression et l'activité d'isoenzymes du CYP450 impliquées dans le métabolisme des médicaments représente un atout majeur dans la contribution à l'identification de thérapie personnalisée permettant d'optimiser la réponse thérapeutique tout en minimisant les risques de toxicité. Mes travaux de recherches ont permis de déterminer certains facteurs de risque associés à la variabilité dans l'expression, mais surtout dans l'activité de l'isoenzyme CYP2J2, pilier enzymatique dans le métabolisme cardiaque. Nous avons identifié des sous-populations particulières de patients susceptibles de voir leur équilibre enzymatique cardiaque normal bouleversé de manière à engendrer des changements dans l'homéostasie locale. En revanche nous émettons une l'hypothèse que d'autres facteurs sont responsables de la variabilité interindividuelle. Il se pourrait que la race, l'âge, les habitudes de fumer, ainsi que la présence d'autres pathologies sous-jacentes comme le diabète, pourraient aussi affecter l'expression et l'activité du CYP2J2 au niveau cardiaque. Bien que la participation globale du ventricule gauche à la clairance globale d'un médicament soit négligeable comparativement au foie, mes travaux de recherches ont démontré que localement, le CYP2J2 exprimé dans les MCH peut métaboliser des substrats avec une capacité métabolique supérieure ou équivalente à la matrice HLM. L'obtention des résultats généraux de mes travaux a nécessité cinq années de recherche acharnées à tester et réaliser des centaines d'essais pour finalement développer des méthodes expérimentales valides et robustes pour répondre aux hypothèses initiales de recherche. Les techniques de LC-MSMS développées ont permis l'analyse de plus de 10 000 incubations effectuées dans différents systèmes *in vitro* (microsomales, recombinants) qui incluent plus du quadruple en dosages analytiques de métabolites et analyse chromatographique.

Il s'agit à ma connaissance de premiers travaux de recherche qui tentent de démontrer, de manière indirecte, la participation locale d'isoenzyme du CYP450 d'un organe extrahépatique dans le métabolisme de médicaments d'autant plus que la validation



clinique de telles études est encore très difficile et coûteuse à ce jour. Ces travaux offrent à la communauté scientifique des données caractéristiques pouvant être utilisées dans des modèles prédictifs de pharmacocinétique-physiologique (*PBPK*) montés pour déterminer la participation locale du cœur dans le métabolisme de certains médicaments substrat du CYP2J2 ayant un potentiel de toxicité. De tels modèles sont des outils majeurs dans la compréhension de la gestion locale des concentrations intracellulaires et leurs impacts potentiels sur leur environnement cellulaire. Prévenir les interactions médicamenteuses dans un contexte local reste encore une approche innovatrice, mais s'avère fondamentale dans l'approche globale de développer des thérapies personnalisées.

### **5.3 Autres travaux scientifiques**

L'annexe 1 présente le manuscrit qui résume une partie de mes travaux effectués dans le cadre de ma maîtrise. Il s'agit d'un projet de recherche *in vitro* et *in vivo* étudiant l'impact du pantoprazole sur le transport *in vitro* et la pharmacocinétique chez l'humain de la rosuvastatine.

## 6. Références

1. Spear, B.B., Heath-Chiozzi, M. & Huff, J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol. Med.* **7**, 201-204 (2001).
2. Roden, D.M. & George Jr, A.L. The genetic basis of variability in drug responses. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 37-44 (2002).
3. Shepherd, G., Mohorn, P., Yacoub, K. & May, D.W. Adverse drug reaction deaths reported in United States vital statistics, 1999-2006. *Ann. Pharmacother.* **46**, 169-175 (2012).
4. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **385**, 117-171.
5. Zed, P.J. *et al.* Incidence, severity and preventability of medication-related visits to the emergency department: a prospective study. *Can. Med. Assoc. J.* **178**, 1563-1569 (2008).
6. Williams, J.A. *et al.* Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 1201-1208 (2004).
7. Gervasini, G., Carrillo, J. & Benitez, J. Potential Role of Cerebral Cytochrome P450 in Clinical Pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **43**, 693-706 (2004).
8. de Waziers, I., Cugnenc, P.H., Yang, C.S., Leroux, J.P. & Beaune, P.H. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 387-394 (1990).
9. Thum, T. & Borlak, J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet* **355**, 979-983 (2000).
10. Pavek, P. & Dvorak, Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current drug metabolism* **9**, 129-143 (2008).
11. Park, B.K., Pirmohamed, M. & Kitteringham, N.R. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol. Ther.* **68**, 385-424 (1995).
12. Rotger, M. *et al.* Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 1-5 (2005).
13. Gibaldi, M. PHARMACOKINETIC ASPECTS OF DRUG METABOLISM. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **179**, 19-31 (1971).
14. Rowland, M. & Tozer, T.N. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concept and application*. 4 edn. (Wollen Kluwef: 2010).
15. Clark, G.W.B. *et al.* The relationship between gastric pH and the emptying of solid, semisolid and liquid meals. *Neurogastroenterol. Motil.* **5**, 273-279 (1993).
16. Holmes, R. The intestinal brush border. *Gut* **12**, 668-677 (1971).
17. Pang, K.S. MODELING OF INTESTINAL DRUG ABSORPTION: ROLES OF TRANSPORTERS AND METABOLIC ENZYMES (FOR THE GILLETTE REVIEW SERIES). *Drug Metabolism and Disposition* **31**, 1507-1519 (2003).

18. Couture, L., Nash, J.A. & Turgeon, J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol. Rev.* **58**, 244-258 (2006).
19. Wils, P., Warnery, A., Phung-Ba, V., Legrain, S. & Scherman, D. High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 654-658 (1994).
20. Shitara, Y., Horie, T. & Sugiyama, Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. *Eur. J. Pharm. Sci.* **27**, 425-446 (2006).
21. Giacomini Kathleen M. *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 215-236 (2010).
22. Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**, 1007-1017 (2001).
23. Giacomini, K.M. *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 215-236 (2010).
24. Couture, L., Nash, J.A. & Turgeon, J. The ATP-Binding Cassette Transporters and Their Implication in Drug Disposition: A Special Look at the Heart. *Pharmacol. Rev.* **58**, 244-258 (2006).
25. Detoxication mechanisms; the metabolism of drugs and allied organic compounds By R. Tecwyn Williams. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1947. viii + 288 pp. 13.5 × 21.5 cm. Price \$5.50. *J. Am. Pharm. Assoc.* **37**, 382-382 (1948).
26. Guengerich, F.P. Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611-650 (2001).
27. Evans, W.E. & Relling, M.V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* **286**, 487-491 (1999).
28. Lin, J. *et al.* Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism. *Arch. Toxicol.* **86**, 87-95 (2012).
29. Eipel, C., Abshagen, K. & Vollmar, B. Regulation of hepatic blood flow: The hepatic arterial buffer response revisited. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **16**, 6046-6057 (2010).
30. GINECO, A.-G. *Cancers du foie (hépatocarcinome)*. <<http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancers-du-foie/maladie/anatomie-physiologie.html>> (2009). Accessed 23 janvier 2015.
31. Schildberg, F.A., Sharpe, A.H. & Turley, S.J. Hepatic immune regulation by stromal cells. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 1-6 (2015).
32. Lakehal, F. *et al.* Phase I and phase II drug-metabolizing enzymes are expressed and heterogeneously distributed in the biliary epithelium. *Hepatology* **30**, 1498-1506 (1999).
33. Murray, G.I., Barnes, T.S., Sewell, H.F., Ewen, S.W., Melvin, W.T. & Burke, M.D. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **25**, 465-475 (1988).
34. Maehle, A.-H. A binding question: the evolution of the receptor concept. *Endeavour* **33**, 135-140 (2009).

35. Paton, W.D.M. A Theory of Drug Action Based on the Rate of Drug-Receptor Combination. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **154**, 21-69 (1961).
36. Martin del Campo, A.F., Granados-Soto, V., Aguirre-Banuelos, P., Cardenas, M. & Castaneda-Hernandez, G. The use of the plasma concentration-effect relationship as a tool for the study of the mechanism of action of naloxone effects on mood and endocrine function. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **11**, 361-365 (1997).
37. Aronson, J.K. & Editor-in-Chief, B.J.o.C.P. Concentration-effect and dose-response relations in clinical pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **63**, 255-257 (2007).
38. Kang, J.-S. & Lee, M.-H. Overview of Therapeutic Drug Monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine* **24**, 1-10 (2009).
39. Smith, D.A., Di, L. & Kerns, E.H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 929-939 (2010).
40. Mariappan, T.T., Mandlekar, S. & Marathe, P. Insight into tissue unbound concentration: utility in drug discovery and development. *Current drug metabolism* **14**, 324-340 (2013).
41. Roberts, M.S. & Rowland, M. Correlation between in-vitro microsomal enzyme activity and whole organ hepatic elimination kinetics: analysis with a dispersion model. *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 177-181 (1986).
42. Jansson, R., Bredberg, U. & Ashton, M. Prediction of Drug Tissue to Plasma Concentration Ratios Using a Measured Volume of Distribution in Combination With Lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **97**, 2324-2339 (2008).
43. Chu, X. *et al.* Intracellular Drug Concentrations and Transporters: Measurement, Modeling, and Implications for the Liver. *Clin. Pharmacol. Ther.* **94**, 126-141 (2013).
44. Iwatsubo, T. *et al.* Prediction of in vivo hepatic metabolic clearance of YM796 from in vitro data by use of human liver microsomes and recombinant P-450 isozymes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, (1997).
45. Turncliff, R.Z., Hoffmaster, K.A., Kalvass, J.C., Pollack, G.M. & Brouwer, K.L.R. Hepatobiliary Disposition of a Drug/Metabolite Pair: Comprehensive Pharmacokinetic Modeling in Sandwich-Cultured Rat Hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 881-889 (2006).
46. Cusato, J. *et al.* Intracellular accumulation of boceprevir according to plasma concentrations and pharmacogenetics. *Int. J. Antimicrob. Agents* **45**, 657-661 (2015).
47. Ding, X. & Kaminsky, L.S. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 149-173 (2003).
48. Overington, J.P., Al-Lazikani, B. & Hopkins, A.L. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996 (2006).
49. Addis, T. & Watanabe, C.K. A method for the measurement of the urea-excreting function of the kidneys. *The Journal of biological chemistry* **28**, 251-259 (1916).

50. Wagner, J.G. History of pharmacokinetics. *Pharmacol. Ther.* **12**, 537-562 (1981).
51. Teorell, T. Kinetics of distribution of substances administered to the body. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* **57**, 205-240 (1937).
52. Lewis, A.E. The concept of hepatic clearance. *Am. J. Clin. Pathol.* **18**, 789-795 (1948).
53. Lewis, A.E. Investigation of hepatic function by clearance techniques. *Am. J. Physiol.* **163**, 54-61 (1950).
54. Dost, F. Die Clearance. *Klin. Wochenschr.* **27**, 257-264 (1949).
55. Hoenig, V. & Schuck, O. Hepatic clearance theory and clinical application. *Rev. Czech. Med.* **2**, 62-66 (1956).
56. Gladtko, E. History of Pharmacokinetics. In: *Pharmacokinetics*, Vol. 145 (eds. Pecile, A. and Rescigno, A.) 1-9 (Springer US, 1988).
57. Dost, F. *Der Blutspiegel. Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit.* (Thieme Leipzig: 1953).
58. Riegelman, S., Loo, J.C.K. & Rowland, M. Shortcomings in pharmacokinetic analysis by conceiving the body to exhibit properties of a single compartment. *J. Pharm. Sci.* **57**, 117-123 (1968).
59. Rowland, M., Benet, L.Z. & Graham, G.G. Clearance concepts in pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1**, 123-136 (1973).
60. Bell, L.G., Gilmour, C.R. & Cameron, A.T. CLINICAL STUDIES WITH THE UREA-CLEARANCE TEST. *Can. Med. Assoc. J.* **30**, 246-252 (1934).
61. Van Slyke, D.D., Page, I.H., Hiller, A. & Kirk, E. STUDIES OF UREA EXCRETION. IX. COMPARISON OF UREA CLEARANCES CALCULATED FROM THE EXCRETION OF UREA, OF UREA PLUS AMMONIA, AND OF NITROGEN DETERMINABLE BY HYPOBROMITE. *The Journal of Clinical Investigation* **14**, 901-910 (1935).
62. Brod, J. & Sirota, J.H. THE RENAL CLEARANCE OF ENDOGENOUS "CREATININE" IN MAN. *J. Clin. Invest.* **27**, 645-654 (1948).
63. Van Slyke, D.D. & Dole, V.P. The significance of the urea clearance. *J. Clin. Pathol.* **2**, 273 (1949).
64. McConahey, W.M., Keating, F.R., Jr. & Power, M.H. AN ESTIMATION OF THE RENAL AND EXTRARENAL CLEARANCE OF RADIOIODINE IN MAN. *The Journal of Clinical Investigation* **30**, 778-780 (1951).
65. Delhez, R. Révolution chimique et révolution française. Le discours préliminaire au Traité élémentaire de chimie de Lavoisier. *Revue des questions scientifiques* **143**, 3-26 (1972).
66. Ferner, R.E. & Aronson, J.K. Cato Guldberg and Peter Waage, the history of the Law of Mass Action, and its relevance to clinical pharmacology. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **81**, 52-55 (2016).
67. Sauro, H.M. Network Dynamics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **541**, 269-269 (2009).
68. Gillette, J.R. Factors affecting drug metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **179**, 43-66 (1971).

