

Université de Montréal

**Impact de l'âge sur le métabolisme de la kétamine et du midazolam
chez le rat en utilisant des fractions S9 et la spectrométrie de masse**

par Raphaël Santamaria

Département de biomédecine

Faculté de médecine vétérinaire

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires option pharmacologie**

Août 2016

© Raphaël Santamaria, 2016

Résumé

La kétamine est un antagoniste des récepteurs NMDA fréquemment utilisée pour des procédures anesthésiques et moins fréquemment pour traiter la douleur chronique. Des travaux de notre laboratoire ont montré que l'utilisation de la kétamine en combinaison avec la xylazine chez des rats âgés d'environ deux ans pouvait prolonger la durée d'anesthésie. Considérant que les patients gériatriques présentent des caractéristiques physiologiques demandant des adaptations au niveau de la pharmacothérapie, que cette classe de patient requiert fréquemment des anesthésies afin de réaliser des interventions chirurgicales et qu'elle représente la sous-population qui consomme le plus de médicaments pour traiter des problèmes de douleur aiguë et chronique, il convient alors d'investiguer l'impact que l'âge peut avoir sur le métabolisme des médicaments. Le but de ce projet est donc d'évaluer l'impact de l'âge sur le métabolisme de la kétamine à l'aide de fractions cellulaires (*in vitro*) et d'une technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. En premier lieu, nous avons dû confirmer la voie métabolique principale de formation de la norkétamine en utilisant le substrat et l'inhibiteur de référence de la voie métabolique du CYP3A qui sont respectivement le midazolam et le kétoconazole. De plus, nous avons caractérisé l'interaction métabolique de la kétamine fréquemment combinée au midazolam. Ensuite, nous avons comparé les profils de dégradation de la kétamine par des fractions S9 hépatiques de rats âgés de 3, 6, 12 et 18 mois. Les valeurs (\pm ÉT) de V_{\max} obtenues étaient respectivement de 2.39 (\pm 0.23), 2.61 (\pm 0.18), 2.07 (\pm 0.07) pour les plus jeunes comparé à 0.68 (\pm 0.02) pour le groupe de 18 mois ($p < 0.001$). Ces résultats suggèrent donc que le CYP3A est rapidement saturé par la présence de kétamine. De plus, la valeur de K_m a diminué de 6 à 7 fois pour le groupe de 18 mois comparé aux autres groupes ($p < 0.05$). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que l'enzyme subit une modification de sa conformation tridimensionnelle, ce qui résulte en une diminution de formation de norkétamine. Finalement, nous avons tenté d'évaluer la contribution du métabolisme cérébral au métabolisme de la kétamine. Toutefois, nous n'avons pas trouvé de différence significative dans les concentrations de kétamine ou de midazolam entre le début de la réaction et 60 minutes plus tard. Le même constat a été observé pour d'autres substrats du CYP3A et CYP2D (dextrométhorphan et codéine). D'autres expériences sont nécessaires afin d'arriver à des conclusions définitives. Les différences observées entre les différents groupes d'âge suggèrent que la voie métabolique hépatique du CYP3A est détériorée de façon importante. Les protocoles anesthésiques pour patients âgés devraient donc tenir compte de cette importante diminution d'activité métabolique étant donné que l'exposition aux concentrations systémiques risque d'être significativement augmentée.

Mots-clés : kétamine, midazolam, vieillissement, CYP3A, métabolisme des médicaments, interactions médicamenteuses, spectrométrie de masse

Abstract

Ketamine is a NMDAR antagonist widely used for anesthetic procedures and less often to treat chronic pain. Work in our laboratory showed that the use of ketamine combined to xylazine is a poor anesthetic choice for aged rats of approximately 2 years. Considering that geriatric patients present physiological characteristics demanding adaptations of the pharmacotherapy, that this class of patients frequently needs anesthesia to perform surgeries and that they represent the subpopulation that uses many drugs to treat acute and chronic pain, it is relevant to investigate the impact of aging on drug metabolism. The goal of this project was to assess the impact of aging on ketamine metabolism using cellular fractions (*in vitro*) and liquid chromatography tandem mass spectrometry. First, we needed to confirm the main metabolic pathway of norketamine formation using well-established reference substrate and inhibitor of CYP3A metabolic pathway which are respectively midazolam and ketoconazole. Furthermore, we also characterized the metabolic interaction of ketamine frequently combined with midazolam. Second, we compared the degradation profiles of ketamine in liver S9 fractions of rats aged of 3, 6, 12 and 18 months. V_{\max} values (\pm SD) were respectively of 2.39 (\pm 0.23), 2.61 (\pm 0.18), 2.07 (\pm 0.07) for the younger groups compared to 0.68 (\pm 0.02) for the 18 month older group ($p < 0.001$). Those results suggest that CYP3A is quickly saturated by the presence of ketamine. Moreover, K_m value showed a 6 to 7 fold decrease for the oldest group compared to the younger one ($p < 0.05$). Therefore, we hypothesized that the enzyme undergoes conformational changes, which results in a decrease of norketamine formation. Finally, we intend to assess the contribution of brain metabolism to the overall ketamine metabolism. Unfortunately, we did not find any significative difference in ketamine or midazolam concentrations between the beginning of the reaction and 60 minutes later. The same ascertainment has been observed with other substrates of CYP3A and CYP2D (dextromethorphan and codeine). Other experiences are needed to definitely conclude that brain metabolism is negligible. The differences observed between age groups suggest that the hepatic metabolic pathway of CYP3A is severely impaired. Anesthetic protocols for aging patients should take into consideration the diminished metabolic activity since it may lead to a significant increase of exposition to systemic drug concentrations.

Keywords : ketamine, midazolam, aging, CYP3A, drug metabolism, drug-drug interactions, mass spectrometry

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiv
1 - Introduction	1
2 - Recension de littérature	3
2.1 - Anesthésie	3
2.1.1 - Physiologie de la douleur	3
2.1.2 - Pathologie de la douleur	5
Sensibilisation périphérique	6
Sensibilisation centrale	7
2.1.3 - Récepteurs NMDA et GABA	8
NMDA	8
GABA	9
2.1.4 - Kétamine	10
Propriétés physico-chimiques	10
Propriétés pharmacocinétiques	11
Métabolisme	11
Propriétés pharmacologiques	13
Mode d'action	14
2.1.5 - Midazolam	15
Propriétés physico-chimiques	15
Propriétés pharmacocinétiques	15
Métabolisme	17
Propriétés pharmacologiques	18
Mode d'action	18

2.1.6 - Kétoconazole	19
2.1.7 - Polypharmacie	20
Kétamine-midazolam	20
2.2 - Métabolisme	22
2.2.1 - Organes extracteurs	22
Foie	25
Rein	26
Intestin	26
Cerveau	27
2.2.2 - Influence de l'âge et du sexe	27
Âge	27
Sexe	30
2.2.3 - Interactions médicamenteuses	31
2.2.4 - Modèle d'étude in vitro	32
Fraction S9	32
Supersomes	33
Autres	33
2.2.5 - Enzymologie et modèles mathématiques	34
Équations de Michaelis-Menten	35
2.3 - Méthode analytique	39
2.3.1 - Chromatographie en phase liquide de haute performance	39
2.3.2 - Spectrométrie de masse	40
Source d'ionisation	40
Les analyseurs	40
2.3.3 - Technique de dilution isotopique	43
3 - Hypothèses et objectifs	45
4 - Premier volet	46
Abstract	47
Introduction	48
Materials and Methods	49
Results and Discussion	52
Conclusion	56

Acknowledgments	56
References	57
5 - Deuxième volet	71
Abstract	72
Introduction	73
Materials and Methods	74
Results and Discussion	76
Conclusion	78
Acknowledgments	78
References	80
6 - Discussion	86
7 - Conclusion	91
Bibliographie	92
Annexe 1	xv
Annexe 2	xvi
Annexe 3	xvii
Abstract	xix
Introduction	xx
Materials and methods	xxi
Results	xxv
Discussion	xxvii
Conclusion	xxxix
Acknowledgements	xxxix
References	xxxix

Liste des tableaux

Tableau 1 : Définition des différentes sensations de douleur (selon la taxonomie de l'IASP)

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques de la kétamine (selon Grant, Nimmo et al. 1981, Clements, Nimmo et al. 1982, Dayton, Stiller et al. 1983, Hijazi and Boulieu 2002, Craven 2007 et Plumb 2011)

Tableau 3 : Utilisations de la kétamine (selon Eide 2000, Craven 2007, Gupta 2011, Plumb 2011 et Sleigh, Harvey et al. 2014)

Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques du midazolam (selon Fazi, Jantzen et al. 2001, Almenrader, Passariello et al. 2007, Cao, Shi et al. 2009, Dahmani, Brasher et al. 2010, Plumb 2011, Akin, Bayram et al. 2012)

Tableau 5 : Utilisation du midazolam en pratique (selon Kain, Mayes et al. 1997, Lahat, Goldman et al. 2000, Plumb 2011 et Royal Society of Chemistry 2013)

Tableau 6 : Représentation des isoenzymes de CYP450 homologue entre l'humain et 4 espèces animales utilisées en recherche. (selon Martignoni, Groothuis et al. 2006)

Tableau 7 : Modifications selon l'âge et le sexe de la clairance. Comparaison entre mâle et femelle et entre jeune et âgé de l'activité métabolique de chacune des voies métaboliques représentées (selon Schwartz 2003 et Cotreau, von Moltke et al. 2005)

Liste des figures

Figure 1 : Trajet anatomique de l'influx nerveux. L'influx nerveux va être produit par les nocicepteurs à différents endroits sur le corps (en fonction de la localisation de la douleur). Cette nouvelle information sera relayée au travers des nerfs périphériques jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière, où l'influx nerveux peut être modulé. Ensuite il va être transporté jusqu'au cerveau où il y aura interprétation du signal. (selon Bourinet, Altier et al., 2014)

Figure 2 : Fibres nerveuses composant les nerfs périphériques. Les fibres A α et A β constituent les fibres sensibles qui permettent d'apporter des informations sur la proprioception et le toucher. Elles possèdent un gros diamètre et sont myélinisées, ce qui fait qu'elles sont les plus rapides à transmettre l'information. Les fibres A δ apportent de l'information nociceptive à partir de stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques et sont de diamètre moyen et peu myélinisées; elles sont donc moins rapides que les premières. Les fibres C sont responsables de la sensation de prurit ainsi que de la nociception (mécanique, thermique et chimique). Ces dernières sont les plus petites et non myélinisées ce qui fait d'elles les plus lentes des trois catégories. Comme représenté dans les graphiques, leur différente vitesse de conduction conduira au phénomène suivant: le toucher (fibres A α et A β) sera le premier stimulus à être perçu, suivi de la première phase de douleur aiguë et très intense (fibres A δ). Après, cette première phase de douleur, viendra une deuxième phase de douleur, moins intense et plus longue (fibres C). (selon Julius and Basbaum, 2001)

Figure 3 : Récepteur NMDA avec les sites de liaison de ses ligands. Le récepteur NMDA peut être activé par le glutamate, la glycine et le NMDA. Lorsque activé, ce récepteur permettra l'influx de calcium et l'efflux de potassium à l'extérieur du neurone, ce qui causera une dépolarisation du neurone. D'autres ligands peuvent interagir avec le récepteur, dont la phencyclidine, l'ancêtre de la kétamine, qui agira comme antagoniste en bloquant l'ouverture du canal ionique. (selon Golan et al., 2011)

Figure 4 : Récepteur GABA_A avec les sites de liaison de ses ligands. Le récepteur GABA est activé naturellement par le GABA. Lorsque activé, ce récepteur permettra l'influx d'ions chlorures afin d'hyperpolariser le neurone. Il peut aussi être activé par les barbituriques qui se lient ailleurs sur le récepteur. Les benzodiazépines ne sont pas des agonistes comme les barbituriques, mais ils permettent de moduler l'activité du récepteur en prolongeant l'ouverture du canal. L'antagoniste des benzodiazépines (flumazénil) se lie au même site que ceux-ci alors que la picrotoxine (antidote contre intoxication aux agonistes de récepteurs GABA) bloquera le canal en se liant à l'intérieur de celui-ci. D'autres molécules peuvent agir sur le récepteur et leur action est indiquée par le + (agoniste) et le - (antagoniste). (selon Golan et al., 2011)

Figure 5 : Structure chimique de la kétamine (selon Royal Society of Chemistry 2013)

Figure 6 : Voies métaboliques principales de la kétamine (selon Noppers, Olofsen et al. 2011)

Figure 7 : Structure chimique du midazolam (selon Royal Society of Chemistry 2013)

Figure 8 : Voies métaboliques principales du midazolam (selon Seo, Bae et al. 2010)

Figure 9 : Structure chimique du kétoconazole (selon Royal Society of Chemistry 2013)

Figure 10 : Modèle d'organe extracteur. Chaque organe de l'organisme contribue à l'élimination du médicament en extrayant une partie de celui-ci. C'est la sommation des clairances de chacun des organes qui nous indique la clairance total du médicament: $CL_T = CL_h + CL_r + CL_{autres}$. (selon Tozer and Rowland, 2006)

Figure 11 : Description des familles, sous-familles et isoenzymes. Les familles et sous-familles sont basées sur l'homologie de leur séquence d'acides aminés (40% d'homologie à l'intérieur d'une famille et 55% pour une sous-famille). Chaque famille et sous-famille contribuera au métabolisme de façon différente. Le numéro associé à l'isoenzyme permet de différencier les différentes entités à l'intérieur d'une sous-famille. (selon Yan and Caldwell 2001 et Murray, Bender et al. 2010)

Figure 12 : À gauche: Proportion des différentes familles de cytochromes P450. À droite: Contribution au métabolisme des médicaments de chacune des familles de cytochromes P450. (selon Tozer and Rowland, 2006)

Figure 13 : Risque relatif d'hémorragie ou perforation gastro-intestinale en fonction de l'âge suite à l'administration d'AINS. (selon Shi et al., 2008)

Figure 14 : Graphique de K_m/V_{max} tiré des équations de Michaelis-Menten et preuve mathématique de la valeur de K_m .

Figure 15 : Graphique de stabilité métabolique et preuve mathématique du temps de demi-vie.

Figure 16 : Graphique de la concentration d'inhibiteur nécessaire afin d'inhiber 50% de la réaction enzymatique avec représentation de la valeur d' IC_{50} .

Figure 17 : Schéma du fonctionnement d'un système HPLC. (selon Korfmacher 2005)

Figure 18 : Représentation schématique d'une source d'ionisation ESI. (selon Kebarle and Peschke 2000)

Figure 19 : Structure d'un triple quadropôle. (selon Korfmacher 2005)

Figure 20 : Structure d'une trappe ionique 3D. (selon Korfmacher 2005)

Figure 21 : Sur le graphique du haut, on peut voir un chromatogramme montrant l'intensité de signal d'un ion ciblé. Comme l'ion de l'échantillon et son standard ont exactement la même structure, ils vont apparaître au même moment au chromatogramme. Ensuite, en extrayant le spectre de masse, on peut voir deux masses: l'ion cible et son standard interne séparés par 4 unités de masse.

Figure 22 : Graphique de la stabilité métabolique de la kétamine, du midazolam, du dextromethorphan et de la codéine. Entre le temps initial de la réaction et 60 minutes, aucune dégradation significative n'a lieu.

Figure 23 : Concentration de peptides obtenus par digestion tryptique de CYP3A et CYP2D. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les différents groupes d'âge suggérant que l'âge n'influence pas la production de CYP450 et donc renforçant la théorie qu'il s'agirait d'une modification de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme.