69. Smith, D.A., Di, L. & Kerns, E.H. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 929-939 (2010).
70. Jones, H.M., Gardner, I.B. & Watson, K.J. Modelling and PBPK Simulation in Drug Discovery. *The AAPS journal* **11**, 155-166 (2009).
71. Liu, L. & Pang, K.S. THE ROLES OF TRANSPORTERS AND ENZYMES IN HEPATIC DRUG PROCESSING. *Drug Metabolism and Disposition* **33**, 1-9 (2005).
72. Cornish-Bowden, A. The origins of enzyme kinetics. *FEBS Lett.* **587**, 2725-2730 (2013).
73. Johnson, K.A. & Goody, R.S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry* **50**, 8264-8269 (2011).
74. Segel, I.H. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems* (Wiley Classics Library: 1993).
75. Deichmann, U., Schuster, S., Mazat, J.-P. & Cornish-Bowden, A. Commemorating the 1913 Michaelis–Menten paper Die Kinetik der Invertinwirkung: three perspectives. *FEBS Journal* **281**, 435-463 (2014).
76. Bajzer, Ž. & Strehler, E.E. About and beyond the Henri-Michaelis–Menten rate equation for single-substrate enzyme kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 982-985 (2012).
77. Schnell, S. Validity of the Michaelis–Menten equation – steady-state or reactant stationary assumption: that is the question. *FEBS Journal* **281**, 464-472 (2014).
78. Shitara, Y., Maeda, K., Ikejiri, K., Yoshida, K., Horie, T. & Sugiyama, Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm. Drug Dispos.* **34**, 45-78 (2013).
79. Kodaira, H., Kusuhara, H., Fuse, E., Ushiki, J. & Sugiyama, Y. Quantitative Investigation of the Brain-to-Cerebrospinal Fluid Unbound Drug Concentration Ratio under Steady-State Conditions in Rats Using a Pharmacokinetic Model and Scaling Factors for Active Efflux Transporters. *Drug Metabolism and Disposition* **42**, 983-989 (2014).
80. US Department of Health and Human Services, F.a.D.A., Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry. Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. *Draft Guidance September 2006*. (2006).
81. Engoren, M. & Barbee, D. Comparison of cardiac output determined by bioimpedance, thermodilution, and the Fick method. *Am. J. Crit. Care* **14**, 40-45 (2005).
82. Krishna, D. & Klotz, U. Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. *Clin. Pharmacokinet.* **26**, 144-160 (1994).
83. Patwardhan, R.V. *et al.* Normal metabolism of morphine in cirrhosis. *Gastroenterology* **81**, 1006-1011 (1981).
84. Mazoit, J.X., Sandouk, P., Scherrmann, J.-M. & Roche, A. Extrahepatic metabolism of morphine occurs in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **48**, 613-618 (1990).
85. Hiraoka, H. *et al.* Kidneys contribute to the extrahepatic clearance of propofol in humans, but not lungs and brain. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **60**, 176-182 (2005).

86. Shibata, Y. & Chiba, M. The Role of Extrahepatic Metabolism in the Pharmacokinetics of the Targeted Covalent Inhibitors Afatinib, Ibrutinib, and Neratinib. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 375-384 (2015).
87. Gundert-Remy, U. *et al.* Extrahepatic metabolism at the body's internal–external interfaces. *Drug Metab. Rev.* **46**, 291-324 (2014).
88. Bieche, I. *et al.* Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 731-742 (2007).
89. Chaudhary, K.R., Batchu, S.N. & Seubert, J.M. Cytochrome P450 enzymes and the heart. *IUBMB Life* **61**, 954-960 (2009).
90. Pires-Gomes, A. & Pérez-Pomares, J. The Epicardium and Coronary Artery Formation. *Journal of Developmental Biology* **1**, 186-202 (2013).
91. Michaud, V., Frappier, M., Dumas, M.-C. & Turgeon, J. Metabolic Activity and mRNA Levels of Human Cardiac CYP450s Involved in Drug Metabolism. *PLoS One* **5**, e15666 (2010).
92. Sacerdoti, D. *et al.* Increased EETs participate in peripheral endothelial dysfunction of cirrhosis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*.
93. Rosolowsky, M., Falck, J.R. & Campbell, W.B. Synthesis and biological activity of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Adv. Prostaglandin. Thromboxane. Leukot. Res.* **21a**, 213-216 (1991).
94. Rendic, S. & Guengerich, F.P. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 38-42 (2014).
95. Klose, T.S., Blaisdell, J.A. & Goldstein, J.A. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **13**, 289-295 (1999).
96. Murray, G.I., Barnes, T.S., Sewell, H.F., Ewen, S.W., Melvin, W.T. & Burke, M.D. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **25**, 465-475 (1988).
97. Gonzalez, F.J. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 346-352 (1992).
98. Schneider, W.C. Intracellular distribution of enzymes; the oxidation of octanoic acid by rat liver fractions. *J. Biol. Chem.* **176**, 259-266 (1948).
99. Lehninger, A.L. & Kennedy, E.P. THE REQUIREMENTS OF THE FATTY ACID OXIDASE COMPLEX OF RAT LIVER. *J. Biol. Chem.* **173**, 753-771 (1948).
100. Kennedy, E.P. & Lehninger, A.L. INTRACELLULAR STRUCTURES AND THE FATTY ACID OXIDASE SYSTEM OF RAT LIVER. *J. Biol. Chem.* **172**, 847-848 (1948).
101. Potter, V.R. THE ASSAY OF ANIMAL TISSUES FOR RESPIRATORY ENZYMES: IV. CELL STRUCTURE IN RELATION TO FATTY ACID OXIDATION. *J. Biol. Chem.* **163**, 437-446 (1946).
102. Coon, M.J. CYTOCHROME P450: Nature's Most Versatile Biological Catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 1-25 (2005).

103. Claude, A. THE CONSTITUTION OF PROTOPLASM. *Science* **97**, 451-456 (1943).
104. Cooper, J.R., Axelrod, J. & Brodie, B.B. INHIBITORY EFFECTS OF  $\beta$ -DIETHYLAMINOETHYL DIPHENYLPROPYLACETATE ON A VARIETY OF DRUG METABOLIC PATHWAYS IN VITRO. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **112**, 55-63 (1954).
105. Axelrod, J. THE ENZYMATIC DEMETHYLATION OF EPHEDRINE. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **114**, 430-438 (1955).
106. Axelrod, J. THE ENZYMATIC N-DEMETHYLATION OF NARCOTIC DRUGS. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **117**, 322-330 (1956).
107. Axelrod, J. THE ENZYMATIC CONVERSION OF CODEINE TO MORPHINE. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **115**, 259-267 (1955).
108. Garfinkel, D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**, 493-509 (1958).
109. Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**, 376-386 (1958).
110. Omura, T. & Sato, R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. EVIDENCE FOR ITS HEMOPROTEIN NATURE. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378 (1964).
111. Omura, T. & Sato, R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. SOLUBILIZATION, PURIFICATION, AND PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* **239**, 2379-2385 (1964).
112. Omura, T. & Sato, R. A New Cytochrome in Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**, PC1375-PC1376 (1962).
113. McDougle, D.R. *et al.* Incorporation of charged residues in the CYP2J2 F-G loop disrupts CYP2J2–lipid bilayer interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**, 2460-2470 (2015).
114. Guengerich, F.P. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* **266**, 10019-10022 (1991).
115. Wester, M.R. *et al.* The Structure of Human Cytochrome P450 2C9 Complexed with Flurbiprofen at 2.0-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **279**, 35630-35637 (2004).
116. Guengerich, F.P. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **21**, 163-168 (2007).
117. Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D. & Dawson, J.H. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2841-2888 (1996).
118. Peter Guengerich, F. Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **409**, 59-71 (2003).
119. Nelson, D.R. Cytochrome P450 and the Individuality of Species. *Arch. Biochem. Biophys.* **369**, 1-10 (1999).
120. Shah, M.B. *et al.* Structural and Biophysical Characterization of Human Cytochromes P450 2B6 and 2A6 Bound to Volatile Hydrocarbons: Analysis and Comparison. *Mol. Pharmacol.* **87**, 649-659 (2015).
121. Rawlins, M.D. Variability in Response to Drugs. *Br. Med. J.* **4**, 91-94 (1974).



122. Evans, W.E. & Johnson, J.A. Pharmacogenomics: The Inherited Basis for Interindividual Differences in Drug Response. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2**, 9-39 (2001).
123. Wilkinson, G.R. Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2211-2221 (2005).
124. Frangogiannis, N.G. *Matricellular Proteins in Cardiac Adaptation and Disease*, Vol. 92 (2012).
125. Baudino, T.A., Carver, W., Giles, W. & Borg, T.K. *Cardiac fibroblasts: friend or foe?*, Vol. 291 (2006).
126. Tirziu, D., Giordano, F.J. & Simons, M. Cell Communications in the Heart. *Circulation* **122**, 928-937 (2010).
127. Nag, A.C. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* **28**, 41-61 (1980).
128. Ottaviano, F.G. & Yee, K.O. Communication signals between cardiac fibroblasts and cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**, 513-521 (2011).
129. Martin, M.L. & Blaxall, B.C. Cardiac Intercellular Communication: Are myocytes and fibroblasts fair-weather friends? *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 768-782 (2012).
130. Drouin, E., Charpentier, F., Gauthier, C., Laurent, K. & Le Marec, H. Electrophysiologic characteristics of cells spanning the left ventricular wall of human heart: Evidence for presence of M cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* **26**, 185-192 (1995).
131. Berk, B.C., Fujiwara, K. & Lehoux, S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of Clinical Investigation* **117**, 568-575 (2007).
132. Brown, C.A. & Black, S.D. Membrane topology of mammalian cytochromes P-450 from liver endoplasmic reticulum. Determination by trypsinolysis of phenobarbital-treated microsomes. *J. Biol. Chem.* **264**, 4442-4449 (1989).
133. Glembotski, C.C. *Roles for the Sarco-/Endoplasmic Reticulum in Cardiac Myocyte Contraction, Protein Synthesis, and Protein Quality Control*, Vol. 27 (2012).
134. Porter, K.R., Claude, A. & Fullam, E.F. A study of tissue culture cells by electron microscopy: methods and preliminary observations. *The Journal of Experimental Medicine* **81**, 233-246 (1945).
135. Kitakaze, M. & Tsukamoto, O. What Is the Role of ER Stress in the Heart?: Introduction and Series Overview. *Circ. Res.* **107**, 15-18 (2010).
136. Riggs, J.E. Alcohol-associated rhabdomyolysis: ethanol induction of cytochrome P450 may potentiate myotoxicity. *Clin. Neuropharmacol.* **21**, 363-364 (1998).
137. Pessah, I.N., Kim, K.H. & Feng, W. Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex. *Front. Biosci.* **7**, a72-79 (2002).
138. Shiels, H.A. & Galli, G.L.J. *The Sarcoplasmic Reticulum and the Evolution of the Vertebrate Heart*, Vol. 29 (2014).
139. Seubert, J. *et al.* Enhanced Postischemic Functional Recovery in CYP2J2 Transgenic Hearts Involves Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels and p42/p44 MAPK Pathway. *Circ. Res.* **95**, 506-514 (2004).
140. Wu, S. *et al.* Molecular Cloning, Expression, and Functional Significance of a Cytochrome P450 Highly Expressed in Rat Heart Myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 12551-12559 (1997).

141. Enayetallah, A.E., French, R.A., Thibodeau, M.S. & Grant, D.F. Distribution of Soluble Epoxide Hydrolase and of Cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in Human Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 447-454 (2004).
142. Evangelista, E.A., Kaspara, R., Mokadam, N.A., Jones, J.P. & Totah, R.A. Activity, Inhibition, and Induction of Cytochrome P450 2J2 in Adult Human Primary Cardiomyocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **41**, 2087-2094 (2013).
143. Feenstra, J., Grobbee, D.E., Remme, W.J. & Stricker, B.H.C. Drug-induced heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**, 1152-1162 (1999).
144. Jia, L. & Liu, X. The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments. *Current drug metabolism* **8**, 822-829 (2007).
145. Meyerhof, M. & Schacht, J. THE THEOLOGUS AUTODIDACTUS OF IBN AL NAFĪS *Islamic Studies* **9**, 99-102 (1970).
146. Christakopoulos, P. & Topakas, E. Editorial Note: Advances in Enzymology and Enzyme Engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2**, e201209001 (2012).
147. Walker, J.K. Observations on the Use of Benzoic Acid: In certain Affections of the Urinary Organs. *Provincial Medical and Surgical Journal* **3**, 425-427 (1842).
148. Bachmann, C. & Bickel, M.H. History of Drug Metabolism: The First Half of the 20th Century. *Drug Metab. Rev.* **16**, 185-253 (1985).
149. Pacifici, G.M., Franchi, M., Bencini, C., Repetti, F., Di Lascio, N. & Muraro, G.B. Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica* **18**, 849-856 (1988).
150. Potter, V.R. & Elvehjem, C.A. A MODIFIED METHOD FOR THE STUDY OF TISSUE OXIDATIONS. *J. Biol. Chem.* **114**, 495-504 (1936).
151. Claude, A. & Fullam, E.F. The preparation of sections of guinea pig liver for electron microscopy. . *The Journal of Experimental Medicine* **83**, 499-503 (1946).
152. Claude, A. Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation: I. Problems, methods, and preparation of extract. . *The Journal of Experimental Medicine* **84**, 51-59 (1946).
153. Claude, A. Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation: II. Experimental procedures and results. . *The Journal of Experimental Medicine* **84**, 61-89 (1946).
154. Larsen, J.A. Extrahepatic metabolism of ethanol in man. *Nature* **184(Suppl 16)**, 1236 (1959).
155. CL, L., EG, M., RL, R. & TE, G. Comparison of in vitro drug metabolism by lung, liver, and kidney of several common laboratory species. *Drug Metab. Dispos.* **3**, 259-265 (1975).
156. Wang, P.P. *et al.* Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes. *Biochemistry* **22**, 5375-5383 (1983).
157. Wu, S., Moomaw, C.R., Tomer, K.B., Falck, J.R. & Zeldin, D.C. Molecular Cloning and Expression of CYP2J2, a Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Highly Expressed in Heart. *J. Biol. Chem.* **271**, 3460-3468 (1996).
158. Thum, T. & Borlak, J. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *FASEB J.* **16**, 1537-1549 (2002).

159. Costa, C., Catania, S., De Pasquale, R., Stancanelli, R., Scribano, G.M. & Melchini, A. Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: Role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxicology* **271**, 83-86 (2010).
160. Wadzinski, T.L. *et al.* Endocrine disruption in human placenta: expression of the dioxin-inducible enzyme, CYP1A1, is correlated with that of thyroid hormone-regulated genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E2735-2743 (2014).
161. Bernauer, U., Heinrich-Hirsch, B., Tönnies, M., Peter-Matthias, W. & Gundert-Remy, U. Characterisation of the xenobiotic-metabolizing Cytochrome P450 expression pattern in human lung tissue by immunochemical and activity determination. *Toxicol. Lett.* **164**, 278-288 (2006).
162. Liu, N., Zhang, Q.-Y., Vakharia, D., Dunbar, D. & Kaminsky, L.S. Induction of CYP1A by Benzo[k]fluoranthene in Human Hepatocytes: CYP1A1 or CYP1A2? *Arch. Biochem. Biophys.* **389**, 130-134 (2001).
163. Kiyohara, C. & Hirohata, T. Environmental Factors and Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity (CYP1A1 Phenotype) in Human Lymphocytes. *J. Epidemiol.* **7**, 244-250 (1997).
164. Nishimura, M., Yaguti, H., Yoshitsugu, H., Naito, S. & Satoh, T. Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123**, 369-375 (2003).
165. Zheng, Q., Sha, X., Liu, J., Heath, E., LoRusso, P. & Li, J. Association of Human Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) Polymorphisms with Differential Metabolism and Cytotoxicity of Aminoflavone. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 2803-2813 (2010).
166. Lodovici, M. *et al.* Benzo(a)pyrene Diol-epoxide (BPDE)-DNA Adduct Levels in Leukocytes of Smokers in Relation to Polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **13**, 1342-1348 (2004).
167. Gong, F.-F. *et al.* Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphism and susceptibility to esophageal cancer: an updated meta-analysis of 27 studies. *Tumor Biol.* **35**, 10351-10361 (2014).
168. Hankinson, O. The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 307-340 (1995).
169. San Jose, C., Cabanillas, A., Benitez, J., Carrillo, J., Jimenez, M. & Gervasini, G. CYP1A1 gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer* **10**, 463 (2010).
170. Schwarz, D., Kisselev, P., Cascorbi, I., Schunck, W.-H. & Roots, I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* **22**, 453-459 (2001).
171. Schwarz, D., Kisselev, P., Cascorbi, I., Schunck, W. & Roots, I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* **22**, 453 - 459 (2001).
172. NEBERT, D.W., INGELMAN-SUNDBERG, M. & DALY, A.K. GENETIC EPIDEMIOLOGY OF ENVIRONMENTAL TOXICITY AND CANCER SUSCEPTIBILITY: HUMAN ALLELIC POLYMORPHISMS IN DRUG-

- METABOLIZING ENZYME GENES, THEIR FUNCTIONAL IMPORTANCE, AND NOMENCLATURE ISSUES. *Drug Metab. Rev.* **31**, 467-487 (1999).
173. Esteller, M., Garcia, A., Martinez-Palones, J.M., Xercavins, J. & Reventos, J. Germ line polymorphisms in cytochrome-P450 1A1 (C4887 CYP1A1) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* **18**, 2307-2311 (1997).
  174. Lewis, B.C., Mackenzie, P.I. & Miners, J.O. Comparative homology modeling of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and confirmation of residues involved in 7-ethoxyresorufin O-deethylation by site-directed mutagenesis and enzyme kinetic analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* **468**, 58-69 (2007).
  175. Zhang, B., Cao, H. & Rao, G.N. Fibroblast Growth Factor-2 Is a Downstream Mediator of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Signaling in 14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid-induced Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 905-914 (2006).
  176. Cheranov, S.Y., Karpurapu, M., Wang, D., Zhang, B., Venema, R.C. & Rao, G.N. *An essential role for SRC-activated STAT-3 in 14,15-EET-induced VEGF expression and angiogenesis*, Vol. 111 (2008).
  177. Wei, X. *et al.* Elevated 14,15- epoxyeicosatrienoic acid by increasing of cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 and decreasing of soluble epoxide hydrolase associated with aggressiveness of human breast cancer. *BMC Cancer* **14**, 841 (2014).
  178. Schwarz, D. *et al.* Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1445-1457 (2004).
  179. Phillips, I.R. *et al.* A cytochrome P-450 gene family mapped to human chromosome 19. *Ann. Hum. Genet.* **49**, 267-274 (1985).
  180. Wang, H. & Tompkins, L.M. CYP2B6: New Insights into a Historically Overlooked Cytochrome P450 Isozyme. *Current drug metabolism* **9**, 598-610 (2008).
  181. Venkatakrisnan, K., von Moltke, L.L., Court, M.H., Harmatz, J.S., Crespi, C.L. & Greenblatt, D.J. Comparison between Cytochrome P450 (CYP) Content and Relative Activity Approaches to Scaling from cDNA-Expressed CYPs to Human Liver Microsomes: Ratios of Accessory Proteins as Sources of Discrepancies between the Approaches. *Drug Metabolism and Disposition* **28**, 1493-1504 (2000).
  182. Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F.P. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 414-423 (1994).
  183. Zhang, H., Davis, C.D., Sinz, M.W. & Rodrigues, A.D. Cytochrome P450 reaction-phenotyping: an industrial perspective. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **3**, 667-687 (2007).
  184. Turpeinen, M. & Zanger, U.M. Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance. *Drug Metabol. Drug Interact.* **27**, 185-197 (2012).

185. Zanger, U.M. & Klein, K. Pharmacogenetics of Cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): Advances on Polymorphisms, Mechanisms, and Clinical Relevance. *Frontiers in Genetics* **4**, (2013).
186. Murray, G.I. *et al.* The distribution of different forms of cytochrome P-450 in human liver. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 1202 (1990).
187. Mo, S.L., Liu, Y.H., Duan, W., Wei, M.Q., Kanwar, J.R. & Zhou, S.F. Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6. *Current drug metabolism* **10**, 730-753 (2009).
188. Miksys, S. & Tyndale, R.F. Cytochrome P450-mediated drug metabolism in the brain. *J. Psychiatry Neurosci.* **38**, 152-163 (2013).
189. EKINS, S. & WRIGHTON, S.A. THE ROLE OF CYP2B6 IN HUMAN XENOBIOTIC METABOLISM\*. *Drug Metab. Rev.* **31**, 719-754 (1999).
190. Hodgson, E. & Rose, R.L. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacol. Ther.* **113**, 420-428 (2007).
191. Gervot, L. *et al.* Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* **9**, 295-306 (1999).
192. Janmohamed, A., Dolphin, C.T., Phillips, I.R. & Shephard, E.A. Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 777-786 (2001).
193. Bertrand, J. *et al.* Dependence of Efavirenz- and Rifampicin-Isoniazid-Based Antituberculosis Treatment Drug-Drug Interaction on CYP2B6 and NAT2 Genetic Polymorphisms: ANRS 12154 Study in Cambodia. *J. Infect. Dis.* **209**, 399-408 (2014).
194. Miksys, S., Lerman, C., Shields, P.G., Mash, D.C. & Tyndale, R.F. Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* **45**, 122-132 (2003).
195. Aleksa, K., Matsell, D., Krausz, K., Gelboin, H., Ito, S. & Koren, G. Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implications for ifosfamide nephrotoxicity. *Pediatr. Nephrol.* **20**, 872-885 (2005).
196. Rifkind, A.B., Lee, C., Chang, T.K.H. & Waxman, D.J. Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: Regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **320**, 380-389 (1995).
197. Eap, C.B. *et al.* Stereoselective Block of hERG Channel by (S)-Methadone and QT Interval Prolongation in CYP2B6 Slow Metabolizers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**, 719-728 (2007).
198. Williams, J.A. *et al.* DRUG-DRUG INTERACTIONS FOR UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE SUBSTRATES: A PHARMACOKINETIC EXPLANATION FOR TYPICALLY OBSERVED LOW EXPOSURE (AUCI/AUC) RATIOS. *Drug Metabolism and Disposition* **32**, 1201-1208 (2004).
199. Totah, R.A. & Rettie, A.E. Cytochrome P450 2C8: Substrates, Inhibitors, Pharmacogenetics, and Clinical Relevance[ast]. *Clin. Pharmacol. Ther.* **77**, 341-352 (2005).

200. Rahman, A., Korzekwa, K.R., Grogan, J., Gonzalez, F.J. & Harris, J.W. Selective Biotransformation of Taxol to 6 $\alpha$ -Hydroxytaxol by Human Cytochrome P450 2C8. *Cancer Res.* **54**, 5543-5546 (1994).
201. Dai, D. *et al.* Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* **11**, 597-607 (2001).
202. Schoch, G.A., Yano, J.K., Wester, M.R., Griffin, K.J., Stout, C.D. & Johnson, E.F. Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 2C8: EVIDENCE FOR A PERIPHERAL FATTY ACID BINDING SITE. *J. Biol. Chem.* **279**, 9497-9503 (2004).
203. Total, R.A. & Rettie, A.E. Cytochrome P450 2C8: Substrates, Inhibitors, Pharmacogenetics, and Clinical Relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* **77**, 341-352 (2005).
204. Ohyama, K., Nakajima, M., Nakamura, S., Shimada, N., Yamazaki, H. & Yokoi, T. A Significant Role of Human Cytochrome P450 2C8 in Amiodarone N-Deethylation: An Approach to Predict the Contribution with Relative Activity Factor. *Drug Metabolism and Disposition* **28**, 1303-1310 (2000).
205. Kaspera, R. *et al.* Cerivastatin in vitro metabolism by CYP2C8 variants found in patients experiencing rhabdomyolysis. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 619-629 (2010).
206. Kazmi, F., Barbara, J.E., Yerino, P. & Parkinson, A. A Long-Standing Mystery Solved: The Formation of 3-Hydroxydesloratadine is Catalyzed by CYP2C8 but Prior Glucuronidation of Desloratadine by UGT2B10 is an Obligatory Requirement. *Drug Metabolism and Disposition*, (2015).
207. Bajpai, P. *et al.* Targeting of Splice Variants of Human Cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) to Mitochondria and Their Role in Arachidonic Acid Metabolism and Respiratory Dysfunction. *J. Biol. Chem.* **289**, 29614-29630 (2014).
208. Zeldin, D.C., Dubois, R.N., Falck, J.R. & Capdevila, J.H. Molecular Cloning, Expression and Characterization of an Endogenous Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Isoform. *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 76-86 (1995).
209. Nakajima, T. *et al.* Styrene Metabolism by cDNA-Expressed Human Hepatic and Pulmonary Cytochromes P450. *Chem. Res. Toxicol.* **7**, 891-896 (1994).
210. Yasar, U. *et al.* Allelic variants of cytochromes P450 2C modify the risk for acute myocardial infarction. *Pharmacogenetics* **13**, 715-720 (2003).
211. Dai, D. *et al.* Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenet. Genomics* **11**, 597-607 (2001).
212. Hu, G.-X. *et al.* In Vitro and in Vivo Characterization of 13 CYP2C9 allelic variants found in Chinese Han population. *Drug Metabolism and Disposition*, (2015).
213. Paine, M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E. & Zeldin, D.C. THE HUMAN INTESTINAL CYTOCHROME P450 "PIE". *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 880-886 (2006).
214. DeLozier, T.C. *et al.* Detection of Human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in Cardiovascular Tissues. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 682-688 (2007).

215. Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinkovic, D. & Jhoti, H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**, 464-468 (2003).
216. Kirchheiner, J. *et al.* Impact of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tolbutamide kinetics and the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Pharmacogenetics* **12**, 101-109 (2002).
217. Rettie, A.E. *et al.* Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 54-59 (1992).
218. Bajpai, M., Roskos, L.K., Shen, D.D. & Levy, R.H. Roles of cytochrome P4502C9 and cytochrome P4502C19 in the stereoselective metabolism of phenytoin to its major metabolite. *Drug Metabolism and Disposition* **24**, 1401-1403 (1996).
219. Fleming, I. Cytochrome P450 and Vascular Homeostasis. *Circ. Res.* **89**, 753-762 (2001).
220. Samer, C.F., Lorenzini, K.I., Rollason, V., Daali, Y. & Desmeules, J.A. Applications of CYP450 Testing in the Clinical Setting. *Mol. Diagn. Ther.* **17**, 165-184 (2013).
221. Teh, L.K. & Bertilsson, L. Pharmacogenomics of *CYP2D6*: Molecular Genetics, Interethnic Differences and Clinical Importance. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **27**, 55-67 (2012).
222. Marez, D. *et al.* Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* **7**, 193-202 (1997).
223. Zhang, Q.-Y., Dunbar, D., Ostrowska, A., Zeisloft, S., Yang, J. & Kaminsky, L.S. Characterization of Human Small Intestinal Cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition* **27**, 804-809 (1999).
224. Guidice, J.-M.L. *et al.* Evidence for CYP2D6 Expression in Human Lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 79-85 (1997).
225. Lieber, C.S. *Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role*, Vol. 77 (1997).
226. Guengerich, F.P., Kim, D.H. & Iwasaki, M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 168-179 (1991).
227. Sidorik, L. *et al.* Molecular chaperone, HSP60, and cytochrome P450 2E1 co-expression in dilated cardiomyopathy. *Cell Biol. Int.* **29**, 51-55 (2005).
228. Giordano, F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 500-508 (2005).
229. Dhalla, N.S., Temsah, R.M. & Netticadan, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* **18**, 655-673 (2000).
230. Cederbaum, A.I., Wu, D., Mari, M. & Bai, J. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1539-1543 (2001).
231. Lu, D. *et al.* Knockdown of Cytochrome P450 2E1 Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in the cTnTR141W Dilated Cardiomyopathy Transgenic Mice. *Hypertension* **60**, 81-89 (2012).

232. Carroccio, A., Wu, D. & Cederbaum, A.I. Ethanol increases content and activity of human cytochrome P4502E1 in a transduced HepG2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 727-733 (1994).
233. Botto, F. *et al.* Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1095-1103 (1994).
234. George, J., Liddle, C., Murray, M., Byth, K. & Farrell, G.C. Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 873-881 (1995).
235. King, L.M. *et al.* Cloning of CYP2J2 Gene and Identification of Functional Polymorphisms. *Mol. Pharmacol.* **61**, 840-852 (2002).
236. Capdevila, J.H., Falck, J.R. & Harris, R.C. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J. Lipid Res.* **41**, 163-181 (2000).
237. Node K Fau - Huo, Y. *et al.* Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* **285**, 1276-1279 (1999).
238. Spiecker, M. & Liao, J.K. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 413-420 (2005).
239. Spiecker, M. *et al.* Risk of Coronary Artery Disease Associated With Polymorphism of the Cytochrome P450 Epoxygenase CYP2J2. *Circulation* **110**, 2132-2136 (2004).
240. Askari, A., Thomson, S.J., Edin, M.L., Zeldin, D.C. & Bishop-Bailey, D. Roles of the epoxygenase CYP2J2 in the endothelium. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **107**, 56-63 (2013).
241. Capdevila, J.H., Karara, A., Waxman, D.J., Martin, M.V., Falck, J.R. & Guengerich, F.P. Cytochrome P-450 enzyme-specific control of the regio- and enantiofacial selectivity of the microsomal arachidonic acid epoxygenase. *J. Biol. Chem.* **265**, 10865-10871 (1990).
242. Marciante, K.D. *et al.* Common variation in cytochrome P450 epoxygenase genes and the risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke. *Pharmacogenet. Genomics* **18**, 535-543 510.1097/FPC.1090b1013e3282fd1287 (2008).
243. Campbell, W. & Fleming, I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **459**, 881-895 (2010).
244. Node, K. & Huo, Y. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* **285**, 1276 - 1279 (1999).
245. Fang, X. *et al.* *Effect of soluble epoxide hydrolase inhibition on epoxyeicosatrienoic acid metabolism in human blood vessels*, Vol. 287 (2004).
246. Chen, W., Yang, S., Ping, W., Fu, X., Xu, Q. & Wang, J. CYP2J2 and EETs Protect Against Lung Ischemia/Reperfusion Injury via Anti-Inflammatory Effects *in Vivo* and *in Vitro*. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 2043-2054 (2015).
247. Liu, P.-Y. *et al.* Synergistic effect of cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2\*7 polymorphism with smoking on the onset of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis* **195**, 199-206 (2007).



248. Hoffmann, M.M. *et al.* The -50G>T Polymorphism in the Promoter of the CYP2J2 Gene in Coronary Heart Disease: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Clin. Chem.* **53**, 539-540 (2007).
249. Zhang, L. *et al.* Genetic variation in cytochrome P450 2J2 and soluble epoxide hydrolase and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Pharmacogenet. Genomics* **18**, 45-51 (2008).
250. Shahabi, P., Siest, G., Meyer, U.A. & Visvikis-Siest, S. Human cytochrome P450 epoxygenases: Variability in expression and role in inflammation-related disorders. *Pharmacol. Ther.* **In Press.**, (2014).
251. King, L.M. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 7-13 (2005).
252. Xu, Y. *et al.* Association between polymorphisms of CYP2J2 and EPHX2 genes and risk of coronary artery disease. *Pharmacogenet. Genomics* **21**, 489-494 410.1097/FPC.1090b1013e3283485eb3283482 (2011).
253. Borgel J Fau - Bulut, D. *et al.* The CYP2J2 G-50T polymorphism and myocardial infarction in patients with cardiovascular risk profile.
254. Dreisbach, A.W. *et al.* The Prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and Soluble Epoxide Hydrolase Polymorphisms in African Americans With Hypertension[ast]. *Am. J. Hypertens.* **18**, 1276-1281 (2005).
255. Wu, S.-N. *et al.* Evidence for Association of Polymorphisms in CYP2J2 and Susceptibility to Essential Hypertension. *Ann. Hum. Genet.* **71**, 519-525 (2007).
256. Guengerich, F.P. CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 1-17 (1999).
257. de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S. & van den Anker, J.N. Cytochrome P450 3A. *Clin. Pharmacokinet.* **37**, 485-505 (1999).
258. Dai, D. *et al.* Identification of Variants of CYP3A4 and Characterization of Their Abilities to Metabolize Testosterone and Chlorpyrifos. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 825-831 (2001).
259. Liu, K.-H. *et al.* Characterization of Ebastine, Hydroxyebastine, and Carebastine Metabolism by Human Liver Microsomes and Expressed Cytochrome P450 Enzymes: Major Roles for CYP2J2 and CYP3A. *Drug Metabolism and Disposition* **34**, 1793-1797 (2006).
260. Lee, C.A. *et al.* Identification of Novel Substrates for Human Cytochrome P450 2J2. *Drug Metabolism and Disposition* **38**, 347-356 (2010).
261. Thum, T. & Borlak, J. Gene expression in distinct regions of the heart. *The Lancet* **355**, 979-983 (2000).
262. Walles, M., Thum, T., Levsen, K. & Borlak, J. Verapamil metabolism in distinct regions of the heart and in cultures of cardiomyocytes of adult rats. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 761-768 (2001).
263. Streetman, D.S., Bertino, J.S., Jr. & Nafziger, A.N. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* **10**, 187-216 (2000).
264. Powell, P.K., Wolf, I. & Lasker, J.M. Identification of CYP4A11 as the Major Lauric Acid [omega]-Hydroxylase in Human Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 219-226 (1996).
265. Kawashima, H. *et al.* Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid omega-hydroxylase. *J. Biochem.* **116**, 74-80 (1994).

266. Choi, S., Han, S., Lee, H., Chun, Y.-J. & Kim, D. Evaluation of Luminescent P450 Analysis for Directed Evolution of Human CYP4A11. *Biomol. Ther. (Seoul)* **21**, 487-492 (2013).
267. Dierks, E.A., Zhang, Z., Johnson, E.F. & de Montellano, P.R.O. The Catalytic Site of Cytochrome P450A11 (CYP4A11) and Its L131F Mutant. *J. Biol. Chem.* **273**, 23055-23061 (1998).
268. Ma, Y.H. *et al.* 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is an endogenous vasoconstrictor of canine renal arcuate arteries. *Circ. Res.* **72**, 126-136 (1993).
269. Lasker, J.M., Chen, W.B., Wolf, I., Blowski, B.P., Wilson, P.D. & Powell, P.K. Formation of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid, a Vasoactive and Natriuretic Eicosanoid, in Human Kidney: ROLE OF CYP4F2 AND CYP4A11. *J. Biol. Chem.* **275**, 4118-4126 (2000).
270. Zou, A.P. *et al.* 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel in renal arterioles. *Am. J. Physiol.* **270**, R228-237 (1996).
271. Nowicki, S. *et al.* 20-Hydroxyeicosa-tetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Clin. Invest.* **99**, 1224-1230 (1997).
272. Ward, N.C. *et al.* Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid are elevated in stroke patients compared with healthy controls. *Clin. Sci. (Lond.)* **121**, 501-507 (2011).
273. Ding, H. *et al.* Association of Common Variants of CYP4A11 and CYP4F2 with Stroke in the Han Chinese Population. *Pharmacogenet. Genomics* **20**, 187-194 (2010).
274. Saito, T. *et al.* Functional characterization of 10 CYP4A11 allelic variants to evaluate the effect of genotype on arachidonic acid  $\omega$ -hydroxylation. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **30**, 119-122 (2015).
275. Oliw, E.H., Guengerich, F.P. & Oates, J.A. Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. Isolation and metabolism of four epoxide intermediates. *J. Biol. Chem.* **257**, 3771-3781 (1982).
276. Gleim, S., Stitham, J., Tang, W., Martin, K. & Hwa, J. An eicosanoid-centric view of atherothrombotic risk factors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1-20.
277. Guyatt, G.H. *et al.* Executive Summary. *Chest* **141**, 7S-47S (2012).
278. Capdevila, J.H. & Falck, J.R. The CYP P450 Arachidonic Acid Monooxygenases: From Cell Signaling to Blood Pressure Regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 571-576 (2001).
279. Fitzpatrick Fa Fau - Ennis, M.D., Ennis Md Fau - Baze, M.E., Baze Me Fau - Wynalda, M.A., Wynalda Ma Fau - McGee, J.E., McGee Je Fau - Liggett, W.F. & Liggett, W.F. Inhibition of cyclooxygenase activity and platelet aggregation by epoxyeicosatrienoic acids. Influence of stereochemistry.
280. Karara, A. *et al.* Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of the rat kidney cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 13565-13570 (1993).
281. Capdevila Jh Fau - Falck, J.R., Falck Jr Fau - Imig, J.D. & Imig, J.D. Roles of the cytochrome P450 arachidonic acid monooxygenases in the control of systemic blood pressure and experimental hypertension.