Liste des sigles et abréviations

%/an : Pourcentage par année

2D : Bidimensionnel (ou trappe ionique linéaire)

3D : Tridimensionnel

A α : A alpha

A β : A beta

A δ : A delta

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

ALP : Phosphatase alcaline

ALT : Alanine amino transférase

AMPA : Acide aminométhylphosphonique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

AUC : Aire sous la courbe

AUC_{0-inf} : Aire sous la courbe extrapolée à l'infini

AUC_{0-t} : Aire sous la courbe du temps zéro à la dernière concentration mesurée

BUN: Blood urea nitrogen

Ca²⁺ : Ion calcium

C_{in} : Concentration entrant dans l'organe extracteur

C_{out} : Concentration sortant de l'organe extracteur

CL : Clairance

CL_T : Clairance totale

CL_h : Clairance hépatique

CL_r : Clairance rénale

CL_{autres} : Clairances des autres organes

CL/F : Clairance relative

CL_{int} : Clairance intrinsèque

CO₂ : Dioxyde de carbone

CYP2B : Cytochrome P450 2B

CYP2C : Cytochrome P450 2C

CYP2D : Cytochrome P450 2D

CYP3A : Cytochrome P450 3A

CYP450 : Cytochrome P450

DW5 : *Dextrose-water 5%*

E : Coefficient d'extraction ou symbole pour enzyme

[E_{total}] : Concentration d'enzyme totale

ESI : *Electrospray ionization*

GABA : *γ-aminobutyric acid*

g/mol : gramme par mole

H⁺ : Ion hydrogène

HCl : chlorure d'hydrogène

HCN-1 : *Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1*

HPLC : *High performance liquid chromatography*

IC₅₀ : Concentration inhibitrice médiane

IM : Intramusculaire

K⁺ : Potassium ionisé

K_{el} : Constante d'élimination terminale

K_m : Constante de Michaelis-Menten

LADME : Libération, absorption, distribution, métabolisme, excrétion

LRS : Lactate de Ringer

Mg²⁺ : Ion magnésium

mGluR : *Metabotropic glutamate receptor*

MS : *Mass spectrometry*

MS/MS : Expérience de spectrométrie de masse en tandem

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NMDA : N-methyl-D-aspartate

P : Produit

PEPS : Potentiel excitateur post-synaptique

PIPS : Potentiel inhibiteur post-synaptique

pH : Potentiel hydrogène

pK_a : constante de dissociation acide

PK/PD : Pharmacocinétique/pharmacodynamie

Q : débit sanguin

Q1, Q2, Q3 : Les trois quadrupôles formant un triple quadrupôle

S : Substrat

S9 : Fraction S9

T_{1/2} : Temps de demi-vie

TOF : *Time of flight*

UGT : Uridine 5'-diphospho-Glucuronosyltransferase

V_{\max} : Vitesse maximale

Zn^{2+} : Ion zinc

Remerciements

J'ai choisit le programme de doctorat en médecine vétérinaire principalement en raison de mon intérêt envers la science de la médecine et les animaux. Dès ma première année, j'ai entrepris de découvrir le milieu de la recherche vétérinaire et c'est ainsi que j'ai consacré mon premier été au laboratoire du Dr. Francis Beaudry dans le cadre d'une bourse du CRSNG. C'est sans surprise que ce stage a été extrêmement formateur et m'a convaincu d'amorcer un projet de maîtrise. Cette maîtrise n'aurait pu être réalisée sans l'enseignement de notions de science fondamentale par le Dr. Francis Beaudry. En dehors du cadre professeur-élève, nous avons pu discuter et partager des opinions sur divers sujets, ce qui nous a permis de mieux se connaître. Tout ce temps passé au laboratoire a façonné mon esprit scientifique et m'a permis de développer mon potentiel. Toujours disponible, accueillant et d'une grande aide, merci infiniment Francis!

Lors de ce premier été de stage, une étudiante au doctorat était présente au laboratoire : Floriane Pailleux. J'aimerais te remercier pour avoir contribué à ma formation, mais également pour cette relation d'amitié que nous avons conservé depuis.

J'aimerais remercier également tous les collaborateurs de ce projet. Notamment, le Dr. Pascal Vachon qui m'a beaucoup appris sur les animaux de laboratoire et son étudiante Dre Marie-Chantal Giroux. Grâce à eux, nous avons pu obtenir les tissus sur lesquels nous avons bâti notre expérimentation.

Finalement, j'aimerais remercier mes amis et mes proches qui m'ont supporté tout au long de ce projet. Ils m'ont permis de pratiquer mes séminaires afin que je puisse recueillir leurs commentaires et améliorer mes présentations. À mes parents qui m'ont toujours appuyé dans mes décisions scolaires même si je risque de passer encore beaucoup de temps à l'école, merci! À Amélie, qui est présente au quotidien pour me supporter même lors de mes nuits blanches de travail, merci!

1 - Introduction

Depuis l'avènement de la médecine moderne, l'espérance de vie moyenne des humains est continuellement en hausse (United Nations 2007, Shi, Mörrike et al. 2008). Le vieillissement de la population est une problématique actuelle qui prend de plus en plus d'ampleur. Les découvertes importantes en médecine humaine ont eu les mêmes répercussions chez les animaux de façon à ce que les vétérinaires en pratique privée sont fréquemment exposés à des patients de plus en plus âgés (Alexander 2010). De manière générale, on peut dire que tous les spécialistes de la santé humaine et animale sont confrontés à une nouvelle catégorie de patients: la gériatrie (World Health Organization 2016). L'âge peut avoir des impacts considérables sur la physiologie d'un humain ou d'un animal (Sotaniemi, Arranto et al. 1997, Meziere, Paillaud et al. 2013). Cela requiert une certaine adaptation notamment au niveau de la pharmacologie. Les patients gériatriques sont ceux qui consomment le plus de médicaments avec et sans prescription en raison de leur multiples problèmes de santé (Shi, Mörrike et al. 2008). On estime que 20 à 25% des patients gériatriques ont recours à la polypharmacie, c'est-à-dire de prendre plus d'un médicament simultanément. Ils sont donc plus susceptibles aux interactions médicamenteuses (Shi, Mörrike et al. 2008, Klotz 2009). En effet, il est connu que les réactions adverses de toute sorte sont beaucoup plus fréquentes et plus graves chez les patients âgés (Woodhouse and Wynne 1988, Shi, Mörrike et al. 2008, Klotz 2009). Outre l'usage de la polypharmacie, une question persiste: est-ce que l'âge en soi a des conséquences sur les paramètres pharmacocinétiques/pharmacodynamiques ou si ce n'est que le résultat des multiples maladies dont ils peuvent souffrir? Effectivement, la morbidité, voire comorbidité, est très fréquente et pourrait expliquer la raison pour laquelle les mécanismes normaux d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion sont modifiés (Klotz 2009, Meziere, Paillaud et al. 2013). À ce jour, il n'y a pas d'évidence clairement démontrée de l'influence de l'âge sur la pharmacothérapie (Tanaka 1998, Cotreau, von Moltke et al. 2005, Benedetti, Whomsley et al. 2007, Shi, Mörrike et al. 2008, Klotz 2009). On sait par exemple que les proportions des compartiments corporels (le tissu adipeux, les muscles, le tissu conjonctif, les organes, *etc.*) ainsi que leur perfusion sanguine vont changer (O'Malley, Crooks et al. 1971, Woodhouse and Wynne 1988, Tanaka 1998, Klotz 2009). Ces modifications entraînent des conséquences notamment au niveau de la biodisponibilité, mais aussi de la biotransformation et de l'excrétion. Par exemple, une plus grande quantité de tissu adipeux va modifier la distribution du médicament, ce qui va augmenter l'accumulation des substances lipophiles et diminuer leur vitesse d'élimination (Golan, Tashjian et al. 2011). L'organisme sera donc exposé à des concentrations systémiques plus importantes. Toutefois, là où tous ne s'entendent pas, c'est quant à l'évolution de l'activité métabolique, principalement du foie, en fonction de l'âge. Certains auteurs disent que l'âge n'a aucune influence (Benedetti, Whomsley et al. 2007, Klotz 2009) alors que d'autres disent qu'avec l'âge

l'activité métabolique des médicaments diminue (Tanaka 1998, Cotreau, von Moltke et al. 2005, Shi, Mörrike et al. 2008). De plus, il existe également des différences importantes entre mâle et femelle. À titre d'exemple, Woodhouse rapporte que les femmes démontrent plus de réactions adverses aux médicaments que les hommes de même âge (Woodhouse and Wynne 1988). Ces différences inter-sexes peuvent parfois agir comme facteur confondant dans les études de l'influence de l'âge (Cotreau, von Moltke et al. 2005). En effet, en fonction des méthodes de l'étude (division des groupes en fonction du sexe ou non), les conclusions qui vont en être tirées vont varier.

Les modifications du métabolisme dans le temps ajoute une nouvelle dimension au développement de médicaments. En effet, il est important de savoir comment ces médicaments agissent à un âge plus avancé ainsi qu'étudier le devenir des médicaments dans l'organisme en fonction du temps. C'est à ce moment que l'usage de modèles animaux devient intéressant (Phillips, Jarema et al. 2010). Déjà utilisés pour le développement de nouvelles molécules, leur court durée de vie est un attrait afin d'étudier en temps réel le métabolisme en fonction de l'âge (Fox, Anderson et al. 2002). Les données obtenues chez des animaux peuvent être translationnelles, c'est la raison pour laquelle beaucoup de modèles animaux de maladies humaines ont été développés. Justement, plusieurs études sont effectuées sur des animaux âgés dans le but de mieux comprendre divers mécanismes associés à l'âge (Nagahara, Merrill et al. 2009, Phillips, Jarema et al. 2010). Parmi celles-ci, des travaux dans notre laboratoire ont démontré que les profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques suite à l'anesthésie des rats âgés d'environ deux ans en utilisant la kétamine combinée à la xylazine était modifiée de façon importante (Veilleux-Lemieux, Castel et al. 2013). L'exposition aux concentrations systémiques était significativement augmentée chez les rats âgés, ce qui causait une anesthésie et un réveil prolongés. De plus, des concentrations plasmatiques résiduelles étaient présentes jusqu'à 4 jours après. Évidemment, cette problématique amène son lot de conséquences: des résultats altérés, des coûts élevés d'opération, une problématique éthique, *etc.* (Phillips, Jarema et al. 2010). Dans ce contexte, il est pertinent de caractériser les impacts de l'âge sur la pharmacothérapie afin de mieux comprendre et éventuellement adapter l'administration d'agents anesthésiques chez les animaux âgés. Dans le cadre de ce projet, nous allons spécifiquement évaluer le métabolisme de la kétamine chez des rats de 3, 6, 12 et 18 mois et nous pensons observer une diminution de l'activité métabolique reliée à l'âge.

2 - Recension de littérature

2.1 - Anesthésie

Vu l'étendue de leurs problèmes de santé, les patients gériatriques sont parmi ceux qui nécessitent le plus souvent des interventions chirurgicales (chirurgie ophtalmique, orthopédique et digestive principalement) (Meziere, Paillaud et al. 2013). L'approche anesthésique chez ce groupe de patients s'est beaucoup améliorée. Toutefois, ils présentent encore un haut risque anesthésique. En effet, la morbidité post-opératoire augmente de façon linéaire avec l'âge alors que la mortalité post-opératoire augmente de façon exponentielle avec l'âge. Le risque anesthésique relié à l'âge est indépendant du type d'anesthésie et doit être adressé par une approche multidisciplinaire (Meziere, Paillaud et al. 2013).

L'anesthésie est une procédure qui consiste à rendre l'animal ou l'humain immobile, insensible à la douleur et inconscient avec amnésie (American Society of Anesthesiologists 2013). Chacun des agents anesthésiques a un ou plusieurs rôles pour atteindre la profondeur d'anesthésie souhaitée: analgésique, sédatif, anxiolytique, anesthésique, etc. (Golan, Tashjian et al. 2011). L'analgésie en est une partie essentielle, particulièrement chez les patients gériatriques. Bon nombre de ces patients, voire la majorité de ceux-ci, souffrent de douleur chronique de façon à affecter leur qualité de vie au quotidien (Gagliese and Melzack 1997, Katsma and Souza 2000, Muriel, Pérez-Castejón et al. 2007). Chez ces patients, l'évaluation de la douleur, le traitement et la gestion de la douleur dans son ensemble sont complexes et plus risqués en raison de modifications de paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (Gagliese and Melzack 1997, Katsma and Souza 2000). Ainsi, une anesthésie efficace et sécuritaire chez un patient gériatrique passe avant tout par un contrôle serré de la douleur.

2.1.1 - Physiologie de la douleur

Selon l'organisme *International Association for the Study of Pain*, la douleur est définie de la façon suivante : « *[Pain is an] unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage* » (International Association for the Study of Pain 2012). Cette sensation désagréable a comme origine évolutive de protéger celui qui la ressent en lui permettant d'identifier des situations dangereuses ou menaçantes pour son intégrité physique (Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008). Par exemple, poser accidentellement la main sur le rond de poêle en fonction va générer une sensation aversive très forte qui aura comme conséquence que l'individu va retirer sa main et y porter soin par la suite. La première étape de sensation de douleur qui consiste donc à convertir le stimulus douloureux (généralement mécanique, chimique ou thermique) en influx nerveux se nomme transduction (Figure 1) (Fish, Danneman et al. 2011, Bourinet, Altier et al.

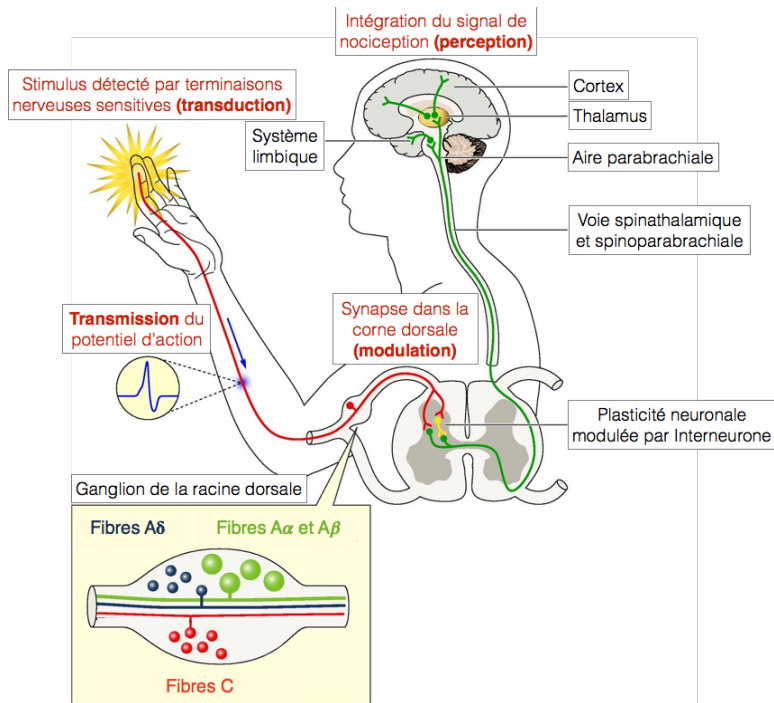


Figure 1 : Trajet anatomique de l’influx nerveux. L’influx nerveux va être produit par les nocicepteurs à différents endroits sur le corps (en fonction de la localisation de la douleur). Cette nouvelle information sera relayée au travers des nerfs périphériques jusqu’à la corne dorsale de la moelle épinière, où l’influx nerveux peut être modulé. Ensuite il va être transporté jusqu’au cerveau où il y aura interprétation du signal. (selon Bourinet, Altier et al., 2014)

2014). L’influx nociceptif est produit par les nocicepteurs qui sont des neurones sensoriels spécialisés dans la détection de douleur (Julius and Basbaum 2001, Fish, Danneman et al. 2011, Bourinet, Altier et al. 2014). Par la suite, ce signal électrique doit être transmis au système nerveux central *via* les nerfs composés de différentes fibres nerveuses (Figure 2), ce qu’on appelle transmission (Figure 1) (Fish, Danneman et al. 2011, Bourinet, Altier et al. 2014). Lorsque le signal atteint la moelle épinière, il y aura synapse dans la corne dorsale avec un interneurone où ce signal pourra être modulé en fonction de l’inhibition descendante et de la sensibilité de l’individu à la douleur (Figure 1) (Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008, Fish, Danneman et al. 2011, Bourinet, Altier et al. 2014). Évidemment, c’est dans le cerveau qu’aura lieu la dernière étape d’interprétation du stimulus que l’on nomme perception (Figure 1) (Lautenbacher and Fillingim 2004). L’information de l’influx nerveux sera relayée du thalamus, où il y aura synapse, jusqu’aux autres centres cérébraux impliqués dans l’intégration du signal (système limbique, cortex somatosensoriel, cortex cingulaire, tronc cérébral et autres) afin de générer une réponse appropriée vis-à-vis le stimulus (Kettner 2008, Fish, Danneman et al. 2011). Par conséquent, les changements comportementaux et physiologiques auront pour but de limiter les dommages actuels et potentiels causés par la menace (Lautenbacher and Fillingim 2004). Il est à noter que les processus nociceptifs et de perception sont indépendants un de l’autre et qu’il n’existe pas

Fibres $A\alpha$ et $A\beta$:
Gros diamètre, myélinisé
Proprioception, toucher

Fibres $A\delta$:
Moyen diamètre, peu myélinisé
Nociception (mécanique, thermique, chimique)

Fibres C:
Petit diamètre, non myélinisé
Prurit, nociception (mécanique, thermique, chimique)