282. Fleming, I. Vascular Cytochrome P450 Enzymes: Physiology and Pathophysiology. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**, 20-25 (2008).
283. Fleming, I. Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **82**, 60-67 (2007).
284. Xu, X., Zhang, X.A. & Wang, D.W. The roles of CYP450 epoxygenases and metabolites, epoxyeicosatrienoic acids, in cardiovascular and malignant diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 597-609 (2011).
285. Spector, A.A. & Norris, A.W. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **292**, C996-C1012 (2007).
286. Imig, J.D. Epoxides and Soluble Epoxide Hydrolase in Cardiovascular Physiology. *Physiol. Rev.* **92**, 101-130 (2012).
287. Edin, M.L. *et al.* Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenase CYP2C8 increases susceptibility to ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart. *The FASEB Journal* **25**, 3436-3447 (2011).
288. Fisslthaler, B. *et al.* Nifedipine Increases Cytochrome P450C Expression and Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses in Coronary Arteries. *Hypertension* **36**, 270-275 (2000).
289. Imig, J. Epoxygenase metabolites. *Mol. Biotechnol.* **16**, 233-251 (2000).
290. Spector, A.A., Fang, X., Snyder, G.D. & Weintraub, N.L. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog. Lipid Res.* **43**, 55-90 (2004).
291. Roman, R.J. P-450 Metabolites of Arachidonic Acid in the Control of Cardiovascular Function. *Physiol. Rev.* **82**, 131-185 (2002).
292. Jiang, H. *et al.* Identification of 5,6-trans-Epoxyeicosatrienoic Acid in the Phospholipids of Red Blood Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 36412-36418 (2004).
293. Inceoglu, B. *et al.* Soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosatrienoic acids modulate two distinct analgesic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 18901-18906 (2008).
294. Zeldin, D.C. *et al.* Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **268**, 6402-6407 (1993).
295. Fava, C., Ricci, M., Melander, O. & Minuz, P. Hypertension, cardiovascular risk and polymorphisms in genes controlling the cytochrome P450 pathway of arachidonic acid: A sex-specific relation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, (2011[Epub ahead of print]).
296. Lee, J.P. *et al.* In vivo activity of epoxide hydrolase according to sequence variation affects the progression of human IgA nephropathy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **300**, F1283-F1290 (2011).
297. Fang, X. *et al.* Pathways of Epoxyeicosatrienoic Acid Metabolism in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 14867-14874 (2001).
298. Spearman, M.E. *et al.* Novel glutathione conjugates formed from epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Arch. Biochem. Biophys.* **242**, 225-230 (1985).
299. Campbell, W.B., Gebremedhin, D., Pratt, P.F. & Harder, D.R. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ. Res.* **78**, 415-423 (1996).

300. Huang, A., Sun, D., Jacobson, A., Carroll, M.A., Falck, J.R. & Kaley, G. Epoxyeicosatrienoic Acids Are Released to Mediate Shear Stress–Dependent Hyperpolarization of Arteriolar Smooth Muscle. *Circ. Res.* **96**, 376-383 (2005).
301. Archer, S.L. *et al.* Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Internal Mammary Artery Is 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid and Causes Relaxation by Activating Smooth Muscle BKCa Channels. *Circulation* **107**, 769-776 (2003).
302. Spector, A.A. Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J. Lipid Res.* **50**, S52-S56 (2009).
303. Fleming, I. *et al.* Epoxyeicosatrienoic Acids Regulate Trp Channel–Dependent Ca<sup>2+</sup> Signaling and Hyperpolarization in Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2612-2618 (2007).
304. Zhang Dx Fau - Gutterman, D.D. & Gutterman, D.D. Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation.
305. Bellien, J., Joannides, R., Richard, V. & Thuillez, C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: A promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacology & Therapeutics* **131**, 1-17 (2011).
306. Campbell, W.B. & Falck, J.R. Arachidonic Acid Metabolites as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Hypertension* **49**, 590-596 (2007).
307. Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. & Nilius, B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434-438 (2003).
308. Imig, J.D., Zhao, X., Capdevila, J.H., Morisseau, C. & Hammock, B.D. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Lowers Arterial Blood Pressure in Angiotensin II Hypertension. *Hypertension* **39**, 690-694 (2002).
309. Ai, D., Shyy, J.Y.J. & Zhu, Y. Linking an insect enzyme to hypertension: angiotensin II-epoxide hydrolase interactions. *Kidney Int.* **77**, 88-92 (2009).
310. Ulu, A. *et al.* Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors Reduce the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mouse Model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **52**, 314-323 310.1097/FJC.1090b1013e318185fa318183c (2008).
311. Lee, C.R., North, K.E., Bray, M.S., Couper, D.J., Heiss, G. & Zeldin, D.C. CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 349-358 310.1097/FPC.1090b1013e32809913ea (2007).
312. Yasar, Ü. *et al.* Allelic variants of cytochromes P450 2C modify the risk for acute myocardial infarction. *Pharmacogenet. Genomics* **13**, 715-720 (2003).
313. Visser, L.E. *et al.* The risk of myocardial infarction in patients with reduced activity of cytochrome P450 2C9. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 473-479 410.1097/1001.fpc.0000236335.0000257046.c0000236338 (2007).
314. King, L.M. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 7-13 (2005).
315. Bellien, J. *et al.* Crucial Role of NO and Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Sustained Conduit Artery Flow-Mediated Dilatation. *Hypertension* **48**, 1088-1094 (2006).

316. Bellien, J. *et al.* Epoxyeicosatrienoic Acids Contribute With Altered Nitric Oxide and Endothelin-1 Pathways to Conduit Artery Endothelial Dysfunction in Essential Hypertension / Clinical Perspective. *Circulation* **125**, 1266-1275 (2012).
317. Rendic, S. & Carlo, F.J.D. Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metab. Rev.* **29**, 413-580 (1997).
318. Hesse, L.M. *et al.* Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. *Pharmacogenetics* **14**, 225-238 (2004).
319. Transon, C., Lecoer, S., Leemann, T., Beaune, P. & Dayer, P. Interindividual variability in catalytic activity and immunoreactivity of three major human liver cytochrome P450 isozymes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **51**, 79-85 (1996).
320. Zanger, U.M. & Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **138**, 103-141 (2013).
321. Snawder, J.E. & Lipscomb, J.C. Interindividual Variance of Cytochrome P450 Forms in Human Hepatic Microsomes: Correlation of Individual Forms with Xenobiotic Metabolism and Implications in Risk Assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 200-209 (2000).
322. Edwards, J.H. Familial predisposition in man. *Br. Med. Bull.* **25**, 58-64 (1969).
323. Harmonization, I.C.o. E15: I. Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories., Vol. Efficacy Guidelines 1.
324. Administration, F.a.D. Paving the Way for Personalized Medicine. FDA's Role in a New Era of Medical Product Development. (2014).
325. O'Reilly, R.A. The Second Reported Kindred with Hereditary Resistance to Oral Anticoagulant Drugs. *N. Engl. J. Med.* **282**, 1448-1451 (1970).
326. RA, O.R. & PM, A. Determinants of the response to oral anticoagulant drugs in man. *Pharmacol. Rev.* **22**, 35-96 (1970).
327. Li, J., Wang, S., Barone, J. & Malone, B. Warfarin Pharmacogenomics. *Pharmacy and Therapeutics* **34**, 422-427 (2009).
328. Bell, R.G., Sadowski, J.A. & Matschiner, J.T. Mechanism of action of warfarin. Warfarin and metabolism of vitamin K1. *Biochemistry* **11**, 1959-1961 (1972).
329. Zhou, S.-F. Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance. *Clin. Pharmacokinet.* **48**, 689-723 (2009).
330. Koch, I. *et al.* Interindividual Variability and Tissue-Specificity in the Expression of Cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 1108-1114 (2002).
331. Schmucker, D.L. Age-related changes in drug disposition. *Pharmacol. Rev.* **30**, 445-456 (1978).
332. Maher, R.L., Hanlon, J.T. & Hajjar, E.R. Clinical Consequences of Polypharmacy in Elderly. *Expert opinion on drug safety* **13**, (2014).
333. Vestal, R.E., Norris, A.H., Tobin, J.D., Cohen, B.H., Shock, N.W. & Andres, R. Antipyrine metabolism in man: influence of age, alcohol, caffeine, and smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.* **18**, 425-432 (1975).

334. Mangoni, A.A. & Jackson, S.H.D. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **57**, 6-14 (2004).
335. Klotz, U. Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab. Rev.* **41**, 67-76 (2009).
336. Aymanns, C., Keller, F., Maus, S., Hartmann, B. & Czock, D. Review on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics and the Aging Kidney. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 314-327 (2010).
337. Shi, S. & Klotz, U. Age-related changes in pharmacokinetics. *Current drug metabolism* **12**, 601-610 (2011).
338. Schmucker, D.L. *et al.* Effects of age and gender on in vitro properties of human liver microsomal monooxygenases. *Clin. Pharmacol. Ther.* **48**, 365-374 (1990).
339. Brodie, M.J., Boobis, A.R., Bulpitt, C.J. & Davies, D.S. Influence of liver disease and environmental factors on hepatic monooxygenase activity in vitro. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **20**, 39-46 (1981).
340. Parkinson, A., Mudra, D.R., Johnson, C., Dwyer, A. & Carroll, K.M. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 193-209 (2004).
341. Schwartz, J.B. The Current State of Knowledge on Age, Sex, and Their Interactions on Clinical Pharmacology. *Clin. Pharmacol. Ther.* **82**, 87-96 (2007).
342. Schmucker, D.L. Liver function and phase I drug metabolism in the elderly: a paradox. *Drugs Aging* **18**, 837-851 (2001).
343. Slinker, B.K. & Glantz, S.A. Multiple Linear Regression: Accounting for Multiple Simultaneous Determinants of a Continuous Dependent Variable. *Circulation* **117**, 1732-1737 (2008).
344. Soldin, O.P. & Mattison, D.R. Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin. Pharmacokinet.* **48**, 143-157 (2009).
345. Gandhi, M., Aweeka, F., Greenblatt, R.M. & Blaschke, T.F. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**, 499-523 (2004).
346. Cummins, C.L., Wu, C.-Y. & Benet, L.Z. Sex-related differences in the clearance of cytochrome P450 3A4 substrates may be caused by P-glycoprotein. *Clin. Pharmacol. Ther.* **72**, 474-489 (2002).
347. Nebert, D.W. & Dieter, M.Z. The evolution of drug metabolism. *Pharmacology* **61**, 124-135 (2000).
348. Jennings, B.L. *et al.* Cytochrome P450 1B1 Contributes to Renal Dysfunction and Damage Caused by Angiotensin II in Mice. *Hypertension* **59**, 348-354 (2012).
349. Villeneuve, J.P. & Pichette, V. Cytochrome P450 and liver diseases. *Current drug metabolism* **5**, 273-282 (2004).
350. Fisher, C.D. *et al.* Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Alterations in Humans with Progressive Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 2087-2094 (2009).
351. Frye, R.F. *et al.* Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **80**, 235-245 (2006).

352. Elbekai, R.H. & El-Kadi, A.O. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol. Ther.* **112**, 564-587 (2006).
353. Fleming, I. & Busse, R. Endothelium-Derived Epoxyeicosatrienoic Acids and Vascular Function. *Hypertension* **47**, 629-633 (2006).
354. Aspromonte, N., Monitillo, F., Puzzovivo, A., Valle, R., Caldarola, P. & Iacoviello, M. Modulation of cardiac cytochrome P450 in patients with heart failure. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **10**, 327-339 (2014).
355. Cheng, T.O. Ischemic cardiomyopathy: a historical note. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 1564-1565 (2002).
356. Burch, G.E., Giles, T.D. & Colcolough, H.L. Ischemic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **79**, 291-292 (1970).
357. Maron, B.J. *et al.* Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* **113**, 1807-1816 (2006).
358. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* **93**, 841-842 (1996).
359. Dube, P. & Weber, K.T. Congestive Heart Failure: Pathophysiologic Consequences of Neurohormonal Activation and the Potential for Recovery: Part II. *The American Journal of the Medical Sciences* **342**, 503-506 (2011).
360. Anker, S.D. *et al.* Hormonal Changes and Catabolic/Anabolic Imbalance in Chronic Heart Failure and Their Importance for Cardiac Cachexia. *Circulation* **96**, 526-534 (1997).
361. Seubert, J.M., Zeldin, D.C., Nithipatikom, K. & Gross, G.J. Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **82**, 50-59 (2007).
362. Tan, F.-L. *et al.* The gene expression fingerprint of human heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11387-11392 (2002).
363. Morgan, E.T. Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin. *Mol. Pharmacol.* **36**, 699-707 (1989).
364. El-Kadi, A.O.S., Bleau, A.-M., Dumont, I., Maurice, H. & du Souich, P. Role of Reactive Oxygen Intermediates in the Decrease of Hepatic Cytochrome P450 Activity by Serum of Humans and Rabbits with an Acute Inflammatory Reaction. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1112-1120 (2000).
365. Dhanasekaran, A. *et al.* Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia. **294**, H724-H735 (2008).
366. Hunter, A.L., Bai, N., Laher, I. & Granville, D.J. Cytochrome p450 2C inhibition reduces post-ischemic vascular dysfunction. *Vascul. Pharmacol.* **43**, 213-219 (2005).
367. Bodiga S Fau - Zhang, R. *et al.* Protective actions of epoxyeicosatrienoic acid: dual targeting of cardiovascular PI3K and KATP channels.