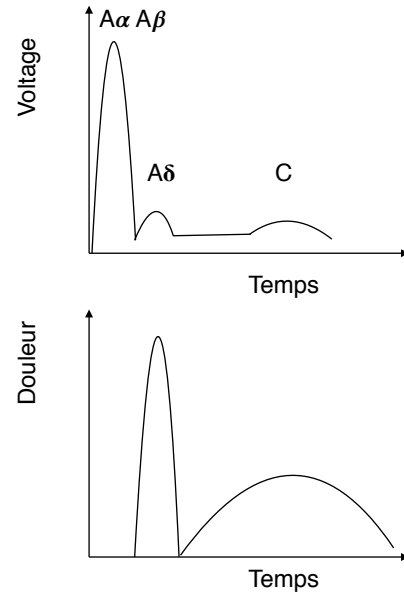


Figure 2 : Fibres nerveuses composant les nerfs périphériques. Les fibres $A\alpha$ et $A\beta$ constituent les fibres sensibles qui permettent d'apporter des informations sur la proprioception et le toucher. Elles possèdent un gros diamètre et sont myélinisées, ce qui fait qu'elles sont les plus rapides à transmettre l'information. Les fibres $A\delta$ apportent de l'information nociceptive à partir de stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques et sont de diamètre moyen et peu myélinisées; elles sont donc moins rapides que les premières. Les fibres C sont responsables de la sensation de prurit ainsi que de la nociception (mécanique, thermique et chimique). Ces dernières sont les plus petites et non myélinisées ce qui fait d'elles les plus lentes des trois catégories. Comme représenté dans les graphiques, leur différente vitesse de conduction conduira au phénomène suivant: le toucher (fibres $A\alpha$ et $A\beta$) sera le premier stimulus à être perçu, suivi de la première phase de douleur aiguë et très intense (fibres $A\delta$). Après, cette première phase de douleur, viendra une deuxième phase de douleur, moins intense et plus longue (fibres C). (selon Julius and Basbaum, 2001)

toujours une corrélation entre leur ampleur (Kettner 2008). C'est-à-dire que, pour un contexte donné, le trauma peut être très extensif et générer très peu de perception de douleur, alors que, dans un autre contexte, beaucoup de douleur ou des sensations de douleurs anormales peuvent être perçues pour un trauma mineur ou inexistant (Tableau 1). Ces deux situations peuvent représenter des dysfonctions majeures diamétralement opposées de la sensation de la douleur: insensibilité à la douleur et douleur chronique (Bourinet, Altier et al. 2014). Dans ce cas, la perception de douleur devient une pathologie à part entière plutôt qu'un symptôme d'une maladie et elle perd alors toute vertu protectrice (Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008, Bourinet, Altier et al. 2014).

2.1.2 - Pathologie de la douleur

Comme l'interprétation des stimuli nociceptifs peut être à la fois inhibée ou amplifiée par le système nerveux central, cela peut mener à un manque de corrélation entre la sévérité de la lésion et la perception

de douleur (Kettner 2008). Deux processus importants contribuent à l'amplification de la douleur : la sensibilisation périphérique et centrale (Julius and Basbaum 2001).

Tableau 1 : Définition des différentes sensations de douleur (selon la taxonomie de l'IASP)

Allodynie	Douleur ressenti par un stimulus normalement non-douloureux.
Analgésie	Absence de douleur.
Causalgie	Syndrome de sensation continue de brûlure, allodynie et hyperpathie suite à une blessure à un nerf.
Douleur neuropathique	Douleur causée par une lésion ou une maladie somatosensorielle du système nerveux central ou périphérique.
Dyesthésie	Sensation désagréable anormale, spontanée ou évoquée.
Hyperalgésie/hypoalgésie	Douleur exagérée/diminuée pour un stimulus normalement douloureux.
Hyperesthésie/hypoesthésie	Sensibilité augmentée/diminuée aux stimulations, excluant les sens spéciaux.
Hyperpathie	Syndrome caractérisé par une sensation anormalement douloureuse suite à un stimulus, surtout si un stimulus répété.
Paresthésie	Sensation anormale spontanée ou évoquée.
Neuralgie	Douleur distribuée le long d'un ou plusieurs nerfs.
Névrite	Inflammation d'un ou plusieurs nerfs.

Sensibilisation périphérique

Lorsqu'un trauma est causé il y aura libération de plusieurs molécules par les cellules lésées : bradykinine, prostaglandine, H^+ , adénosine, sérotonine, noradrénaline, cytokines, *etc.* (Julius and Basbaum 2001, Kettner 2008). Ces molécules vont activer et sensibiliser les nocicepteurs. La sensibilisation des nocicepteurs se traduit par la diminution du seuil de dépolarisation, l'augmentation de la dépolarisation suite à un stimulus nociceptif et la dépolarisation de façon spontanée (Kettner 2008). Ces influx nerveux causeront aussi la libération locale de plusieurs molécules depuis le nocicepteur, notamment la substance P. Les molécules sécrétées par le nocicepteur contribueront à l'inflammation en causant de la vasodilatation et le recrutement de cellules immunitaires (mastocytes et neutrophiles) qui vont à leur tour exacerber l'inflammation. C'est ce que l'on appelle l'inflammation neurogénique (Julius and Basbaum 2001). Normalement, cette boucle de douleur inflammatoire se limite à la phase aiguë et s'estompe par la guérison de la plaie ainsi que l'utilisation d'agents analgésiques (AINS, opioïdes, *etc.*) (Lautenbacher and Fillingim 2004). Toutefois, si les stimuli nociceptifs ne cessent pas (non guérison du trauma ou mauvais traitement de la douleur), la douleur aiguë peut devenir chronique et même persister après la guérison du trauma (Lautenbacher and Fillingim 2004). En effet, la dépolarisation successive des

nocicepteurs atteignant la moelle épinière peut entraîner la sensibilisation centrale par des modifications structurelles et fonctionnelles des voies supérieures engendrant de la douleur chronique (Kettner 2008).

Sensibilisation centrale

Les nocicepteurs préalablement sensibilisés vont former une synapse dans la corne dorsale de la moelle épinière avec le deuxième neurone (Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008). C'est précisément dans la corne dorsale que le premier neurone et le deuxième neurone vont subir la modulation de la part d'un interneurone et des centres supraspinaux (Kettner 2008). En temps normal, les processus d'inhibition et d'amplification de la douleur sont en équilibre de façon à ce que l'individu ait une sensation de douleur proportionnelle au dommage. Toutefois, lorsque les fibres C stimulent continuellement le deuxième neurone, des processus de mémoire de douleur, mieux connu en anglais sous le nom de *wind-up*, vont commencer à s'installer (Eide 2000, Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008). Le *wind-up* se caractérise par l'augmentation de l'activité des neurones de la corne dorsale (Eide 2000). Ce phénomène est médié par les récepteurs NMDA des neurones post-synaptiques de la corne dorsale (Lautenbacher and Fillingim 2004). Il s'agit d'un des mécanismes menant à la sensibilisation centrale. Cette dernière se définit par l'augmentation de l'activité spontanée, l'hyperexcitabilité et l'élargissement des champs neuronaux (Eide 2000). L'augmentation de l'activité spontanée donne lieu à des sensations de douleur alors qu'il y a absence de lésion. L'hyperexcitabilité quant à elle causera une augmentation de l'intensité des sensations de douleur (*wind-up*). Finalement l'élargissement des champs neuronaux a comme conséquence de transmettre un signal nociceptif lors d'un stimulus inoffensif (par exemple toucher, froid, chaleur modérée). Le *wind-up* et la sensibilisation centrale vont tous deux, engendrer les sensations anormales de douleur rencontrées lors de douleur chronique (Eide 2000, Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008).

Comme la douleur chronique peut résulter d'une sensibilisation de l'organisme aux stimuli douloureux, il est possible de la prévenir en utilisant des agents pharmacologiques (Eide 2000, Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008). Ces molécules vont agir sur les différentes étapes de la physiologie de la douleur: transduction, transmission, modulation ou perception. C'est d'autant plus important que les médicaments actuellement utilisés sont beaucoup plus efficaces contre la douleur aiguë que la douleur chronique (Eide 2000, Kettner 2008). Il est donc primordial de tout faire en notre possible pour traiter tout signe de douleur pour des raisons éthiques évidentes, mais aussi afin de prévenir l'apparition de douleur chronique. De plus, il est reconnu que la douleur a de multiples impacts sur les systèmes pulmonaire, cardiovasculaire, endocrinien et sur le système nerveux central. Cela peut avoir des impacts sur les maladies de patients gériatriques, mais également dans des études sur des animaux où de la douleur est engendrée (Fish, Danneman et al. 2011). Ce sont les raisons pour lesquelles l'analgésie est cruciale pour une anesthésie gériatrique réussie.

2.1.3 - Récepteurs NMDA et GABA

Le choix du protocole anesthésique varie en fonction de l'animal, des procédures, de l'espèce animale, de son état de santé et doit s'adapter à la réponse anesthésique de chaque individu (Yamasaki, Kuroe et al. 2003, Hans and Bonhomme 2006). Ainsi, il devient intéressant d'explorer divers types d'anesthésies avec différents agents. Il est possible d'agir sur différentes cibles pharmacologiques pour obtenir différents effets: récepteurs opioïdes (analgésie et sédation), récepteurs NMDA (anesthésie dissociative et analgésie adjuvante), récepteur GABA (dépression du système nerveux central), récepteurs adrénergiques (dépression du système nerveux central et analgésie), canaux sodiques (inhibition de la conduction du signal nociceptif), etc. Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons principalement à deux molécules agissant sur deux de ces récepteurs : l'action de la kétamine sur les récepteurs NMDA et celle du midazolam sur les récepteurs GABA.

NMDA

Le récepteur NMDA (Figure 3) fait partie de la famille de récepteurs ioniques au glutamate (Golan, Tashjian et al. 2011). Le récepteur NMDA se retrouve au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe, du système limbique, du thalamus, du cervelet, du tronc cérébral et de la moelle épinière (Golan, Tashjian et al. 2011, Sleight, Harvey et al. 2014). Il a une fonction excitatrice, c'est-à-dire qu'il produit des potentiels excitatoires post-synaptiques (PEPS). Lors d'ischémie, le récepteur NMDA (AMPA et mGluR également)

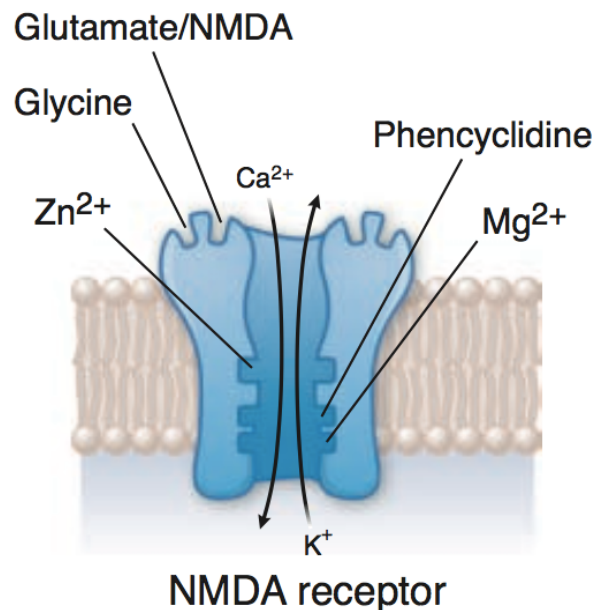


Figure 3 : Récepteur NMDA avec les sites de liaison de ses ligands. Le récepteur NMDA peut être activé par le glutamate, la glycine et le NMDA. Lorsque activé, ce récepteur permettra l'influx de calcium et l'efflux de potassium à l'extérieur du neurone, ce qui causera une dépolarisation du neurone. D'autres ligands peuvent interagir avec le récepteur, dont la phéncyclidine, l'ancêtre de la kétamine, qui agira comme antagoniste en bloquant l'ouverture du canal ionique. (selon Golan et al., 2011)

est en partie responsable de la neurotoxicité qui mène à la mort de neurones (Zhang, Zhang et al. 2006, Golan, Tashjian et al. 2011). En dehors du glutamate, deux autres neurotransmetteurs peuvent activer le récepteur NMDA : le NMDA et la glycine (Golan, Tashjian et al. 2011). Ce récepteur constitue une bonne cible pour une anesthésie équilibrée puisqu'il est impliqué dans des processus de mémoire, hyperalgésie ainsi que de douleur chronique (*wind-up* et sensibilisation centrale) (Eide 2000, Lautenbacher and Fillingim 2004, Kettner 2008, Golan, Tashjian et al. 2011). De cette façon en le ciblant, il est possible d'obtenir une amnésie et un contrôle des phénomènes de douleur menant à la douleur chronique.

GABA

Les récepteurs GABA (Figure 4) constituent une famille de récepteurs : GABA_A, GABA_B et GABA_C. GABA_A et GABA_C font partie de la classe des ionotropiques alors que GABA_B fait partie de la classe des métabotropiques (Golan, Tashjian et al. 2011). Comme le nom l'indique les ionotropiques sont directement reliés à un canal à ions alors que les métabotropiques sont couplés à des protéines G qui activeront des canaux ioniques situés à proximité sur la membrane cellulaire. Ces derniers sont principalement situés dans la moelle épinière alors que les ionotropiques sont situés à une multitude d'endroits dans le système nerveux central (Golan, Tashjian et al. 2011). Actuellement il n'y a qu'une

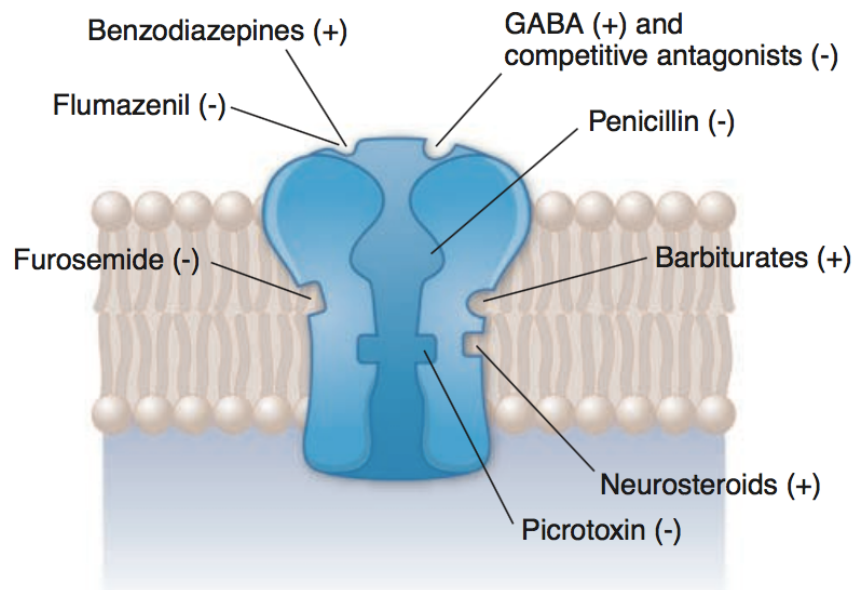


Figure 4 : Récepteur GABA_A avec les sites de liaison de ses ligands. Le récepteur GABA est activé naturellement par le GABA. Lorsque activé, ce récepteur permettra l'influx d'ions chlorures afin d'hyperpolariser le neurone. Il peut aussi être activé par les barbituriques qui se lient ailleurs sur le récepteur. Les benzodiazépines ne sont pas des agonistes comme les barbituriques, mais ils permettent de moduler l'activité du récepteur en prolongeant l'ouverture du canal. L'antagoniste des benzodiazépines (flumazénil) se lie au même site que ceux-ci alors que la picrotoxine (antidote contre intoxication aux agonistes de récepteurs GABA) bloquera le canal en se liant à l'intérieur de celui-ci. D'autres molécules peuvent agir sur le récepteur et leur action est indiquée par le + (agoniste) et le - (antagoniste). (selon Golan et al., 2011)

seule molécule synthétique qui cible le GABA_B alors que tous les autres médicaments ne ciblent que le GABA_A (Golan, Tashjian et al. 2011). Ce sont les principaux récepteurs inhibiteurs du système nerveux central; ils produisent donc des potentiels inhibiteurs post-synaptiques (PIPS). Ils sont impliqués dans les processus de mémoire, tonus musculaire, niveau d'éveil, de sommeil, d'attention et de relaxation (Golan, Tashjian et al. 2011). Ceci explique donc la raison pour laquelle les récepteurs GABA constituent une bonne cible pour l'anesthésie. En déprimant le système nerveux de manière non-spécifique on obtient une anesthésie qui correspond aux critères énoncés plus haut.

2.1.4 - Kétamine

Propriétés physico-chimiques

La kétamine est une molécule ayant à la fois des propriétés analgésiques et anesthésiques (Figure 5). Elle est dérivée de la phéncyclidine et son utilisation a débuté en 1970 (Craven 2007, MacPherson, Woods et al. 2008). Elle est peu coûteuse et très polyvalente (Craven 2007). La kétamine possède une masse molaire de 237.73 g/mol et un pKa de 7.5 (Royal Society of Chemistry 2013). Elle est à la fois soluble dans l'eau et les lipides (Craven 2007). C'est une molécule chirale dont le mélange racémique est habituellement administré lors d'utilisation médicale (White, Schuttler et al. 1985, Craven 2007). Toutefois, comme l'énantiomère S a une affinité au récepteur NMDA quatre fois supérieure à son isomère R, de plus en plus de formulation isolée de l'énantiomère S font leur apparition sur le marché (Craven 2007). Il est possible de donner de plus petites doses afin d'obtenir le même effet thérapeutique, alors qu'à concentration égale l'incidence d'effets aderses est la même pour les deux énantiomères (Craven 2007).

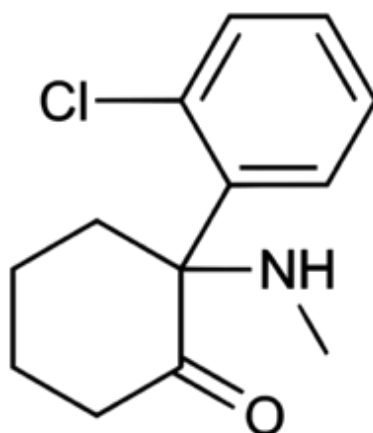


Figure 5 : Structure chimique de la kétamine (selon Royal Society of Chemistry 2013)

Propriétés pharmacocinétiques

La kétamine peut être administrée par une multitude de voies : intraveineuse, intramusculaire, orale, rectale, sous-cutanée, épidurale, transnasale et sous linguale (Tableau 2) (Craven 2007, Plumb 2011). Elle agit à l'intérieur de 10 minutes après l'injection intramusculaire (Plumb 2011). Toutefois, chez les rats, la voie intramusculaire est contre-indiquée. Comme cette espèce requiert des doses plus importantes de kétamine (50 à 100 mg/kg), le volume injecté est beaucoup plus grand et des myosites ou réactions cutanées ont été rapportées (Flecknell 2015). La biodisponibilité est de 93% et de 16% respectivement pour la voie intramusculaire et orale ou rectale (Grant, Nimmo et al. 1981, Clements, Nimmo et al. 1982, Hijazi and Boulieu 2002, Craven 2007). Elle se distribue rapidement à travers tous les tissus et son pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques est de l'ordre de 40 à 60% (Dayton, Stiller et al. 1983, Hijazi and Boulieu 2002, Plumb 2011). Elle subit une biotransformation au foie majoritairement en norkétamine (Hijazi and Boulieu 2002, Craven 2007). Suite à la biotransformation, le métabolite va être éliminé majoritairement par voie urinaire avec une demi-vie de deux à trois heures chez les humains, une heure chez les chats, les veaux et les chevaux et 36 minutes chez le rat (Lo and Cumming 1975, Craven 2007, Plumb 2011). Chez le rat, la durée d'action de la kétamine est réduite comparativement aux autres espèces. Lorsque combinée à un agoniste alpha-2 ou un benzodiazépine, elle offre 20 à 30 minutes d'anesthésie (Flecknell 2015). Il est à noter que chez le chat, la kétamine est excrétée exclusivement dans l'urine pratiquement sans biotransformation en raison d'une activité métabolique hépatique très réduite (Gupta 2011, Plumb 2011).

Tableau 2 : Paramètres pharmacocinétiques de la kétamine (selon Grant, Nimmo et al. 1981, Clements, Nimmo et al. 1982, Dayton, Stiller et al. 1983, Hijazi and Boulieu 2002, Craven 2007 et Plumb 2011)

Voie d'administration	Orale, intraveineuse, intramusculaire, intrapéritonéal, rectale, sous-cutanée, épidurale, transnasale, sous-linguale
Biodisponibilité	IM : 93% ; Orale ou rectale : 16%
Liaison aux protéines plasmatiques	40 - 60%
Temps de demi-vie	Humains : 2 - 3 h ; Chevaux, veaux et chats : 1 h ; Rats : 36 min
Métabolisme hépatique	CYP3A → norkétamine (autres voies métaboliques mineures produisant d'autres métabolites)

Métabolisme

Le métabolite principal résultant de la dégradation de la kétamine est la norkétamine, suite à une N-déméthylation (Figure 6) (Livingston and Waterman 1978, Noppers, Olofsen et al. 2011). Par la suite, la norkétamine sera oxydé et/ou conjugué à un glucuronide avant d'être éliminé en très grande partie par le

rein (Livingston and Waterman 1978, Gupta 2011, Noppers, Olofsen et al. 2011). Trois voies métaboliques principales ont été identifiées pour la formation de la norkétamine: CYP2B, CYP2C et CYP3A (Yanagihara, Kariya et al. 2001, Hijazi and Boulieu 2002). Toutefois, une controverse persiste encore sur la voie métabolique principale de dégradation de la kétamine (Yanagihara, Kariya et al. 2001, Hijazi and Boulieu 2002). Selon Yanagihara en 2001, le CYP2B est une enzyme a haute affinité pour la kétamine alors que le CYP2C et CYP3A sont à basse affinité (Yanagihara, Kariya et al. 2001). Cela a comme conséquence que le CYP2B induit une clairance intrinsèque de 7 à 13 fois plus élevée que les autres enzymes (Yanagihara, Kariya et al. 2001). Toutefois, Hijazi en 2002 argumente que l'abondance relative du CYP3A est beaucoup plus importante (25% du total des CYP450 contre 1% pour le CYP2B) et devrait ainsi surpasser les deux autres enzymes malgré sa faible affinité pour le substrat (Hijazi and Boulieu 2002). En extrapolant les données de contribution relative en fonction de l'abondance relative de chacune des isoenzymes, il indique que l'on s'attend à ce que la voie métabolique majeure de formation du norkétamine soit le CYP3A (Hijazi and Boulieu 2002). L'importance du CYP3A a été confirmée par des inhibiteurs spécifiques d'isoenzymes et on remarque que celui qui obtient une plus grande inhibition de formation de norkétamine c'est le kétoconazole, inhibiteur de référence du CYP3A (Hijazi and Boulieu 2002, Food and Drug Administration 2014). La différence s'explique par le fait que Yanagihara aurait utilisé des concentrations plus faibles de kétamine que ce que l'on rencontre en réalité et cela aurait favorisé les isoenzymes ayant plus d'affinité pour la kétamine au détriment du CYP3A (Hijazi and Boulieu 2002). Cependant, il faut rester prudent avec les extrapolations comme celles de Hijazi et c'est la raison pour laquelle il serait approprié de confirmer hors de tout doute la voie métabolique principale

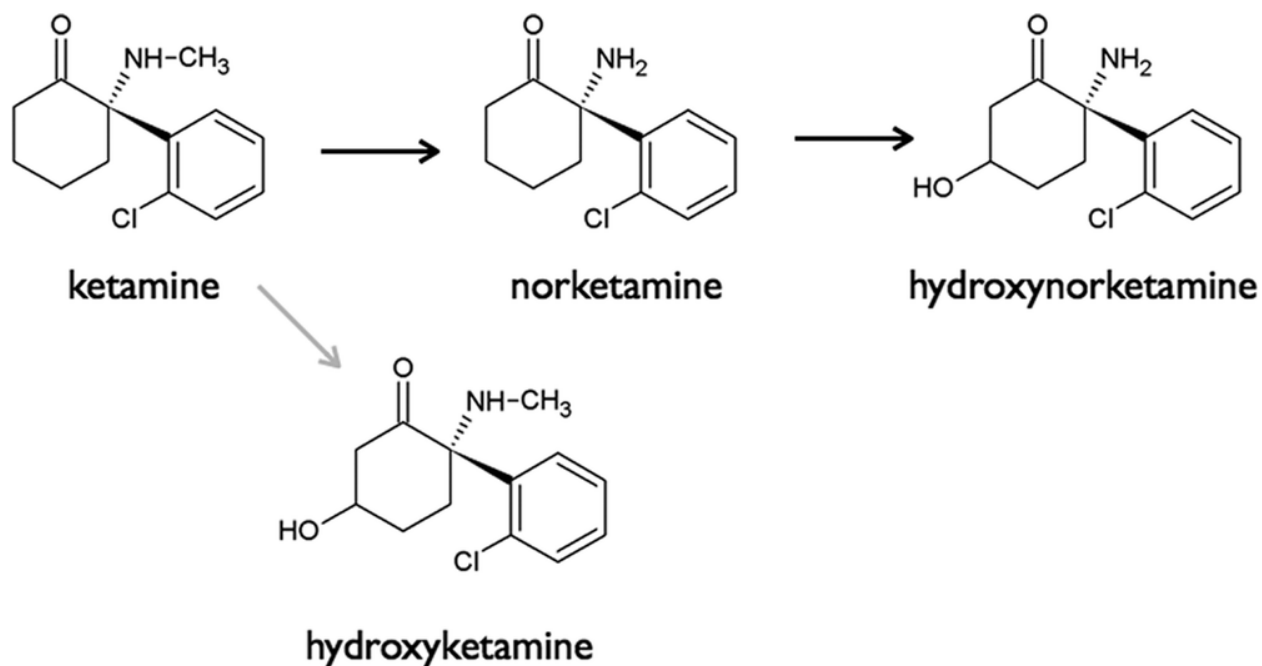


Figure 6 : Voies métaboliques principales du foie de la kétamine (selon Noppers, Olofsen et al. 2011)

formant la norkétamine. Il est également rapporté que la kétamine peut également être un inducteur enzymatique, ce qui peut engendrer de la tolérance pendant trois jours après la dernière administration de kétamine (Livingston and Waterman 1978, Plumb 2011).

Propriétés pharmacologiques

La kétamine est un agent anesthésique ayant trois effets principaux: hypnose avec effets psychogéniques, analgésie, stimulation sympathique (Sleigh, Harvey et al. 2014). Plutôt que d'agir en déprimant tout le système nerveux central, elle provoque un état dit dissociatif. C'est-à-dire que le patient n'est pas complètement endormi, mais il se retrouve tout de même en état d'analgésie et d'amnésie de par son action sur certaines régions spécifiques du cerveau (inhibe le cortex et thalamus et stimule le système limbique et système adrénergique) (Craven 2007, Golan, Tashjian et al. 2011, Gupta 2011, Sleigh, Harvey et al. 2014). Ceci explique pourquoi plusieurs réflexes sont conservés lors de son utilisation (Gupta 2011). De cette façon, il est possible de procéder à une intervention chirurgicale sans même devoir intuber le patient (Pellier, Monrigal et al. 1999). Cependant, la kétamine peut parfois ne pas procurer une sédation assez profonde (Pellier, Monrigal et al. 1999). Elle est donc préférablement utilisée pour de courtes interventions, peu invasives. Chez le rat, la kétamine est pratiquement toujours combinée à un agoniste alpha-2 ou un benzodiazépine sinon il y a de la rigidité musculaire et la profondeur d'anesthésie peut être insuffisante (Flecknell 2015). La kétamine peut avoir des effets déprimeurs sur le système respiratoire à fortes doses. C'est notamment le cas chez les rats où elle provoque une dépression respiratoire marquée en raison des fortes doses utilisées pour obtenir une profondeur anesthésique adéquate chez cette espèce (Flecknell 2015). Administrée seule, elle augmentera la fréquence cardiaque, le débit cardiaque, la pression sanguine artérielle et veineuse. Si administrée en combinaison avec un agent anesthésique cardio-déprimeur ses effets seront alors cardio-déprimeurs aussi (Grint and Murison 2008). Malgré cela, elle reste un agent anesthésique très sécuritaire (Gupta 2011, Plumb 2011). Le peu de conséquences qu'elle induit sur la fréquence cardiaque et respiratoire constitue son principal avantage en anesthésie (Marlow, Reich et al. 1991, Young, Jevtovic-Todorovic et al. 2005). Son métabolite principal formé par la dégradation hépatique, la norkétamine, a aussi des propriétés pharmacologiques, estimées à 10-30% de l'effet du parent (Pellier, Monrigal et al. 1999, Plumb 2011). En revanche, la kétamine est aussi responsable du phénomène d'émergence, ce qui constitue le principal effet secondaire (5 à 30% chez les humains) (Pellier, Monrigal et al. 1999, Wathen, Roback et al. 2000, Craven 2007). Ce phénomène consiste en un ensemble d'effets adverses : agitation, euphorie, dysphorie, hallucinations, *etc.* (Wathen, Roback et al. 2000). Chez les animaux, la dysphorie et l'agitation au réveil sont plutôt signalées, puisque l'animal ne peut pas verbaliser son expérience (Plumb 2011). Afin de limiter le phénomène d'émergence, il est conseillé de procéder au réveil dans un espace calme avec le minimum de stimulation possible (Craven 2007). La kétamine a longtemps été contre-indiquée, et l'est encore, pour des traumatismes crâniens parce qu'elle augmenterait la pression intra-crânienne, ce qui aurait des effets délétères chez un tel patient

(Craven 2007, Green, Andolfatto et al. 2015, Loflin and Koyfman 2015). Toutefois, certaines données semblent nourrir la controverse en démontrant que combinée au midazolam, elle serait un meilleur choix que l'administration combinée de fentanyl et de midazolam (Kolenda, Gremmelt et al. 1996). En effet, l'augmentation de la pression intra-crânienne est beaucoup plus dépendante de la pression partielle de CO₂ que de l'augmentation de débit cardiaque causée par la kétamine (Takeshita, Okuda et al. 1972). Elle pourrait même avoir un effet bénéfique en augmentant la perfusion cérébrale (Craven 2007). De surcroît, plusieurs méta-analyses démontrent que la kétamine n'augmente pas plus la pression intra-crânienne que les opioïdes déjà utilisés en cas de traumatismes crâniens (Wang, Ding et al. 2014, Loflin and Koyfman 2015). Certains laboratoires rapportent même que la kétamine aurait une fonction de neuroprotection suite à l'ischémie en bloquant certains processus de mortalité neuronale qui seraient déclenchés par les récepteurs NMDA (Zhang, Zhang et al. 2006, Craven 2007). Finalement, la kétamine se distingue aussi comme un des rares agents anesthésiques agissant sur les récepteurs NMDA (Gupta 2011). De cette façon, elle peut aider à prévenir la douleur chronique en bloquant en partie les phénomènes de *wind-up* et de sensibilisation centrale dans la moelle épinière (Eide 2000). Parmi les douleurs chroniques qu'elle peut traiter on retrouve le syndrome de douleur régionale complexe, la douleur du membre fantôme et la douleur neuropathique centrale et périphérique (Craven 2007).

Mode d'action

La kétamine est connue comme un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA, mais elle a aussi des effets sur d'autres récepteurs (Zhang, Zhang et al. 2006, Sleigh, Harvey et al. 2014). La kétamine agit entre autres sur les récepteurs opioïdes mu et delta, les récepteurs AMPA, les récepteurs cholinergiques et adrénergiques et bien d'autres (Plumb 2011, Sleigh, Harvey et al. 2014). Il n'est pas encore clairement démontré comment la kétamine cause la perte de conscience, mais cela ne semblerait pas être par son action sur les récepteurs NMDA (Sleigh, Harvey et al. 2014). Plusieurs études ont été dans l'incapacité de démontrer le lien de causalité entre l'hypnose et l'action de la kétamine sur les récepteurs NMDA (Petrenko, Yamakura et al. 2004, Petrenko, Yamakura et al. 2013). En fait, il semblerait que le récepteur HCN-1 serait le principal responsable de l'hypnose (Chen, Shu et al. 2009, Zhou, Douglas et al. 2013). Néanmoins, comme les récepteurs NMDA sont impliqués dans les processus de douleur chronique, la kétamine possède un important avantage en permettant d'agir contre le *wind-up* et diminuer ainsi l'allodynie, l'hyperalgésie et la douleur d'origine neuropathique (Tableau 3) (Sleigh, Harvey et al. 2014). L'utilisation de kétamine en chirurgie permet de diminuer le risque de douleur chronique pour les 30 à 180 jours post-opératoires (Remérand, Le Tendre et al. 2009). Son temps d'action dépasse nettement le temps requis pour l'éliminer en raison de son action sur l'expression de gènes impliqués dans les processus menant à la douleur chronique (Sleigh, Harvey et al. 2014). Lors de prise chronique d'opioïdes, elle permet de diminuer les doses tout en réduisant la tolérance (Sleigh, Harvey et al. 2014). De plus, la kétamine offre également une analgésie par une action directe sur les récepteurs opioïdes delta, la

potentialisation des récepteurs mu et en inhibant la formation d'oxyde nitrique (Gupta 2011, Sleigh, Harvey et al. 2014). Finalement, elle possède aussi des propriétés antidépressives beaucoup plus rapide que les molécules conventionnelles : un délai d'action de deux heures et une durée d'action d'une semaine (Tableau 3) (Duman, Li et al. 2012, Sleigh, Harvey et al. 2014). À faible dose, elle augmente la relâche de glutamate et l'expression des récepteurs AMPA dans le cortex préfrontal, ce qui va enchaîner une série de cascade moléculaire ayant comme résultat des changements structurels et fonctionnels améliorant l'humeur des patients (Duman, Li et al. 2012).