368. Anker, S.D. & von Haehling, S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart* **90**, 464-470 (2004).
369. Matsumori, A., Yamada, T., Suzuki, H., Matoba, Y. & Sasayama, S. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br. Heart J.* **72**, 561-566 (1994).
370. Morgan, E.T. Regulation of Cytochrome P450 by Inflammatory Mediators: Why and How? *Drug Metab. Dispos.* **29**, 207-212 (2001).
371. Galal, A. & du Souich, P. 21-Aminosteroids prevent the down-regulation of hepatic cytochrome P450 induced by hypoxia and inflammation in conscious rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 374-379 (1999).
372. El-Kadi, A.O.S. & Du Souich, P. Depression of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: Characterization of the nature of mediators in human and rabbit serum, and in the liver. *Life Sci.* **63**, 1361-1370 (1998).
373. Mehta, J.L. & Li, D.Y. *Inflammation in ischemic heart disease: Response to tissue injury or a pathogenetic villain?*, Vol. 43 (1999).
374. Hansen, P.R. Role of Neutrophils in Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Circulation* **91**, 1872-1885 (1995).
375. Conney, A.H. Induction of drug-metabolising enzymes: A Path to the Discovery of Multiple Cytochromes P450. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 1-30 (2003).
376. Conney, A.H., Davison, C., Gastel, R. & Burns, J.J. Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **130**, 1-8 (1960).
377. Levin, W., Welch, R.M. & Conney, A.H. Effect of phenobarbital and other drugs on the metabolism and uterotrophic action of estradiol-17 $\beta$  and estrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **159**, 362-371 (1968).
378. Conney, A.H., Jacobson, M., Levin, W., Schneidman, K. & Kuntzman, R. Decreased central depressant effect of progesterone and other steroids in rats pretreated with drugs and insecticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **154**, 310-318 (1966).
379. Lasker, J.M., Huang, M.T. & Conney, A.H. In vitro and in vivo activation of oxidative drug metabolism by flavonoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 162-170 (1984).
380. Tang, W. *et al.* Interaction of Diclofenac and Quinidine in Monkeys: Stimulation of Diclofenac Metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **291**, 1068-1074 (1999).
381. Koley, A.P., Buters, J.T.M., Robinson, R.C., Markowitz, A. & Friedman, F.K. Differential Mechanisms of Cytochrome P450 Inhibition and Activation by  $\alpha$ -Naphthoflavone. *J. Biol. Chem.* **272**, 3149-3152 (1997).
382. Woods, C.M., Fernandez, C., Kunze, K.L. & Atkins, W.M. Allosteric Activation of Cytochrome P450 3A4 by  $\alpha$ -Naphthoflavone: Branch Point Regulation Revealed by Isotope Dilution Analysis. *Biochemistry* **50**, 10041-10051 (2011).
383. Fowler, S. & Zhang, H. In Vitro Evaluation of Reversible and Irreversible Cytochrome P450 Inhibition: Current Status on Methodologies and their Utility for Predicting Drug-Drug Interactions. *The AAPS Journal* **10**, 410-424 (2008).
384. VandenBrink, B.M. & Isoherranen, N. The role of metabolites in predicting drug-drug interactions: Focus on irreversible P450 inhibition. *Current opinion in drug discovery & development* **13**, 66-77 (2010).



385. Zevin, S. & Benowitz, N. Drug Interactions with Tobacco Smoking. *Clin. Pharmacokinet.* **36**, 425-438 (1999).
386. Fischman, A.J. *et al.* Pharmacokinetics of 18F-labeled fluconazole in healthy human subjects by positron emission tomography. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1270-1277 (1993).
387. Tylutki, Z. & Polak, S. Plasma vs heart tissue concentration in humans – literature data analysis of drugs distribution. *Biopharm. Drug Dispos.*, n/a-n/a (2015).
388. Zhang, S., Zhou, Z., Gong, Q., Makielski, J.C. & January, C.T. Mechanism of Block and Identification of the Verapamil Binding Domain to HERG Potassium Channels. *Circ. Res.* **84**, 989-998 (1999).
389. Thurner, P. *et al.* Mechanism of hERG Channel Block by the Psychoactive Indole Alkaloid Ibogaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **348**, 346-358 (2014).
390. Mullany, L.D., French, M.A., Nightingale, C.H., Low, H.B., Ellison, L.H. & Quintiliani, R. Penetration of ceforanide and cefamandole into the right atrial appendage, pericardial fluid, sternum, and intercostal muscle of patients undergoing open heart surgery. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21**, 416-420 (1982).
391. Fischman, A.J. *et al.* Pharmacokinetics of [(18F)]Trovaflaxacin in Healthy Human Subjects Studied with Positron Emission Tomography. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2048-2054 (1998).
392. Spaggiari, D., Geiser, L., Daali, Y. & Rudaz, S. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: An overview of current methodologies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101**, 221-237 (2014).
393. Yu, C., Shin, Y.G., Kosmeder, J.W., Pezzuto, J.M. & van Breemen, R.B. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of inhibition of human cytochrome P450 isozymes by resveratrol and resveratrol-3-sulfate. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 307-313 (2003).
394. Rolsted, K., Kissmeyer, A.-M., Rist, G. & Hansen, S. Evaluation of cytochrome P450 activity in vitro, using dermal and hepatic microsomes from four species and two keratinocyte cell lines in culture. *Archives of Dermatological Research* **300**, 11-18 (2008).
395. Lahoz, A., Donato, M.T., Montero, S., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. A new in vitro approach for the simultaneous determination of phase I and phase II enzymatic activities of human hepatocyte preparations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 240-244 (2008).
396. Dierks, E.A., Stams, K.R., Lim, H.-K., Cornelius, G., Zhang, H. & Ball, S.E. A Method for the Simultaneous Evaluation of the Activities of Seven Major Human Drug-Metabolizing Cytochrome P450s Using an in Vitro Cocktail of Probe Substrates and Fast Gradient Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 23-29 (2001).
397. Bu, H.-Z., Magis, L., Knuth, K. & Teitelbaum, P. High-throughput cytochrome P450 (CYP) inhibition screening via cassette probe-dosing strategy. I. Development of direct injection/on-line guard cartridge extraction/tandem mass spectrometry for the simultaneous detection of CYP probe substrates and their metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1619-1624 (2000).

398. Hammes, G.G. & Wu, C.W. Kinetics of allosteric enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 1-33 (1974).
399. Reed, M.C., Lieb, A. & Nijhout, H.F. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *Bioessays* **32**, 422-429 (2010).
400. Liu, J., Tawa, G.J. & Wallqvist, A. Identifying cytochrome p450 functional networks and their allosteric regulatory elements. *PLoS One* **8**, e81980 (2013).
401. Kramer, M.A. & Tracy, T.S. Studying cytochrome P450 kinetics in drug metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 591-603 (2008).
402. Phyllis Yerino, Paul Toren & Parkinson, A. Evaluation of Ebastine Hydroxylation as a Specific Probe of CYP2J2 in Human Liver Microsomes. In *ISSX; International Society for the Study of Xenobiotics, 8th International Meeting*.
403. Ren, S. *et al.* Discovery and Characterization of Novel, Potent, and Selective Cytochrome P450 2J2 Inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* **41**, 60-71 (2013).
404. Xu, M., Ju, W., Hao, H., Wang, G. & Li, P. Cytochrome P450 2J2: distribution, function, regulation, genetic polymorphisms and clinical significance. *Drug Metab. Rev.* **45**, 311-352 (2013).
405. Lampe, J.N., Fernandez, C., Nath, A. & Atkins, W.M. Nile Red Is a Fluorescent Allosteric Substrate of Cytochrome P450 3A4†. *Biochemistry* **47**, 509-516 (2008).
406. Davydov, D.R. & Halpert, J.R. Allosteric P450 mechanisms: multiple binding sites, multiple conformers or both? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**, 1523-1535 (2008).
407. Baici, A. The specific velocity plot. A graphical method for determining inhibition parameters for both linear and hyperbolic enzyme inhibitors. *Eur. J. Biochem.* **119**, 9-14 (1981).
408. Yoshino, M. & Murakami, K. A graphical method for determining inhibition constants. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **24**, 1288-1290 (2009).
409. Cornish-Bowden, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors (Short Communication). *Biochem. J.* **137**, 143-144 (1974).
410. Ueng, Y.-F., Kuwabara, T., Chun, Y.-J. & Guengerich, F.P. Cooperativity in Oxidations Catalyzed by Cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* **36**, 370-381 (1997).
411. Emoto, C. *et al.* Cooperativity of  $\alpha$ -naphthoflavone in cytochrome P450 3A-dependent drug oxidation activities in hepatic and intestinal microsomes from mouse and human. *Xenobiotica* **31**, 265-275 (2001).
412. Niwa, T., Okada, K., Hiroi, T., Imaoka, S., Narimatsu, S. & Funae, Y. Effect of Psychotropic Drugs on the 21-Hydroxylation of Neurosteroids, Progesterone and Allopregnanolone, Catalyzed by Rat CYP2D4 and Human CYP2D6 in the Brain. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 348-351 (2008).
413. Breedveld, P., Beijnen, J.H. & Schellens, J.H.M. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 17-24 (2006).
414. Poulin, P., Hop, C.E.C.A., Ho, Q., Halladay, J.S., Haddad, S. & Kenny, J.R. Comparative assessment of In Vitro–In Vivo extrapolation methods used for

- predicting hepatic metabolic clearance of drugs. *J. Pharm. Sci.* **101**, 4308-4326 (2012).
415. Grothusen, A., Hardt, J., Brautigam, L., Lang, D. & Bocker, R. A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Arch. Toxicol.* **71**, 64-71 (1996).
  416. Crespi, C.L. & Miller, V.P. The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes— state of the art and prospects for the future. *Pharmacol. Ther.* **84**, 121-131 (1999).
  417. JM, B., JL, T. & L, S. *Biochemistry; 20.3 the Pentose Phosphate Pathway Generates NADPH and Synthesizes Five-Carbon Sugars*. 5th Edition edn. (2002).
  418. Mazur, C.S., Kenneke, J.F., Goldsmith, M.-R. & Brown, C. Contrasting Influence of NADPH and a NADPH-Regenerating System on the Metabolism of Carbonyl-Containing Compounds in Hepatic Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 1801-1805 (2009).
  419. Sevrioukova, I.F., Li, H., Zhang, H., Peterson, J.A. & Poulos, T.L. Structure of a cytochrome P450–redox partner electron-transfer complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1863-1868 (1999).
  420. Hamdane, D., Xia, C., Im, S.-C., Zhang, H., Kim, J.-J.P. & Waskell, L. Structure and Function of an NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase in an Open Conformation Capable of Reducing Cytochrome P450. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 11374-11384 (2009).
  421. Livingstone, D.R., Kirchin, M.A. & Wiseman, A. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica* **19**, 1041-1062 (1989).
  422. Schlenk, D. & Buhler, D.R. Xenobiotic biotransformation in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **94**, 469-475 (1989).
  423. Ronis, M.J.J. & Mason, A.Z. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: Effects of tributyl tin. *Mar. Environ. Res.* **42**, 161-166 (1996).
  424. Solé, M. & Livingstone, D.R. Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and ‘NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase’ activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **141**, 20-31 (2005).
  425. Erickson, D.A., Hollfelder, S., Tenge, J., Gohdes, M., Burkhardt, J.J. & Krieter, P.A. In Vitro Metabolism of the Analgesic Bicyclanilol in the Mouse, Rat, Monkey, and Human. *Drug Metabolism and Disposition* **35**, 2232-2241 (2007).
  426. Kapur, B.M., Hutson, J.R., Chibber, T., Luk, A. & Selby, P. Methadone: a review of drug-drug and pathophysiological interactions. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **48**, 171-195 (2011).
  427. Wang, J.-S. & DeVane, C.L. INVOLVEMENT OF CYP3A4, CYP2C8, AND CYP2D6 IN THE METABOLISM OF (R)- AND (S)-METHADONE IN VITRO. *Drug Metabolism and Disposition* **31**, 742-747 (2003).