Tableau 3 : Utilisations de la kétamine (selon Eide 2000, Craven 2007, Gupta 2011, Plumb 2011 et Sleigh, Harvey et al. 2014)

Anesthésie	Contre-indiqué chez patients avec insuffisance rénale ou hépatique, problèmes cardiaques, à risque de crise épileptiforme, trauma crânien ou glaucome. Appliquer gel sur les yeux question d'éviter ulcères cornéens.	
Contention chimique	Approuvée chez le chat, mais utilisée à cette fin chez d'autres espèces également.	
Analgésie	Douleur aiguë	Analgésique à faible dose. Épidurale plus efficace que bloc local ou régional, temps d'action plus long et analgésie plus profonde.
	Douleur chronique	Prévient <i>wind-up</i> et sensibilisation centrale
Antidépresseur	Agit en quelques heures et dure une semaine (étudié chez l'humain)	

2.1.5 - Midazolam

Propriétés physico-chimiques

Le midazolam (Figure 7) est un puissant sédatif de courte durée de la classe des benzodiazépines (Plumb 2011). Il possède une masse molaire de 325.77 g/mol (Royal Society of Chemistry 2013). Le midazolam est généralement utilisé en prémédication avant une anesthésie générale (Dundee, Halliday et al. 1984, Almenrader, Passariello et al. 2007, Plumb 2011). C'est une molécule soluble dans l'eau et soluble dans les lipides à pH sanguin qui se mélange facilement et de façon sécuritaire avec plusieurs autres médicaments tels que la kétamine, le fentanyl, la morphine, les fluides (D5W, saline, LRS), *etc.* (Plumb 2011). Le midazolam est généralement retrouvé sous la forme midazolam-HCl pour qu'il conserve une stabilité optimale à un pH acide et parce qu'il est plus soluble dans un milieu aqueux (Plumb 2011, Royal Society of Chemistry 2013).

Propriétés pharmacocinétiques

Le midazolam peut être administré de diverses façons : intramusculaire, intranasal, intraveineux, oral, rectal, *etc.* (Tableau 4) (Lahat, Goldman et al. 2000). La voie rectale en pratique offre une biodisponibilité tellement basse qu'elle est peu utilisée sauf pour le traitement de crises épileptiformes (Lahat, Goldman et

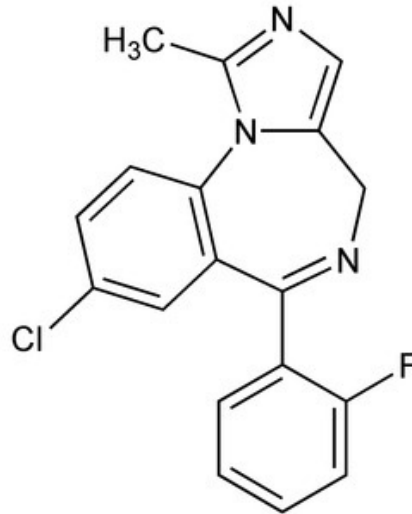


Figure 7 : Structure chimique du midazolam (selon Royal Society of Chemistry 2013)

al. 2000, Plumb 2011). Chez l'humain adulte et enfant, lors de prémédication, il est plus fréquent de l'administrer par voie orale et ce malgré le fait que certains paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques lors d'administration orale ne soient pas particulièrement bien définis (Dahmani, Brasher et al. 2010, Akin, Bayram et al. 2012). En dépit d'une bonne absorption orale, le premier passage hépatique fait diminuer les concentrations plasmatiques de sorte que la biodisponibilité varie entre 31 et 72% (Plumb 2011). Chez le rat, on parle d'une biodisponibilité orale autour de 45% (Mandema, Tukker et al. 1991). Le midazolam est fortement lié aux protéines plasmatiques (94-97%) de sorte qu'une hypoalbuminémie peut grandement affecter la pharmacodynamie de cette substance (Dundee, Halliday et al. 1984, Plumb 2011). Le temps de demi-vie chez un humain est de 2 heures alors qu'elle est de 77 minutes chez un chien et 27 minutes chez le rat (Mandema, Tukker et al. 1991, Plumb 2011).

Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques du midazolam (selon Fazi, Jantzen et al. 2001, Almenrader, Passariello et al. 2007, Cao, Shi et al. 2009, Dahmani, Brasher et al. 2010, Plumb 2011, Akin, Bayram et al. 2012)

Voie d'administration	Orale, intraveineuse, intramusculaire, rectale, intranasal et autres
Biodisponibilité	IM : 91 % ; Orale ou rectale : 31 à 72 %
Liaison aux protéines	94 - 97 %
Temps de demi-vie	Humains : 2 h ; Chiens : 77 min ; Rats : 27 min
Métabolisme hépatique	CYP3A → α -hydroxymidazolam (autres voies métaboliques mineures produisant d'autres métabolites)

Métabolisme

Le midazolam est hydroxylé par le CYP3A (Figure 8) (Kanazawa, Okada et al. 2004). Le 1-hydroxymidazolam (ou α -hydroxymidazolam), le 4-hydroxymidazolam et le 1-4-hydroxymidazolam constituent les principaux métabolites du midazolam (Oda, Mizutani et al. 1999, Johnson, Rostami-Hodjegan et al. 2002, Seo, Bae et al. 2010). Le premier des trois métabolites est encore actif et probablement même aussi actif que son parent (Ziegler, Schalch et al. 1983, Mandema, Tuk et al. 1992). Il contribue de façon non-négligeable à l'effet du midazolam lors d'administration par voie orale

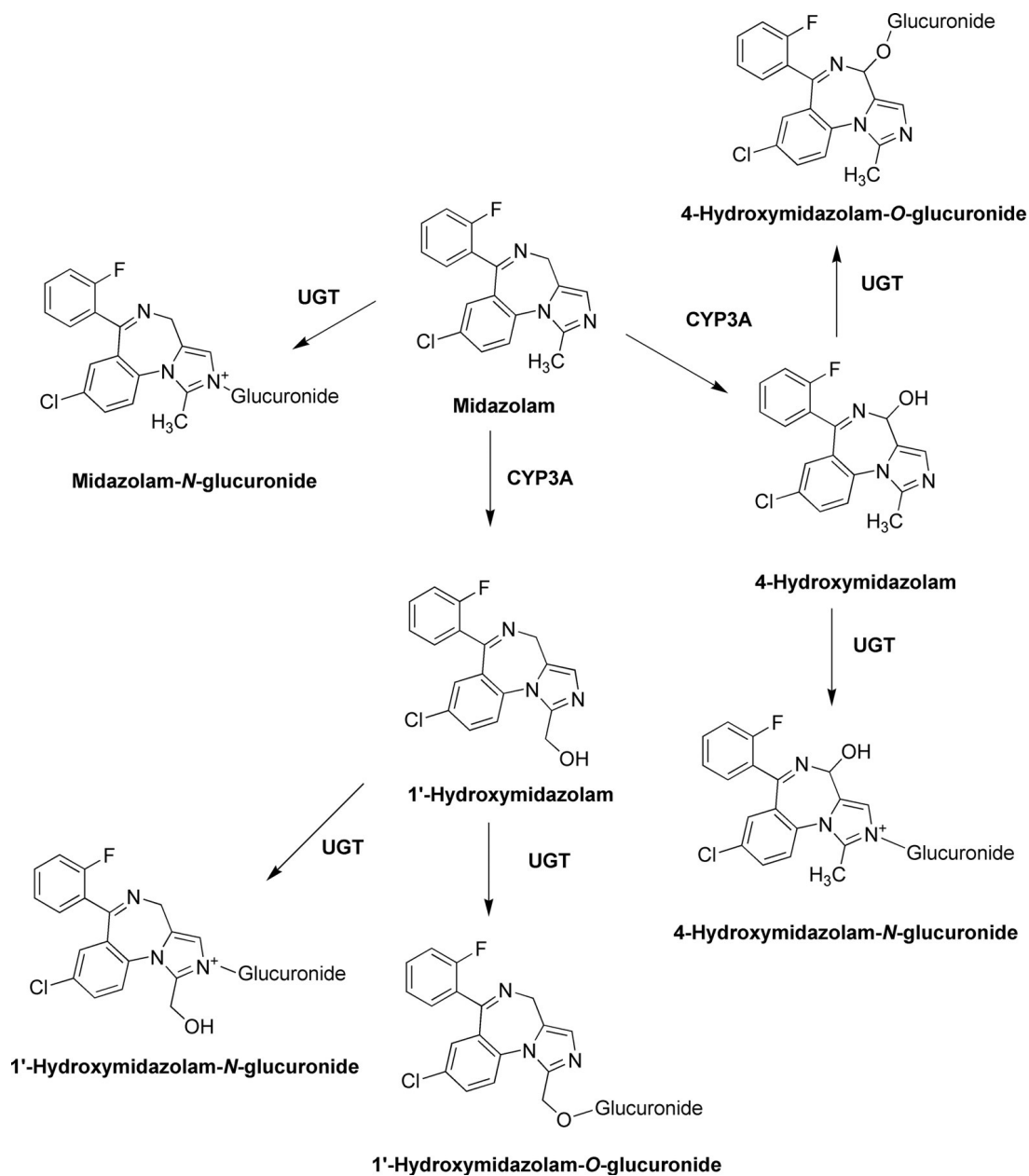


Figure 8 : Voies métaboliques principales du midazolam. UGT est une enzyme participant au processus de glucurono-conjugaison. CYP3A est le cytochrome P450 3A. (selon Seo, Bae et al. 2010)

(Mandema, Tuk et al. 1992). Le midazolam est également le substrat de référence pour l'activité métabolique du CYP3A en expérience *in vitro* et *in vivo* (Cotreau, von Moltke et al. 2005, Halama, Hohmann et al. 2013, Mooiman, Maas-Bakker et al. 2013, Food and Drug Administration 2014). Étant presque exclusivement métabolisé par la voie métabolique du CYP3A et facilement disponible, il constitue une excellente sonde pour l'évaluation hépatique de cette voie métabolique (Kanazawa, Okada et al. 2004, Cotreau, von Moltke et al. 2005). Dans le contexte de nos travaux, il nous servira de substrat de référence afin d'étudier la contribution de la voie métabolique du CYP3A sur le métabolisme de la kétamine ainsi qu'évaluer le potentiel inhibiteur lors de co-administration avec la kétamine.

Propriétés pharmacologiques

Le midazolam est principalement un anxiolytique qui sert à la sédation (Almenrader, Passariello et al. 2007). Il est souvent utilisé en premier lieu pour initier l'amnésie et la perte de conscience (Kain, Mayes et al. 1997, Kain, Hofstadter et al. 2000, Karapinar, Yilmaz et al. 2006). Il est également utilisé pour ses effets de relaxant musculaire et d'anticonvulsivant (Plumb 2011). Due à sa solubilité aqueuse et lipidienne à pH sanguin, le midazolam se distribue rapidement et possède un délai et une durée d'action courts (Dundee, Halliday et al. 1984, Plumb 2011). En effet, chez les enfants seulement 10 minutes suffisent pour atteindre l'effet voulu lors d'administration orale (Kain, Hofstadter et al. 2000). De plus, comparativement à d'autres agents, les benzodiazépines, incluant le midazolam, ont relativement peu d'effets cardiovasculaires (Dundee, Halliday et al. 1984, Plumb 2011). Cette caractéristique est particulièrement appréciée lors de procédures anesthésiques de patients gériatriques (Dundee, Halliday et al. 1984). Chez le rat, le midazolam offre une sédation légère, donc, la plupart du temps, il est utilisé pour potentialiser les effets d'un opioïde ou de la kétamine (Mandema, Tukker et al. 1991).

Mode d'action

Le midazolam, en se liant à un site allostérique du GABA_A, favorise l'interaction entre le GABA et son récepteur, mais n'active pas directement le récepteur (Macdonald and Olsen 1994, Golan, Tashjian et al. 2011). À basse concentration la fréquence d'ouverture du canal est augmentée, alors qu'à concentration égale avec le GABA, la fermeture du canal est retardée (Macdonald and Olsen 1994, Golan, Tashjian et al. 2011). Comme le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur le plus important, le midazolam favorisera une hyperpolarisation importante des neurones et causera une dépression du système nerveux central (Golan, Tashjian et al. 2011). Les neurones inhibés du système limbique se traduiront par des effets anxiolytiques, l'augmentation de l'activité des interneurons dans la moelle épinière se traduira par une myorelaxation et l'inhibition dans l'hippocampe se traduira par une amnésie (Tableau 5) (Evans and Viola-McCabe 1996, Golan, Tashjian et al. 2011). Les benzodiazépines ont une puissance plus élevée que les barbituriques, mais une efficacité faible et, contrairement aux barbituriques, ils ne peuvent activer le canal GABA_A (Golan, Tashjian et al. 2011). Les benzodiazépines peuvent être antagonisés par le

flumazenil, ce qui constitue un autre avantage étant donné la possibilité de renverser la sédation (Golan, Tashjian et al. 2011).

Tableau 5 : Utilisation du midazolam (selon Kain, Mayes et al. 1997, Lahat, Goldman et al. 2000, Plumb 2011 et Royal Society of Chemistry 2013)

Anesthésie	Prémédication	Substance la plus utilisée en prémédication chez les humains aux États-Unis. Anxiolytique, sédatif, attention excitation paradoxale possible.
	Induction	Chez patients âgés et à risque de dépression cardiorespiratoire.
	Ne peut être utilisé seul, doit être combiné avec la kétamine, opioïdes, alpha2-agonistes ou autres. Contre-indiqué chez patients souffrant d'insuffisance rénale et hépatique et d'hypoalbuminémie.	
Anticonvulsivant	Administration <i>via</i> voie rectale ou intranasale	

2.1.6 - Kétoconazole

Le kétoconazole (Figure 9) est un antifongique faisant partie de la classe des imidazoles (Plumb 2011). Il possède une masse molaire de 531.43 g/mol et est peu soluble dans l'eau (Royal Society of Chemistry 2013). Il est de moins en moins utilisé puisque des agents antifongiques plus récents qui sont moins toxiques et plus efficaces ont fait leur apparition depuis (fluconazole et itraconazole). Toutefois, cela reste le traitement de choix dans le traitement de l'histoplasmosis et il reste plus abordable que les nouveaux antifongiques. Il a été utilisé dans le cadre de ce projet comme inhibiteur de référence de la voie métabolique du CYP3A afin de répondre à nos objectifs (Food and Drug Administration 2014). En effet, il a une capacité importante à inhiber le métabolisme des médicaments passant par la voie métabolique du CYP3A. Pour cette même raison, il peut être utilisé pour réduire le dosage d'autres médicaments

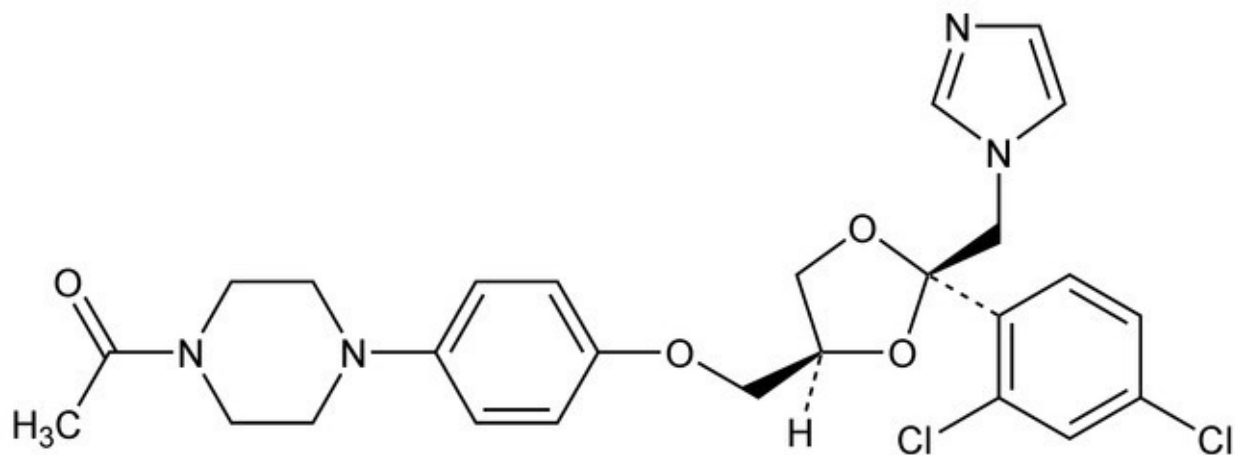


Figure 9 : Structure chimique du kétoconazole (selon Royal Society of Chemistry 2013)

administrés en même temps qui sont plus dispendieux, comme la cyclosporine. Il constitue aussi une option au mitotane dans le traitement de l'hyperadrénocorticisme (Plumb 2011).