428. Eap, C.B. *et al.* Stereoselective block of hERG channel by (S)-methadone and QT interval prolongation in CYP2B6 slow metabolizers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **81**, 719-728 (2007).
429. Moody, D.E., Liu, F. & Fang, W.B. In vitro Inhibition of Methadone and Oxycodone Cytochrome P450-Dependent Metabolism: Reversible Inhibition by H2-Receptor Agonists and Proton-Pump Inhibitors. *J. Anal. Toxicol.*, (2013).
430. Proctor, N.J., Tucker, G.T. & Rostami-Hodjegan, A. Predicting drug clearance from recombinantly expressed CYPs: intersystem extrapolation factors. *Xenobiotica* **34**, 151-178 (2004).
431. Lasseter, K., Dilzer, S., Vargas, R., Waldman, S. & Noveck, R. Pharmacokinetics and Safety of Ebastine in Patients with Impaired Hepatic Function Compared with Healthy Volunteers. *Clin. Pharmacokinet.* **43**, 121-129 (2004).
432. Ko, C.M., Ducic, I., Fan, J., Shuba, Y.M. & Morad, M. Suppression of Mammalian K<sup>+</sup> Channel Family by Ebastine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 233-244 (1997).
433. Chaikin, P., Gillen, M.S., Malik, M., Pentikis, H., Rhodes, G.R. & Roberts, D.J. Co-administration of ketoconazole with H(1)-antagonists ebastine and loratadine in healthy subjects: pharmacokinetic and pharmacodynamic effects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **59**, 346-354 (2005).
434. Girault, I. *et al.* Simultaneous measurement of 23 isoforms from the human cytochrome P450 families 1 to 3 by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1803-1810 (2005).
435. Michaels, S. & Wang, M.Z. The Revised Human Liver Cytochrome P450 “Pie”: Absolute Protein Quantification of CYP4F and CYP3A Enzymes Using Targeted Quantitative Proteomics. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1241-1251 (2014).
436. Molina, D.K. & DiMaio, V.J. Normal organ weights in men: part II-the brain, lungs, liver, spleen, and kidneys. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **33**, 368-372 (2012).
437. Achour, B., Russell, M.R., 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 Metab. Dispos.* **42**, 500-510 (2014).
438. Rackley, C.E., Dodge, H.T., Coble, Y.D. & Hay, R.E. A Method for Determining Left Ventricular Mass in Man. *Circulation* **29**, 666-671 (1964).
439. Ozdemir, V. *et al.* Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* **10**, 373-388 (2000).
440. Lamba, V., Panetta, J.C., Strom, S. & Schuetz, E.G. Genetic Predictors of Interindividual Variability in Hepatic CYP3A4 Expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 1088-1099 (2010).
441. Lin, J.H. & Lu, A.Y. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 535-567 (2001).
442. Temesvári, M., Kóbori, L., Paulik, J., Sárváry, E., Belic, A. & Monostory, K. Estimation of Drug-Metabolizing Capacity by Cytochrome P450 Genotyping and Expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 294-305 (2012).

443. Wei, Z. *et al.* The effect of microRNAs in the regulation of human CYP3A4: a systematic study using a mathematical model. *Sci. Rep.* **4**, 4283 (2014).
444. Ohtsuki, S. *et al.* Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 83-92 (2012).
445. Scott, R.C., Crabbe, D., Krynska, B., Ansari, R. & Kiani, M.F. Aiming for the heart: targeted delivery of drugs to diseased cardiac tissue. *Expert Opinion on Drug Delivery* **5**, 459-470 (2008).
446. Lee, C.A. *et al.* Identifying a Selective Substrate and Inhibitor Pair for the Evaluation of CYP2J2 Activity. *Drug Metabolism and Disposition* **40**, 943-951 (2012).
447. Castell, J.V., Donato, M.T. & Gomez-Lechon, M.J. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp. Toxicol. Pathol.* **57 Suppl 1**, 189-204 (2005).
448. Ding, X. & Kaminsky, L.S. HUMAN EXTRAHEPATIC CYTOCHROMES P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts\*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 149-173 (2003).
449. Warner, M., Hellmold, H., Magnusson, M., Rylander, T., Hedlund, E. & Gustafsson, J.A. Extrahepatic cytochrome P450: role in in situ toxicity and cell-specific hormone sensitivity. *Arch. Toxicol. Suppl.* **20**, 455-463 (1998).
450. Hakkola, J., Pelkonen, O., Pasanen, M. & Raunio, H. Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes in the Human Feto-Placental Unit: Role in Intrauterine Toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **28**, 35-72 (1998).
451. De Bruin, M.L., Pettersson, M., Meyboom, R.H.B., Hoes, A.W. & Leufkens, H.G.M. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. **26**, 590-597 (2005).
452. MacDonald, J.S. & Robertson, R.T. Toxicity testing in the 21st century: a view from the pharmaceutical industry. *Toxicol. Sci.* **110**, 40-46 (2009).
453. Reynolds, J.G. *et al.* HER2-targeted liposomal doxorubicin displays enhanced anti-tumorigenic effects without associated cardiotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **262**, 1-10 (2012).
454. Howell, B.A. & Chauhan, A. A physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for predicting the efficacy of drug overdose treatment with liposomes in man. *J. Pharm. Sci.* **99**, 3601-3619 (2010).
455. Chetty, M. *et al.* Applications of linking PBPK and PD models to predict the impact of genotypic variability, formulation differences, differences in target binding capacity and target site drug concentrations on drug responses and variability. *Front. Pharmacol.* **5**, (2014).
456. Li, G.-f., Wang, K., Chen, R., Zhao, H.-r., Yang, J. & Zheng, Q.-s. Simulation of the pharmacokinetics of bisoprolol in healthy adults and patients with impaired renal function using whole-body physiologically based pharmacokinetic modeling. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 1359-1371 (2012).

# **Annexes**

## **Annexe 1 : Manuscrit 4**

Manuscrit publié dans European Journal of Clinical Pharmacology.



## No effects of pantoprazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy subjects

J. Huguet<sup>1,2</sup> · J. Lu<sup>1</sup> · F. Gaudette<sup>1</sup> · J.-L. Chiasson<sup>1,3,4</sup> · P. Hamet<sup>1,3,4</sup> · V. Michaud<sup>1,2,4</sup> · J. Turgeon<sup>1,2,3,4,5</sup>

Received: 22 January 2016 / Accepted: 19 April 2016 / Published online: 5 May 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

### Abstract

**Purpose** Rosuvastatin disposition is modulated by the expression and activity of several membrane transporters including BCRP (ABCG2). The objective of our study was to investigate the effects of pantoprazole, a previously proposed BCRP inhibitor, on the disposition of rosuvastatin.

**Methods** The impact of pantoprazole (40 mg ID for 2 days) on rosuvastatin pharmacokinetics was evaluated in healthy volunteers ( $n = 16$ ) who received a single oral dose of rosuvastatin (10 mg) either alone or with pantoprazole. Rosuvastatin, *N*-desmethylrosuvastatin, and rosuvastatin lactone levels were quantified in plasma while rosuvastatin and *N*-desmethylrosuvastatin excretion were measured in urine.

**Results** Ratios and 90 % standard confidence interval of geometric means for  $C_{max}$  (1.03 [0.91–1.16]),  $AUC_{0-\infty}$  (1.03 [0.89–1.19]) and renal clearance (0.96 [0.85–1.09]) were all within the pre-specified range of 0.8–1.25, indicating a lack of drug-drug interaction between pantoprazole and rosuvastatin. **Conclusions** Concomitant administration of pantoprazole with rosuvastatin did not affect rosuvastatin plasma concentrations. The use of pantoprazole as a BCRP inhibitor should be revisited when characterizing BCRP-mediated transport in humans.

**Keywords** Rosuvastatin · Pantoprazole · BCRP · ABCG2 · Transporters · Pharmacokinetics · Drug interaction

Principal Clinical Investigator statement: The Principal Clinical Investigator is Dr. Pavl Hamet.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00228-016-2065-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

### Introduction

Rosuvastatin is a powerful synthetic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitor used in the treatment of dyslipidemia [1]. Rosuvastatin is not subjected to significant metabolism by enzymes of the cytochrome P450 superfamily (CYP450) [2]. Instead, rosuvastatin disposition is regulated on one hand by intestinal and hepatobiliary influx carriers, namely, OATP1B1 (*SLCO1B1*), OATP1B3 (*SLCO1B3*), OATP2B1 (*SLCO2B1*), the sodium taurocholate co-transporting polypeptide (*NTCP*), and OATP1A2 (*SLCO1A2*) [3–10]. On the other hand, rosuvastatin efflux transport is mediated by MRP2 (*ABCC2*) and the breast cancer resistance protein (BCRP; *ABCG2*) [3, 11–14].

Co-administration of rosuvastatin with protease inhibitors was associated with >7-fold increases in rosuvastatin AUC and  $C_{max}$  [15–17]. Furthermore, a 2-fold increase and an even more striking 10-fold increase in  $C_{max}$  of rosuvastatin were observed after administration of the drug with gemfibrozil or cyclosporine, respectively [4, 10]. These drug-drug interactions



## **Annexe 2: Curriculum vitae**

## Jade Huguet

---

### EDUCATION

**2010 – To present**    **Ph.D. Candidate in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy**

**Director: Jacques Turgeon**

Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Faculty of Pharmacy, University of Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**2008 - 2010**            **Master in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy**  
**Fastrack to Ph.D.**    **Director: Jacques Turgeon**

Faculty of Pharmacy, University of Montréal, Montreal, Quebec, Canada

**2004 – 2005**            **D.E.S.S in Drug Development; Clinical Research**  
Faculty of Pharmacy, University of Montréal

**2001 – 2004**            **Bachelor degree in Pharmacology**  
Sherbrooke University, Sherbrooke, Quebec, Canada

---

### PROFESSIONAL EXPERIENCES

• **November 2006 – July 2008, Senior Clinical Research Scientist (SrCRS)**

Algorithme Pharma, Montreal, Quebec, Canada

Supervisor: Marc Lefebvre, Ph.D.

- Team management of three CRS
- Creation of study design for BE/Phase 1/Drug-Drug interactions studies (*publications a and b*)
- Responsible of the supervision of the documents and procedures related to BA/BE studies.
- Responsible of the supervision (QC) and redaction of communications with the agencies (Clarifax)
- Responsible of specific training of the clinical management staff as well as the training of new CRS
- Involved in the R&D of new analytical method with the analytical R&D team (literature work).
- Responsible for the development and approval of study protocols and informed consent forms, DMF
- Monitoring of BA/BE studies.
- Knowledge of all regulatory guidelines of related authorities (TPD, FDA, EMEA, TGA), ICH, GCP and GLP procedures as well as regulatory aspects of BA/BE studies

- **May 2005- November 2006, Clinical Research Scientist (CRS)**  
 Algorithme Pharma, Montreal, Quebec, Canada. Supervisor: Marc Lefebvre, Ph.D.
- **September 2004 – April 2005, part time. Clinical Technician/Trainee as assistant Study Manager**  
 Algorithme Pharma, Montreal, Quebec, Canada. Supervisor: Claude Tremblay, B.Pharm.
- **May 2004 - September 2004. Trainee with Study Manager**  
 Algorithme Pharma, Montreal, Quebec, Canada. Supervisor: Sophie Desjardins
- **April 2003 – September 2003. Trainee in a molecular biology and electrophysiology laboratory**  
 Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada. Director: Céline Fiset, Ph.D.
- **September 2002-April 2003, part time. Data Management Clerk**  
 Algorithme Pharma, Montreal, Quebec, Canada. Supervisor: Claude Tremblay, B.Pharm
- **May 2002 - September 2002. Trainee as a Scientist in Scientific affairs department**  
 Algorithme Pharm, Montreal, Quebec, Canada. Supervisor: Marc Lefebvre, Ph.D.

---

## PUBLICATIONS MANUSCRIPTS

### 1. Published

a) Luis Almeida, Almeida L, Nunes T, Sicard E, Huguet J, Brunet JS, Lefebvre M, Soares-da-Silva P. Pharmacokinetic interaction study between eslicarbazepine acetate and lamotrigine in healthy subjects. *Acta Neurologica Scandinavica* 2010; 121 (4): 257-264.

*Intellectual contribution was recognized by the Bial (Portela e C<sup>a</sup>, S.A.) company.*

b) Luis Almeida, Nunes T, Almeida L, Sicard E, Huguet J, Brunet JS, Lefebvre M, Soares-da-Silva P. Pharmacokinetic interaction study between eslicarbazepine acetate and topiramate in healthy subjects. *Current Medical Research and Opinion* 2010; 26 (6): 1355-1362.

*Intellectual contribution was recognized by the Bial (Portela e C<sup>a</sup>, S.A.) company.*

### 2. Submitted :

c) Huguet J <sup>1,2</sup>, Lu J <sup>1,2</sup>, Gaudette F <sup>1</sup>, Chiasson J.-L. <sup>1,3,4</sup>, Hamet P <sup>1,3,4</sup>, Michaud V <sup>1,2,4</sup>, Turgeon J <sup>1,2,3,4</sup>

*In Vitro* and *In Vivo* drug-drug interactions between pantoprazole and rosuvastatin.