2.1.7 - Polypharmacie

La polypharmacie est un concept très intéressant qui consiste à administrer plusieurs médicaments conjointement afin de traiter le patient plus efficacement et de façon sécuritaire (Tozer and Rowland 2006). En agissant sur différentes cibles thérapeutiques simultanément, il est possible d'aller chercher l'effets de divers récepteurs, ce qui, dans le cas d'anesthésie, permet d'obtenir une anesthésie plus complète avec des doses inférieures et ainsi potentiellement éviter des signes de toxicité (Tozer and Rowland 2006). Ce concept est appliqué dans tous les domaines de la pharmacologie. Or, dans le contexte qui nous intéresse (l'anesthésie gériatrique), cela peut être tout particulièrement intéressant puisque l'on sait que ces patients sont plus susceptibles à des réactions adverses des médicaments (Woodhouse and Wynne 1988). Il faut toutefois être prudent, car comme expliqué plus tôt, une combinaison d'agents anesthésiques peut être tout aussi néfaste qu'une augmentation des doses. Malheureusement, bon nombre des protocoles anesthésiques sont mal caractérisés et mal décrits (Tozer and Rowland 2006). Ces protocoles sont largement utilisés sans réellement connaître les interactions possibles entre les médicaments; ils ont été développés par tâtonnements (Tozer and Rowland 2006). Or, sans avoir de plus amples connaissances sur ces combinaisons il est difficile d'optimiser les protocoles anesthésiques pour cette catégorie de patients. Dans certains cas, la polypharmacie perd tous ses avantages décrits plus haut et c'est la raison pour laquelle les protocoles anesthésiques se doivent d'être mieux décrits et caractérisés.

Kétamine-midazolam

La kétamine et le midazolam sont souvent combinés pour une plus grande efficacité. Le midazolam est un substrat du CYP3A et, malgré la controverse, les plus récents papiers semblent montrer qu'il en est de même pour la kétamine (Oda, Mizutani et al. 1999, Hijazi and Bouliou 2002). Ainsi, l'inhibition compétitive entre les deux substrats du CYP3A peut modifier considérablement la cinétique de dégradation. Selon Lo et Cumming en 1975, le temps de demi-vie passe de 36 minutes pour la kétamine seule à 58 minutes lorsqu'elle est combinée à un benzodiazépine (Lo and Cumming 1975). Évidemment, cela aura comme conséquence première de prolonger leur effet anesthésique et c'est une des raisons pour laquelle cette combinaison est utilisée. Toutefois, les impacts pharmacodynamiques de cette combinaison ne se limitent pas qu'à cela. Il est rapporté que la combinaison des deux diminue les effets adverses tout en augmentant la profondeur d'anesthésie (Kennedy, Porter et al. 1998, Wathen, Roback et al. 2000). L'incidence du phénomène d'émergence dû à la kétamine pourrait être diminué suite à l'administration d'un benzodiazépine (Pellier, Monrigal et al. 1999, Karapinar, Yilmaz et al. 2006, Craven 2007). Cependant, d'autres articles montrent que l'utilisation d'un benzodiazépine n'influence pas l'incidence

d'effets adverses, exception faite que cela diminue les vomissements (Sherwin, Green et al. 2000, Wathen, Roback et al. 2000). Parmi les benzodiazépines, le midazolam s'est distingué en offrant une bonne efficacité et le temps de réveil le plus court (Wathen, Roback et al. 2000). Contrairement à la kétamine seule ou le midazolam seul, la combinaison des deux peut être utilisée pour des interventions plus invasives telles que les biopsies de moelles osseuses (Pellier, Monrigal et al. 1999, Wathen, Roback et al. 2000). La combinaison kétamine-midazolam permet de mieux soulager la douleur et l'anxiété et de limiter les complications respiratoires pour des interventions orthopédiques chez des enfants, comparativement à la combinaison de fentanyl et midazolam, (Kennedy, Porter et al. 1998). Il y a encore controverse quant à l'usage de la kétamine lors de trauma crânien, mais certains auteurs recommandent la combinaison kétamine-midazolam plutôt que fentanyl-midazolam (Kolenda, Gremmelt et al. 1996). Comme la pression intra-crânienne augmente en fonction de la pression partielle de CO₂, l'usage de fentanyl peut être plus problématique que la kétamine si une ventilation adéquate n'est pas maintenue. De plus, le midazolam est un myorelaxant, ce qui peut contrer les effets de raideurs musculaires que peut causer la kétamine (Plumb 2011). Cela s'avère essentiel lors de certaines procédures chirurgicales délicates. Les propriétés anxiolytiques et relaxantes du midazolam peuvent aussi être utiles pour diminuer le stress du patient juste avant la procédure ou avant même le début de l'anesthésie, surtout chez des patients anxieux ou stressés comme les enfants (Pellier, Monrigal et al. 1999, Karapinar, Yilmaz et al. 2006, Golan, Tashjian et al. 2011).

Bien qu'il soit très fréquent d'utiliser plusieurs molécules conjointement lors de protocole anesthésique, les interactions métaboliques de ces substances sont généralement peu ou mal décrites (Tozer and Rowland 2006). Chez les patients gériatriques cela se traduit par des réactions adverses aux anesthésiques plus fréquentes et plus graves (Meziere, Paillaud et al. 2013). C'est la raison pour laquelle il est important de revoir ces protocoles de façon à les adapter à cette catégorie de patients.

2.2 - Métabolisme

Malheureusement, avec l'âge, le risque de réactions adverses et de complications anesthésiques augmentent. Comme expliqué dans l'introduction, plusieurs éléments de réponses sont avancés. L'activité métabolique pourrait être une partie de la réponse et expliquer la raison pour laquelle la réponse aux médicaments est si différente chez cette sous-population.

Le métabolisme fait partie d'une série d'étapes que l'on nomme LADME pour libération, absorption, distribution, métabolisme et élimination (Golan, Tashjian et al. 2011). Cet acronyme représente toutes les étapes de la pharmacocinétique, de l'administration jusqu'à l'élimination. Le métabolisme n'en constitue qu'une étape. Il est important de saisir l'importance du métabolisme puisqu'il s'agit d'un facteur qui affectera grandement les concentrations systémiques. Dans une relation dose-concentration-effet, ce sont les concentrations systémiques qui dicteront l'effet du médicament sur l'organisme et donc déterminer le succès ou l'échec thérapeutique pharmacologique. La pharmacocinétique, ce que l'organisme fait au médicament, et la pharmacodynamie, ce que le médicament fait à l'organisme, sont reliés l'un à l'autre par les concentrations systémiques et donc, indirectement, par le métabolisme (Tozer and Rowland 2006).

2.2.1 - Organes extracteurs

Selon le modèle d'organe extracteur de Tozer (Figure 10) lorsqu'un médicament est administré, il subira tout d'abord les processus d'absorption pour éventuellement atteindre la circulation systémique où il se retrouvera dans ce que l'on peut appeler un « réservoir » (Tozer and Rowland 2006). À partir de ce moment, les paramètres régissant la distribution opéreront et un équilibre sera atteint entre les différents compartiments. Or, en fonction de ces paramètres, une certaine partie du médicament passera par un organe extracteur qui captera une fraction seulement de ce qui lui sera apporté. Afin de simplifier l'exercice, prenons par exemple les reins comme organe extracteur: de tout l'apport sanguin contenant la molécule en question, une proportion sera éliminée dans l'urine, le restant retournant dans la circulation systémique. À partir de là, il est possible de déterminer le coefficient d'extraction qui représente la proportion de médicament qui, passant par l'organe extracteur sera éliminée : $E = (C_{in} - C_{out}) / C_{in}$ (Tozer and Rowland 2006). Le coefficient d'extraction est intéressant puisqu'il nous donne la proportion de médicament qui sera éliminée en tout temps, mais la fraction totale éliminée dépend aussi de l'apport initial total et donc du débit sanguin (Q) de l'organe. Cette notion est nommée clairance (CL) et s'exprime en volume de sang épuré de toute drogue par unité de temps : $CL = Q \times E$ (Tozer and Rowland 2006). Ici, le rein était mis en exemple pour faciliter la compréhension du médicament qui est véritablement éliminé dans l'urine. Or, ce même concept de clairance peut être appliqué aux autres organes comme le foie. Le foie peut éliminer la molécule par le système biliaire, mais aussi en biotransformant les molécules en un métabolite, ce qui épurera le sang de sa molécule parent.

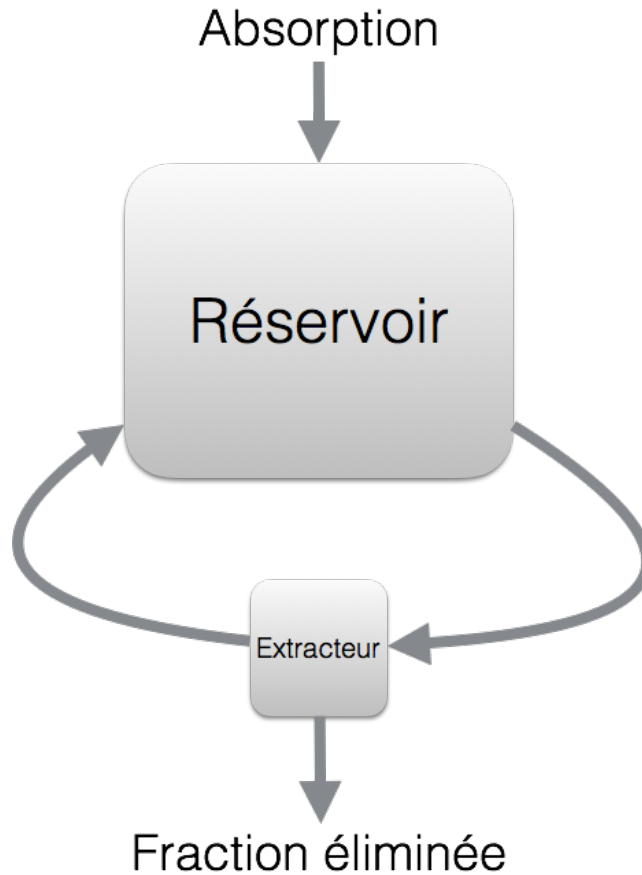


Figure 10 : Modèle d'organe extracteur. Chaque organe de l'organisme contribue à l'élimination du médicament en extrayant une partie de celui-ci. C'est la sommation des clairances de chacun des organes qui nous indique la clairance total du médicament: $CL_T = CL_h + CL_r + CL_{autres}$. (CL_T = clairance totale, CL_h = clairance hépatique, CL_r = clairance rénale, CL_{autres} = clairance autres organes) (selon Tozer and Rowland, 2006)

Le métabolisme s'effectue principalement par deux types de réactions : oxydoréduction et conjugaison (Yan and Caldwell 2001). L'oxydoréduction correspond au métabolisme de phase I (ce qui se produit au niveau des cytochromes P450 (CYP450) majoritairement, mais non exclusivement) et la conjugaison correspond au métabolisme de phase II (ce qui se produit dans le cytosol des cellules) (Yan and Caldwell 2001, Murray, Bender et al. 2010). Les deux visent à rendre les molécules plus hydrophiles afin de faciliter leur excrétion via l'urine, le système biliaire ou autre. Les métabolites produits peuvent encore être actifs et même plus que la molécule parent, ce qui peut augmenter le risque de toxicité également. Ces deux mécanismes de biotransformation peuvent agir seuls ou être combinés dans un ordre ou l'autre, mais préférablement dans l'ordre numérique suggéré (Yan and Caldwell 2001). Partant du principe que pratiquement tous les organes ont une quantité plus ou moins grande de CYP450, tous les tissus peuvent participer au métabolisme, mais en proportions différentes : foie, muqueuse intestinale, rein, cerveau, poumon, peau, *etc.* (Paine, Hart et al. 2006, Lavandera, Ruspini et al. 2015). Ces enzymes sont

constituées d'un arrangement d'acides aminés bien précis formant une ferroporphyrine avec en son centre une molécule d'hème qui elle est liée à un atome de fer, responsable des réactions d'oxydoréduction (Yan and Caldwell 2001, Yano, Wester et al. 2004, Murray, Bender et al. 2010). Cette superfamille est subdivisée en familles, sous-familles et isoenzymes qui forment des regroupements spécifiques (Figure 11) (Yan and Caldwell 2001, Tozer and Rowland 2006).

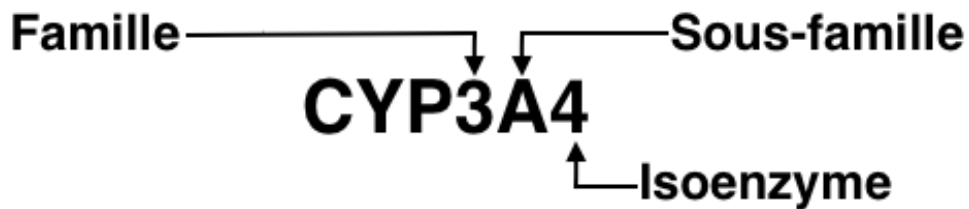


Figure 11 : Description des familles, sous-familles et isoenzymes. Les familles et sous-familles sont basées sur l'homologie de leur séquence d'acides aminés (40% d'homologie à l'intérieur d'une famille et 55% pour une sous-famille). Chaque famille et sous-famille contribuera au métabolisme de façon différente. Le numéro associé à l'isoenzyme permet de différencier les différentes entités à l'intérieur d'une sous-famille. (selon Yan and Caldwell 2001 et Murray, Bender et al. 2010)

Les différentes isoenzymes de CYP450 se retrouvent en différentes proportions (Figure 12) (Tozer and Rowland 2006). L'isoenzyme CYP3A4 est la plus importante; elle représente environ 25% des CYP450 totaux. Toutefois leur contribution au métabolisme des médicaments diffère de leur proportion respective.