**Submitted: British Journal of Clinical Pharmacology; on going correction**

**3. In preparation :**

d) Jade Huguet<sup>1,2</sup>, Fleur Gaudette<sup>1</sup>, Véronique Michaud<sup>1,2</sup>, Jacques Turgeon<sup>1,2</sup>.  
*A probe drug cocktail for CYP450-mediated drug metabolism in human heart ventricles.*

**Will be submitted in Pharmacology Research & Perspectives journal.**

e) Jade Huguet<sup>1,2</sup>, Fleur Gaudette<sup>1</sup>, François Bélanger<sup>1</sup>, Véronique Michaud<sup>1,2</sup>, Jacques Turgeon<sup>1,2</sup>. *CYP2J2 mRNA expression and activity in human heart ventricles.*

**Will be submitted in Circulation journal.**

---

**AWARDS (SCHOLARSHIPS)**

- **Winter 2014:** Travel Award – CRCHUM. To go to the 2014 ASCPT Annual Meeting, Atlanta. (700\$)
- **2012-2015:** Doctoral Training Award – (Fonds de recherche du Québec - Santé- (20 000\$, 3 years or upon termination of doctoral studies)
- **Winter 2012:** Travel Award – CRCHUM. To go to the 2012 ASCPT Annual Meeting, Maryland. (700\$)
- **2010-2011:** Doctoral's Award- Recruitment Scholarships, Faculty of Pharmacy, University of Montreal - (9000\$)
- **Winter 2011:** Travel Award – CRCHUM. To go to the 2011 ASCPT Annual Meeting, Dallas. (700\$)
- **2010-2011:** CFUW DR. ALICE E. WILSON AWARDS, FCFDU - 2010-2011: Awarded to mature students returning to graduate studies in any field, with special consideration given to those returning to study after at least three years. (9000\$)
- **2009-2010:** Master's Award - Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships, CIHR - (17 500\$)
- **2008-2009:** Master's Award- Recruitment Scholarships, Faculty of Pharmacy, University of Montreal - (6000\$)

Prize:

- **September 2011 :** Student & Trainee Abstract Award Winner, 40<sup>th</sup> American College of Clinical Pharmacology (ACCP), Chicago 2011 (1000\$)

---

**SKILLS/PASTIME/INTEREST**

Skydiving, diving, hiking, traveling, beach volleyball, work working. Humanitarian project (2000): Mission Joven in Dominican Republic.

POSTER/ORAL PRESENTATIONS (2009-2015):

1. T. Nunes, E. Sicard, L. Almeida, J. Huguet, J-S. Brunet, M. Lefebvre, and P. Soares-da-Silva. Pharmacokinetic interaction between eslicarbazepine acetate and topiramate in healthy subjects. *Epilepsia*, 50(Suppl. 4): 2–262, 2009.  
*\*Not presented by myself. Was presented by the company in Berlin. September 2008.*
2. Huguet J, Michaud V, Turgeon J. Biotransformation *in vitro* du substrat marqueur médicamenteux triazolam dans les microsomes de foie et de cœur humain.  
*Poster presentation at the 12<sup>th</sup> annual meeting of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center. December 2009. Montreal, Quebec, Canada.*
3. Huguet J, Michaud V, Turgeon J. *In vitro* biotransformation of triazolam in human heart microsomes. *Clin Pharmacol Ther*, 87(Suppl. 1) : S46 (PII-20), February 2010.  
*Poster presentation at the 111<sup>th</sup> ASCPT. March 2010. Atlanta, Georgia, USA.*
4. Huguet J, Michaud V., Turgeon J. Biotransformation of triazolam in human liver and heart microsomes. *Can J Clin Pharmacol*. Vol 17(1) 2010: e228; May 28, 2010  
*Poster presentation at the CSPT. June 2010. Toronto, Ontario.*
5. Huguet J, Michaud V and Turgeon J. Biotransformation of triazolam in human liver and heart microsomes and human P450 supersomes<sup>TM</sup> 2J2.  
*Poster presentation at the 6<sup>th</sup> ISP symposium. September 2010. Montréal, Québec, Canada.*
6. Huguet J, Gaudette F, Bélanger F, Dallaire S, Iglesias L, Doucet J, Nelson M, Chiasson J-L, Hamet P, Turgeon J. Étude d'interactions médicamenteuses entre la rosuvastatine et le pantoprazole suivant une administration orale chez l'homme en bonne santé.  
*Oral presentation at the 13<sup>th</sup> annual symposium of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center. December 2010. Montreal, Quebec, Canada.*
7. Huguet J, Gaudette F, Bélanger F, Dallaire S, Iglesias L, Doucet J, Nelson M, Chiasson J-L, Hamet P, Turgeon J. A drug-drug interactions study between rosuvastatin and pantoprazole after oral administration in healthy male subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 89(Suppl. 1) : S77 (PIII-31), February 2011.  
*Poster presentation at the ASCPT. March 2011, Dallas, Tx, USA.*

8. Huguet J, Gaudette F, Bélanger F, Dallaire S, Iglesias L, Doucet J, Nelson M, Chiasson J-L, Hamet P, Turgeon J. A drug-drug interactions study between rosuvastatin and pantoprazole after oral administration in healthy male subjects. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. Vol 18(2):e330; May 22, 2011  
*Poster presentation at the CSPT. May 2011, Montréal, Québec, Canada.*
9. Huguet J, Gaudette F, Chiasson J-L, Hamet P, Turgeon J. A drug-drug interactions study between rosuvastatin and pantoprazole after oral administration in healthy male subjects. *J Clin Pharmacol* 2011;51:1330.  
**\* Student & Trainee Abstract Award Winner (1000\$)**  
*Poster presentation at the 40<sup>th</sup> ACCP. September 2011, Chicago, IL, USA.*
10. Huguet J, Gaudette F, Bélanger F, Chiasson JL, Hamet P, Turgeon J. Étude d'interactions médicamenteuses entre la rosuvastatine et le pantoprazole suite à une administration orale chez des volontaires mâles en bonne santé.  
*Poster presentation at the 54<sup>th</sup> annual meeting of the 'Club the Recherche Clinique du Québec'. September 2011, Mont-Gabriel, Québec, Canada.*
11. Huguet J., Michaud V., Gaudette F., Turgeon J. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ FONCTIONNELLE DES CYP450s DANS LE MICROSOMES DE COEURS HUMAINS.  
*Poster presentation at the 13<sup>th</sup> annual symposium of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center. December 2011. Montreal, Quebec, Canada.*
12. Huguet J, Chehade E., Michaud V, Gaudette F, Turgeon J. Functional Activity of human heart microsomes expressing CYP2E1. *Clin Pharmacol Ther* 91: S7-S47: S18 (PI-30), February 2012.  
*Poster presentation at the ASCPT. March 2012, Maryland, USA.*
13. Huguet J, Michaud V, Gaudette F, Turgeon J. CYP450 functional activities in human heart microsomes. *Clin Pharmacol Ther* 91: S7-S47: S19 (PI-31), February 2012.  
*Poster presentation at the 113<sup>th</sup> ASCPT. March 2012, Maryland, USA.*
14. C. Armstrong, J. Huguet, F. Gaudette, F. Belanger, D. Balicki, J Turgeon. *In vitro* metabolism study of ébastine and 7-ethoxyresorufin in breast cancer cell lines. *Clin Pharmacol Ther*, 91(Suppl. 1) : S20 (PII-34), March 2012.  
*Poster presentation at the 113<sup>th</sup> ASCPT. March 2012, Maryland, USA.*  
*\*Not presented by myself.*

15. Huguet J, Gaudette F, Michaud V, Turgeon J. Functional activity of CYP450 2J2, 3A5 and 2E1 in human heart ventricles. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. Vol 19(2):e265; August 1, 2012  
*Poster presentation at the CSPT. June 2012, Toronto, Ontario, Canada.*
  
16. Huguet J., Gaudette F., Michaud V., Turgeon J. Évaluation de l'activité fonctionnelle des CYP450s dans les microsomes de cœurs humains.  
*Oral presentation at the 54<sup>th</sup> annual meeting of the 'Club the Recherche Clinique du Québec'. September 2012, Orford, Québec, Canada.*
  
17. Huguet J., Michaud V., Gaudette F., Turgeon J. DÉVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE 'COCKTAIL' POUR ÉTUDIER L'ACTIVITÉ FONCTIONNELLE DES CYP2C8, 1A1 ET 2D6 DANS LE CŒUR HUMAIN  
*Poster presentation at the 14<sup>th</sup> annual symposium of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center. December 2012. Montreal, Quebec, Canada.*
  
18. Huguet J, Michaud V, Gaudette F, Turgeon J. A probe drug cocktail to study CYP450 2C8, 1A1 and 2D6 in the human heart. *Clin Pharmacol Ther* 93: S1 (PI-46), February 2013.  
*Poster presentation at the 114<sup>th</sup> ASCPT. March 2013, Indianapolis, USA.*
  
19. Huguet J, Gaudette F, Michaud V, Turgeon J. FUNCTIONAL ACTIVITY IN HUMAN HEART EXPRESSING CYP1A1. *FASEB J*. Meeting abstract Supplement, 672.2; April 2013  
*Poster presentation at the 2013 CSPT Program at ASPET Meeting April 2013, Boston. USA*
  
20. Jade Huguet<sup>1,2</sup>, Sandeep Sharma<sup>1,3</sup>, Stéphanie Fulton<sup>1,3</sup>, Fleur Gaudette<sup>1</sup>, Véronique Michaud<sup>1,2</sup> Effets de diètes riches en gras sur l'activité des CYP450s hépatiques et extra-hépatiques chez des souris.  
*Poster presentation at the 55<sup>th</sup> annual meeting of the 'Club the Recherche Clinique du Québec'. September 2013, Québec, Québec, Canada.*
  
21. Huguet J., Godoy R., Sharma S, Gaudette F., Bélanger F., Fulton S., Michaud V. Des organes extra-hépatiques doués d'activité métabolique par les CYP450s  
*Oral presentation at the 55<sup>th</sup> annual meeting of the 'Club the Recherche Clinique du Québec'. Septembre 2013, Québec, Québec, Canada.*

22. Huguet J., Michaud V., Gaudette F., Turgeon J. ÉVALUATION DE DIFFÉRENTS FACTEURS POUVANT CONTRIBUER À LA VARIABILITÉ INTER-INDIVIDUELLE DANS L'ACTIVITÉ DE CYP450s DANS LE CŒUR HUMAIN.  
*Poster presentation at the 15<sup>th</sup> annual symposium of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center. December 2013. Montreal, Quebec, Canada.*
23. Huguet J, Michaud V, Gaudette F, Turgeon J. Intersubject variability of CYP2J2 activity in human heart microsomes. Clin Pharmacol Ther 95: S1 (PI-41), March 2014.  
*Poster presentation at the 115<sup>th</sup> ASCPT. March 2014, Atlanta, USA.*
24. Jade Huguet<sup>1,2</sup>, Sandeep Sharma<sup>1,3</sup>, Fleur Gaudette<sup>1</sup>, François Bélanger<sup>1</sup>, Stéphanie Fulton<sup>1,3</sup>, Jacques Turgeon<sup>1,2</sup>, Véronique Michaud<sup>1,2</sup>. CYP450 mediated metabolism in extra-hepatic tissues. Clin Pharmacol Ther 95: S1 (PI-42), March 2014.  
*Poster presentation at the 115<sup>th</sup> ASCPT. March 2014, Atlanta, USA.*
25. Huguet J<sup>1,2</sup>, Gaudette F.<sup>2</sup>, Bélanger F.<sup>2</sup>, Michaud V.<sup>1,2</sup>, Turgeon J.<sup>1,2</sup> Stereoselective and interindividual differences in methadone metabolism in human heart microsomes. Late-breaking abstract.(LB-20).  
*Poster presentation at the 115<sup>th</sup> ASCPT. March 2014, Atlanta, USA.*
26. Huguet J\*<sup>1,2</sup>, Gaudette F<sup>1</sup>, Bélanger F<sup>1</sup>, Michaud V<sup>1,2</sup>, Turgeon J<sup>1,2</sup>. IMPACT DU POLYMORPHISME CYP2J2\*7 SUR LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS DANS LE COEUR HUMAIN.  
*Poster presentation at the 15<sup>th</sup> annual symposium of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center. December 2014. Montreal, Quebec, Canada.*
27. Huguet J<sup>1,2</sup>, Gaudette F.<sup>2</sup>, Bélanger F.<sup>2</sup>, Michaud V.<sup>1,2</sup>, Turgeon J.<sup>1,2</sup> Impact of CYP2J2\*7 on drug metabolism in the human heart.  
*Poster presentation at the 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting. October 2014. San Francisco, San Francisco, California, USA.*