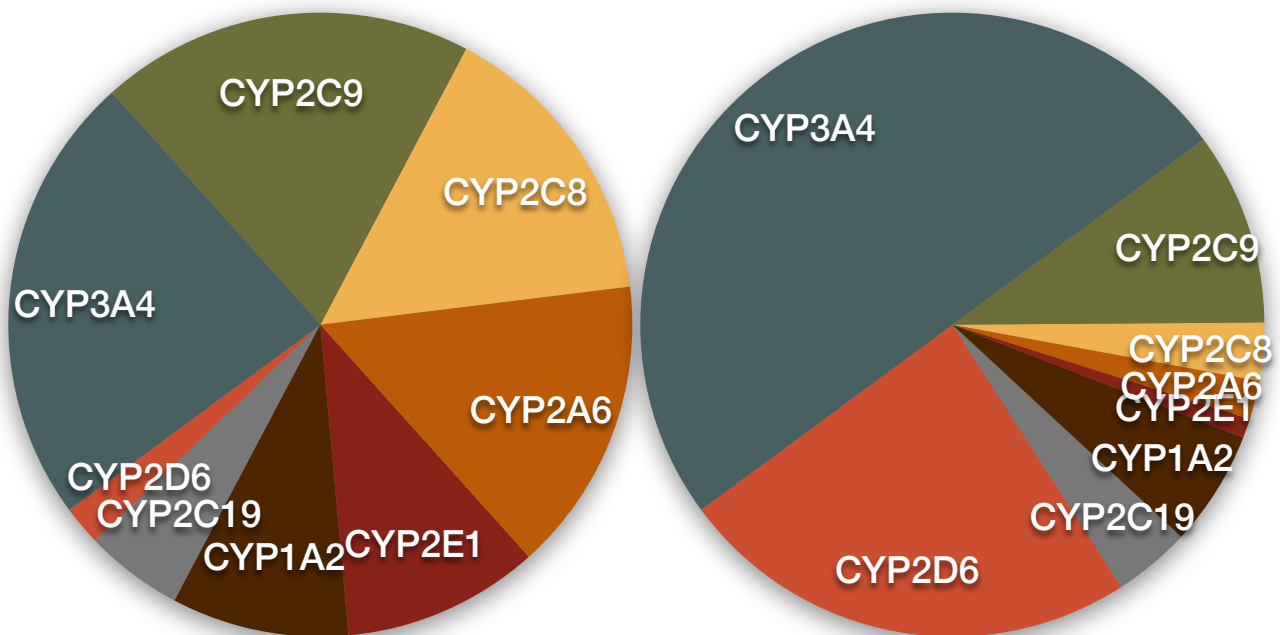


Figure 12 : À gauche: Proportion des différentes familles de cytochromes P450. À droite: Contribution au métabolisme des médicaments de chacune des familles de cytochromes P450. (selon Tozer and Rowland, 2006)

Le CYP3A4 est toujours en première position: responsable du métabolisme d'environ 50% de tous les médicaments (Yan and Caldwell 2001, Tozer and Rowland 2006). La distribution présentée est celle de l'humain. Toutefois, chez les animaux, les familles homologues (selon leur structure et leur fonction) aux isoenzymes humaines sont connues et comme beaucoup de médicaments utilisés chez les animaux dérivent des études pré-cliniques visant la commercialisation en médecine humaine, on considère que la contribution de chaque regroupement de CYP450 est similaire (Tableau 6) (Martignoni, Groothuis et al. 2006).

Tableau 6 : Représentation des isoenzymes de CYP450 homologue entre l'humain et 4 espèces animales utilisées en recherche. (selon Martignoni, Groothuis et al. 2006)

Famille	Sous-famille	Humain	Souris	Rat	Chien	Primate
CYP1	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A1, 2A2, 2A3	2A13, 2A25	2A23, 2A24
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10	2B1, 2B2, 2B3	2B11	2B17
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55	2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22, 2C23	2C21, 2C41	2C20, 2C43
	D	2D6, 2D7, 2D8	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18	2D15	2D17, 2D19, 2D29, 2D30
	E	2E1	2E1	2E1	2E1	2E1
CYP3	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44	3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23, 3A62	3A12, 3A26	3A8

Foie

Principal organe extracteur, le foie joue un rôle primordial dans l'élimination des xénobiotiques. Possédant deux vasculatures en parallèle (sang artériel et sang provenant de la veine porte) cela lui amène une très grande quantité de sang et donc une grande exposition aux principes actifs présents dans celui-ci (Sjaastad, Hove et al. 2010, Golan, Tashjian et al. 2011). La première circulation consiste en un réseau veineux qui passe des intestins au foie directement: le système porte ou veine porte (Tozer and Rowland

2006, Sjaastad, Hove et al. 2010). Ceci oblige les médicaments à effectuer ce que l'on appelle un premier passage hépatique (Tozer and Rowland 2006, Golan, Tashjian et al. 2011). Certains médicaments sont grandement affectés par ce premier passage et la concentration s'en trouve considérablement diminuée sans avoir atteint encore la cible thérapeutique (Tozer and Rowland 2006). L'autre circulation, le réseau artériel, alimente le foie en oxygène et nutriments (Sjaastad, Hove et al. 2010). Les médicaments qui se retrouvent dans le sang suite à l'administration parentérale ou qui ont échappé à l'effet de premier passage hépatique vont repasser par celui-ci afin de subir une dégradation enzymatique menée par les CYP450. Par la suite, les métabolites peuvent être conjugués avant leur élimination qui peut se faire principalement par deux voies : biliaire ou rénale (Tozer and Rowland 2006).

Rein

Le rein constitue l'organe de filtration par excellence de l'organisme (Sjaastad, Hove et al. 2010). Le rein reçoit un apport énorme de circulation sanguine : 20 à 25% du volume de sang total (Sjaastad, Hove et al. 2010, Golan, Tashjian et al. 2011). Les molécules qui vont donc passer par les reins peuvent subir du métabolisme de phase I ou II. Une certaine proportion sera excrétée directement sans biotransformation. La kétamine administrée chez les chats, par exemple, est excrétée directement par les reins sans biotransformation (Plumb 2011). L'excrétion et la filtration va s'effectuer passivement par effet de pression hydrostatique ou encore par des protéines de transport comme les glycoprotéines-p (Cotureau, von Moltke et al. 2005, Gramer, Leidolf et al. 2011). Plusieurs éléments vont influencer l'excrétion comme la perfusion sanguine ou la réabsorption effectuée par le rein. Ces facteurs évoluent dans le temps et exercent donc une fluctuation sur l'élimination des médicaments. D'ailleurs, il est à noter que fréquemment les animaux vont voir leur capacité de filtration rénale diminuer avec l'âge (Sjaastad, Hove et al. 2010). Cela peut avoir des impacts considérables sur l'élimination de certaines substances. Il est important d'en tenir compte dans le cadre de pharmacothérapie sans effets adverses.

Intestin

L'intestin est considéré comme l'organe émonctoire le plus important après le foie (Paine, Hart et al. 2006). Les mécanismes de détoxification des entérocytes sont principalement constitués de CYP450 et glycoprotéine-p pouvant affecter de façon très importante la biodisponibilité (Paine, Hart et al. 2006, Golan, Tashjian et al. 2011). La glycoprotéine-p est une pompe à efflux qui permet de retourner dans la lumière intestinale certains substrats de façon à réduire leur absorption (Golan, Tashjian et al. 2011). Certaines molécules peuvent inhiber la glycoprotéine-p et les CYP450 des entérocytes ce qui peut causer de la toxicité (Gramer, Leidolf et al. 2011). D'ailleurs, une déficience génétique en glycoprotéine-p existe et peut avoir la même conséquence (Gramer, Leidolf et al. 2011). Dans la muqueuse intestinale, le CYP3A représente 50 à 70% des CYP450 exprimés (Paine, Hart et al. 2006). Il est à noter que la glycoprotéine-p et le CYP3A partagent plusieurs substrats sans toutefois n'avoir une spécificité commune

de substrats (Kim, Wandel et al. 1999). Malgré que la concentration en CYP3A soit inférieure à celle du foie, pour certains médicaments sensibles au premier passage hépatique, notamment le midazolam, l'intestin peut fortement contribuer à l'effet de premier passage (Kolars, Awni et al. 1991, Paine, Shen et al. 1996, Paine, Hart et al. 2006). Il ne faut pas oublier que la majorité des médicaments sont administrés oralement, ce qui confère à l'intestin un rôle important en PK/PD (Paine, Hart et al. 2006).

Cerveau

Depuis longtemps, on suppose que le cerveau exprime des CYP450, car de l'ARNm de certaines isoenzymes y est détecté (McFadyen, Melvin et al. 1998, Nishimura, Yaguti et al. 2003). Depuis qu'il est possible de produire des anticorps spécifiques aux différentes isoenzymes, les protéines ont pu être quantifiées dans cinq régions différentes du cerveau humain: l'amygdale, le cervelet, le cortex, l'hippocampe et le noyau basal (Depaz, Toselli et al. 2013). Selon les régions du cerveau, la concentration de CYP3A peut dépasser celle dans le foie (Depaz, Toselli et al. 2013). Deux ans plus tard, le même groupe de chercheurs a aussi démontré la présence de CYP2C dans le cerveau (Depaz, Toselli et al. 2015). Le fait que chaque région du cerveau exprime différemment les CYP450 peut influencer l'efficacité des médicaments ou même engendrer de la toxicité (Depaz, Toselli et al. 2015). Certains auteurs ont même démontré l'importance du métabolisme cérébral dans l'efficacité de certains médicaments (Zhou, Khokhar et al. 2013, McMillan and Tyndale 2015). Par exemple, la codéine est une molécule avec un effet analgésique pauvre; c'est son métabolite actif principal, la morphine, qui procure une analgésie (Zhou, Khokhar et al. 2013, McMillan and Tyndale 2015). En revanche, cette dernière passe moins bien la barrière hémato-encéphalique que la codéine. La codéine va donc passer la barrière hémato-encéphalique plus facilement que la morphine pour ensuite être métabolisée en morphine au cerveau. Par conséquent, il y a une augmentation rapide des concentrations de morphine dans le cerveau, ce qui offre au patient une analgésie plus rapide (Zhou, Khokhar et al. 2013, McMillan and Tyndale 2015). Dans cette perspective, il pourrait être intéressant d'évaluer le métabolisme cérébral de la kétamine afin de déterminer si le cerveau a un rôle à jouer dans la pharmacocinétique *in situ* de la kétamine.

2.2.2 - Influence de l'âge et du sexe

Âge

Le phénomène de vieillissement est parmi les sujets d'actualité en ce moment. Beaucoup de travaux de recherche ont été publiés récemment dans diverses revues scientifiques (Klotz 2009). C'est une problématique actuelle de plus en plus préoccupante étant donné que la proportion de population dite gériatrique continuera d'augmenter. En 2050, on estime que 22% de la population mondiale sera âgée de plus de 60 ans, alors que pour l'instant c'est à peine plus de 11% (United Nations 2007). Fréquemment, les patients gériatriques présenteront plus d'une condition médicale simultanément (Shi, Mörrike et al. 2008, Klotz 2009). Afin d'adresser la co-morbidité associée à ces problèmes de santé, diverses catégories

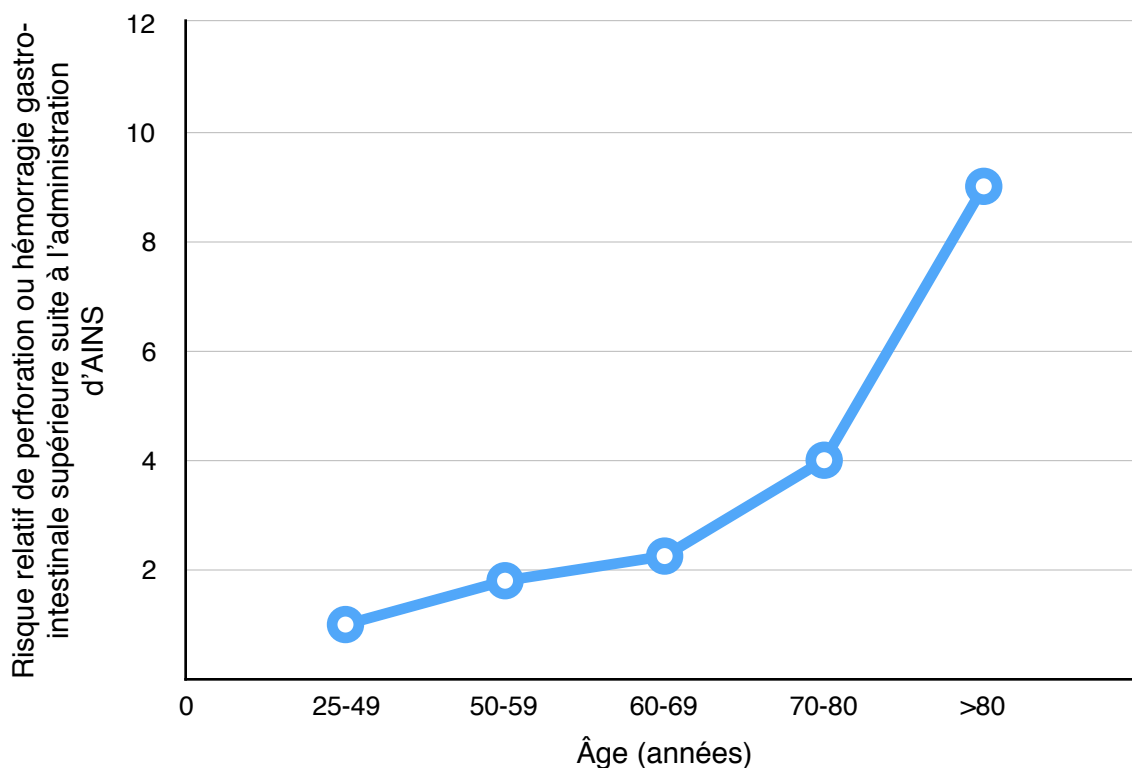


Figure 13 : Risque relatif d'hémorragie ou perforation gastro-intestinale en fonction de l'âge suite à l'administration d'AINS. (selon Shi et al., 2008)

de médicaments devront être employées. L'usage de polypharmacie comme modalité thérapeutique et la co-morbidité peuvent vraisemblablement entraîner une modification de la pharmacocinétique de ces médicaments (Shi, Mörike et al. 2008, Klotz 2009). Il y a donc véritablement une méconnaissance au sujet de l'impact de l'âge et des facteurs associés sur la clairance des médicaments, d'autant plus que cette classe de patients est celle qui en consomme le plus toute catégorie confondue, sous prescription ou en vente libre (Shi, Mörike et al. 2008).

Comme il est possible de s'y attendre, les réactions adverses des médicaments sont plus fréquentes et plus sérieuses à un âge avancé, ce qui pose réellement un problème dans le traitement de leurs conditions médicales (Figure 13) (Shi, Mörike et al. 2008, Klotz 2009). Plusieurs de ces réactions adverses viennent d'interactions de toute sorte : médicament-médicament (polypharmacie fréquente), médicament-maladie (co-morbidité fréquente), médicament-alimentation, médicament-alcool, médicament-nutraceutique (usage de produits naturels fréquent) et médicament-statut nutritionnel (Ogu and Maxa 2000, Shi, Mörike et al. 2008). Toutefois, beaucoup de controverses persistent à savoir si l'âge en soi a réellement un impact sur l'activité métabolique ou si ce sont les maladies qui sont la cause des différences métaboliques (Tanaka 1998, Cotreau, von Moltke et al. 2005, Benedetti, Whomsley et al. 2007, Shi, Mörike et al. 2008, Klotz 2009). Plusieurs s'entendent pour dire qu'avec l'âge des changements physiologiques surviennent :

la perfusion sanguine des organes, les volumes de distribution ainsi que d'autres paramètres vont changer (Woodhouse and Wynne 1988, Tanaka 1998, Klotz 2009). Tout cela fait en sorte que les médicaments seront distribués différemment dans l'organisme, ce qui aura des conséquences sur la PK/PD (Woodhouse and Wynne 1988, Klotz 2009, Meziere, Paillaud et al. 2013). De surcroît, Meziere en 2013 explique que les anesthésiques agiront différemment chez les patients gériatriques (Meziere, Paillaud et al. 2013). Les patients âgés semblent démontrer une plus grande sensibilité à ces agents. Shi en 2008 rapporte lui aussi que la pharmacodynamie peut être modifiée par des changements homéostatiques importants de différents récepteurs et de leurs fonctions (Shi, Mörrike et al. 2008). De notre côté, les travaux réalisés précédemment à notre laboratoire montrent que de nombreux paramètres pharmacocinétiques sont modifiés avec l'âge (Veilleux-Lemieux, Castel et al. 2013).

La préoccupation centrale reste tout de même la capacité métabolique d'élimination inférieure qui affectera les concentrations systémiques et donc l'effet du médicament (Tableau 7) (Klotz 2009, Meziere, Paillaud et al. 2013). Bien souvent, avec l'âge, les organes peuvent perdre en efficacité. On peut penser à la clairance rénale par exemple qui a tendance à diminuer avec l'âge (Dawling and Crome 1989, Sjaastad, Hove et al. 2010). Au niveau de l'intestin l'absorption est également modifiée et le métabolisme intestinal risque tout autant d'être modifié (Dawling and Crome 1989). La préoccupation principale encore controversée reste le métabolisme hépatique (Tanaka 1998, Cotreau, von Moltke et al. 2005, Benedetti, Whomsley et al. 2007, Shi, Mörrike et al. 2008, Klotz 2009). Tout d'abord, Shi en 2008 rapporte que la modification du métabolisme avec l'âge si elle a lieu serait de phase I étant donné une perte de masse et de perfusion hépatique (Shi, Mörrike et al. 2008). La clairance hépatique de certains médicaments pourrait donc être réduite jusqu'à 30% (Shi, Mörrike et al. 2008). Le CYP3A démontre une variation inter-individu de l'ordre de 30% (induction par facteurs environnementaux) et il est estimé qu'avec l'âge cette variabilité semble augmenter, ce qui va exacerber les disparités métaboliques entre chacun des patients (Cotreau, von Moltke et al. 2005, Tozer and Rowland 2006). De plus, comme le CYP3A est capable de métaboliser 50% des médicaments chez l'humain, il est important de comprendre que cela en fait une enzyme avec une grande capacité et peu de spécificité envers le substrat (Cotreau, von Moltke et al. 2005). Cela rend cette isoenzyme davantage susceptible aux changements de perfusion sanguine qui se produisent avec l'âge étant donné que le coefficient d'extraction hépatique de ses substrats est généralement élevé (Cotreau, von Moltke et al. 2005, Tozer and Rowland 2006). En plus des médicaments, le CYP3A peut aussi métaboliser des molécules endogènes comme les hormones. Ces hormones peuvent inhiber et moduler l'activité métabolique du CYP3A (Cotreau, von Moltke et al. 2005). Chose intéressante, les différences hormonales entre les sexes peuvent agir comme facteur confondant. En effet, en fonction de la prise en compte ou non du sexe des sujets à l'étude, l'effet de l'âge passe de négligeable à significatif (Cotreau, von Moltke et al. 2005, Benedetti, Whomsley et al. 2007). De façon globale, Cotreau conclut que la clairance intrinsèque du CYP3A est réduite avec l'âge (Cotreau, von

Moltke et al. 2005). Toutefois, il est important de souligner la controverse et le manque d'évidence scientifique quant à l'effet de l'âge sur le métabolisme dans son ensemble.

Tableau 7 : Modifications selon l'âge et le sexe de la clairance. Comparaison entre mâle et femelle et entre jeune et âgé de l'activité métabolique de chacune des voies métaboliques représentées (selon Schwartz 2003 et Cotreau, von Moltke et al. 2005)

Enzyme	Mâle	Femelle	Jeune	Âgé
Clairance rénale	+	-	+	-
CYP2C hépatique	=	=		
CYP2D hépatique	+	-		
CYP3A hépatique	- ou =	+ ou =	+	-
Glycoprotéine-p	=	=		
Phase II (en général)	+	-	=	=

Sexe

Le sexe affecte la pharmacocinétique des médicaments de diverses façons (Tableau 7). Tout d'abord, les compartiments corporels vont varier en fonction du sexe. Malgré qu'avec l'âge ces différences tendent à s'amoinrir, les hommes ont plus de masse musculaire, plus de liquide intravasculaire et donc une masse en eau plus importante que les femmes qui, proportionnellement, ont plus de masse adipeuse (Schwartz 2003). Les hommes démontrent une plus grande activité métabolique pour le CYP1A2, CYP2D6 et CYP2E1, alors que les femmes démontrent plus d'activité pour le CYP3A4 et que les autres CYP sont égaux entre les sexes (Schwartz 2003, Hu and Zhao 2010). Cependant, même si les femmes font preuve d'une plus grande activité du CYP3A4, la biodisponibilité des substrats de cette voie métabolique est plus grande chez la femme que l'homme (Schwartz 2003). De plus, certains auteurs rapportent que la clairance du CYP3A4 est plus faible en raison d'une plus grande importance des glycoprotéines-P dans le foie chez les hommes (Cummins, Wu et al. 2002, Meibohm, Beierle et al. 2002). Toutefois, comme expliqué plus tôt, ce ne sont pas tous les substrats du CYP3A4 qui sont aussi substrats des glycoprotéines-P (Kim, Wandel et al. 1999). Ces données chez les humains restent toutefois hautement controversées quant à l'issue clinique: lors de pharmacocinétique *in vivo*, peu de molécules démontrent réellement une différence due au sexe (Hu and Zhao 2010, Renaud, Cui et al. 2011). Chez les animaux, le consensus est plus fort (Renaud, Cui et al. 2011, Lu, Jin et al. 2013). Effectivement, entre mâles et femelles il y a des concentrations de CYP450 différentes (Renaud, Cui et al. 2011, Lu, Jin et al. 2013). N'oublions pas que les CYP450 sont responsables du métabolisme de molécules endogènes telles que les hormones et ces hormones peuvent, donc, agir comme inducteurs, activateurs ou inhibiteurs du métabolisme (Lu, Jin et al. 2013). Chez les femmes les études sur la variabilité de la pharmacocinétique attribuable au cycle

menstruel sont peu nombreuses et contradictoires, alors que chez les animaux plus de données sont disponibles et nous indiquent des différences mâle-femelle à l'intérieur du cycle hormonal et même du cycle circadien (Brandstetter, Kaplanski et al. 1986, Kashuba and Nafziger 1998, Schwartz 2003, Renaud, Cui et al. 2011, Lu, Jin et al. 2013). En ce qui a trait au métabolisme de phase II, les hommes démontrent une plus grande activité métabolique pour la majorité des voies métaboliques (Schwartz 2003). De façon générale, on ne peut pas dire que la clairance hépatique d'un sexe est supérieure à l'autre, il s'agit d'évaluer de façon systémique chacune des voies métaboliques. Cependant, comme la clairance rénale des hommes est plus importante que celle des femmes, on observe une plus grande clairance totale de plusieurs médicaments (digoxine, aminosides, céphalosporines, fluoroquinolones) chez l'homme (Schwartz 2003). Finalement, il est également important de considérer que toutes ces données proviennent de sujets en santé, dans des conditions bien paramétrées alors qu'en réalité, les patients peuvent être malades et présentés dans des contextes totalement différents (Schwartz 2003).

2.2.3 - Interactions médicamenteuses

Il est très fréquent de faire usage de plus d'un médicament simultanément. Lors d'hospitalisation, un patient conventionnel reçoit en moyenne cinq médicaments alors que pour un patient gériatrique il s'agit de huit ou plus (Tozer and Rowland 2006). En effet, les patients gériatriques sont ceux qui consomment le plus de médicaments avec et sans prescription (Shi, Mörrike et al. 2008). Cette même sous-population est également celle chez qui les réactions adverses aux médicaments sont les plus fréquentes (Shi, Mörrike et al. 2008). Il est très plausible de croire qu'une partie de ces réactions adverses est due à des interactions entre médicaments. En effet, certains produits ont déjà été retirés du marché pour leur haut potentiel d'interaction médicamenteuse grave (Ogu and Maxa 2000, Tozer and Rowland 2006). Lorsque les mécanismes des médicaments sont connus il est possible de prévoir les interactions et, chose surprenante, elles mêmes peuvent être désirables parfois (Ogu and Maxa 2000, Tozer and Rowland 2006). La plupart des molécules interagissent ensemble sur une base de pharmacocinétique (métabolisme, volume de distribution, biodisponibilité, *etc.*), mais peuvent aussi agir conjointement sur la pharmacodynamie (Tozer and Rowland 2006). L'interaction entre les deux molécules peut se traduire par un effet additif ou même synergique et bénéficier au patient. Or, en pratique la plupart des interactions indésirables sont remarqué lorsqu'il y a un changement dans l'équilibre formé par les molécules en interaction (Tozer and Rowland 2006). Comme il a été présenté plus tôt, les patients gériatriques ont des problèmes de douleur chronique et certains d'entre eux prendront des analgésiques sur une base régulière (Gagliese and Melzack 1997, Katsma and Souza 2000, Muriel, Pérez-Castejón et al. 2007). Plusieurs de ces molécules seront métabolisées par les voies métaboliques du CYP3A et CYP2D (Armstrong, Wynn et al. 2009). Or, il faut tenir compte de la variabilité interindividuelle qui peut influencer le potentiel d'interactions médicamenteuses (Armstrong, Wynn et al. 2009). En effet, la voie du CYP2D présente différents

polymorphismes génétiques dont il faut tenir compte lorsque plus d'un médicament est administré (Ogu and Maxa 2000, Armstrong, Wynn et al. 2009). Celle du CYP3A est inductible par divers facteurs environnementaux et il faut donc tenir compte des habitudes du patient (alimentation, consommation d'alcool et cigarette, *etc.*) (Armstrong, Wynn et al. 2009). Parlant de celles-ci, il ne s'agit probablement pas que d'interactions entre médicaments, mais également des interactions médicament-maladie (comorbidité fréquente), médicament-alimentation, médicament-alcool, médicament-nutraceutique (usage de produits naturels fréquent) et médicament-statut nutritionnel (Ogu and Maxa 2000, Shi, Mörike et al. 2008). En effet, du point de vue d'une enzyme, toute molécule peut être un substrat et interagir avec le métabolisme normal d'un médicament; les possibilités sont sans limite (Tozer and Rowland 2006). L'exemple classique des interactions médicament-alimentation est le jus de pamplemousse (Ainslie, Wolf et al. 2014). Les multiples composés actifs présents dans le jus de pamplemousse sont des substrats du CYP3A et de la glycoprotéine-P et vont donc interagir avec un grand nombre de médicament (Ainslie, Wolf et al. 2014). Ce qui est particulièrement difficile avec ce type d'interactions (alimentaire et autres), c'est qu'elles sont plus complexes (plusieurs composés impliqués) et mal caractérisées (on sait rarement quelle molécule agit comme « coupable » ou « victime ») (Shi, Mörike et al. 2008, Ainslie, Wolf et al. 2014).

2.2.4 - Modèle d'étude *in vitro*

Afin de pouvoir mener des travaux sur le métabolisme hépatique et cérébral de la kétamine, il est nécessaire de trouver un ou plusieurs modèles d'étude sur lesquels il est possible de travailler pour répondre aux objectifs fixés. Or, divers choix s'offrent à nous : fractions S9, microsomes, supersomes, lignée de cellules transgéniques, *in vivo*, *etc.* Nous verrons plus en détails les fractions S9 et les supersomes ainsi que les raisons pour lesquelles nous avons utilisé ces deux fractions cellulaires. Les modèles d'étude *in vitro* décrits sont ceux du foie, mais ils sont sensiblement les mêmes pour ceux de cerveau.

Fraction S9

Les fractions S9 sont composées du cytosol ainsi que de la fraction microsomale des cellules. Le tout est préparé à partir d'un tissu qui sera réduit en une mixture homogène et centrifugé à faible force (9000 g) pendant 20 minutes (Duffus, Nordberg et al. 2007). Cette centrifugation sert à retirer les débris cellulaires telles que les membranes, noyaux et autres organelles ne possédant pas d'activité métabolique. Le surnageant recueilli formera la dite fraction S9 (Duffus, Nordberg et al. 2007). Cette fraction inclut les enzymes du métabolisme de phase I et II. Il faut ajouter les cofacteurs nécessaires aux réactions de phase I (NADPH) et phase II pour que la digestion enzymatique se produise de façon adéquate (Brandon, Raap et al. 2003). Cela offre une bonne représentation du métabolisme dans son ensemble. En revanche, ces fractions peuvent avoir une activité métabolique moins importante que d'autres types de fractions, ce qui

peut amener à une concentration de métabolites trop faible pour être détectée (Brandon, Raap et al. 2003). Cette fraction nous sera utile pour évaluer le métabolisme hépatique et cérébral de la kétamine ainsi que son interaction avec le midazolam. Comme elle offre une bonne représentativité nous pourrions apprécier l'évolution du métabolisme en fonction de l'âge. De plus, elle est facile à produire et demande peu d'équipement spécialisé.

Supersomes

Le principe derrière les supersomes est différent. Il ne s'agit pas d'une fraction cellulaire que l'on récupère de tissus de mammifères, mais plutôt d'une suspension protéique que l'on crée pratiquement de toute pièce. Les cellules d'insectes n'expriment pas les protéines CYP450 ou UGT alors en les transfectant à l'aide de baculovirus il est possible de leur faire exprimer une isoenzyme bien précise (Brandon, Raap et al. 2003). De cette façon, la protéine recombinante est isolée et il est possible d'observer une seule voie métabolique. Le niveau de sélectivité est supérieur aux microsomes. Cette sélectivité permet d'évaluer l'influence des différents génotypes et polymorphisme présents dans une population avec cette fraction (Brandon, Raap et al. 2003). Comme pour les autres fractions, il faut ajouter les cofacteurs de NADPH pour le métabolisme de phase I (Brandon, Raap et al. 2003). Les différentes familles de P450 sont disponibles commercialement et une appréciation de leur activité métabolique est habituellement faite (Brandon, Raap et al. 2003). Les supersomes nous ont servi à identifier et confirmer la voie métabolique spécifique à la formation de norkétamine depuis la kétamine.

Autres

La préparation des microsomes est similaire à celle des fractions S9 sauf qu'il faut faire une centrifugation différentielle afin de séparer les différents composants de la fraction pour isoler la fraction microsomale (Beaufay, Amar-Costesec et al. 1974, Duffus, Nordberg et al. 2007). Dans cette strate de la centrifugation, on n'y retrouvera que des CYP450 et UGT (Beaufay, Amar-Costesec et al. 1974). La fraction cytosolique est constituée uniquement du cytosol des cellules, comme son nom l'indique. Elle sert donc à évaluer le métabolisme de phase II spécifiquement (Favetta, Guitton et al. 2000). Elle est peu utilisée, puisque les microsomes et la fraction S9 offre plus d'informations (Favetta, Guitton et al. 2000, Brandon, Raap et al. 2003).

Les hépatocytes primaires ont l'avantage de permettre une évaluation du métabolisme hépatique très proche de celle du foie *in vivo* puisque tous les mécanismes métaboliques cellulaires y sont présents (Brandon, Raap et al. 2003, Guillouzo, Corlu et al. 2007). Elles sont la référence des expériences *in vitro* pour les études de métabolisme et toxicité (Guillouzo, Corlu et al. 2007). Elles peuvent être issues d'hépatomes ou encore des hépatocytes ayant subi des transformations oncogéniques (Guillouzo, Corlu et al. 2007). Dans les deux cas, les niveaux d'expression des CYP450 sont relativement faibles (Brandon,

Raap et al. 2003, Guillouzo, Corlu et al. 2007). De plus, les hépatocytes issus d'hépatomes sont moins différenciés que des hépatocytes sains (Brandon, Raap et al. 2003, Guillouzo, Corlu et al. 2007). Par conséquent, on ne retrouve pas toutes les isoenzymes exprimées normalement (Brandon, Raap et al. 2003).

La lignée de cellules transgéniques, comme son nom l'indique, constitue une lignée de cellules qui ont été modifiées pour exprimer les enzymes de phase I et II (Brandon, Raap et al. 2003). Les niveaux d'enzymes sont élevés et stables, ce qui leur confèrent un atout important. Leur principale limite est la même que les supersomes, c'est-à-dire l'évaluation de seulement quelques voies métaboliques (Brandon, Raap et al. 2003).

Les coupes de foie ainsi que les foies perfusés sont des modèles encore plus complets puisque toutes les voies métaboliques hépatiques sont présentes. Les coupes de foie ont été développées il y a fort longtemps et ont servi entre autres à Hans Adolf Krebs afin de découvrir le fameux cycle de Krebs (Brandon, Raap et al. 2003). Par contre, il est coûteux et difficile d'obtenir ces préparations, leur viabilité est courte et la reproductibilité de ces préparations est faible (Brandon, Raap et al. 2003). Finalement, le modèle *in vivo* est le plus représentatif puisqu'il tient compte de l'interaction de tous les organes. Malheureusement, les coûts et le temps requis sont plus élevés et il ne faut pas perdre de vue la dimension éthique qui est aussi à prendre en considération puisque pour chaque tentative un animal doit être sacrifié (Brandon, Raap et al. 2003).

2.2.5 - Enzymologie et modèles mathématiques

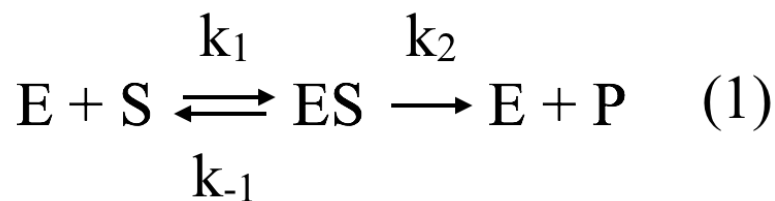
L'étude des réactions chimiques catalysées par des enzymes a débuté au XVII^e siècle et est aujourd'hui un domaine d'étude important vu la très large utilisation d'enzymes dans des procédés industriels ainsi qu'en pharmacologie (Copeland and Retey 1996). Bon nombre de maladies sont le résultat d'une cascade de réactions chimiques catalysées par des enzymes d'où l'intérêt de développer des inhibiteurs enzymatiques (Copeland and Retey 1996). Le contraire aussi peut se produire, c'est-à-dire qu'une voie métabolique médiée par une ou plusieurs enzymes peuvent devenir moins active et causer donc une perturbation de l'homéostasie. Dans le cas de ce projet, il s'agit justement d'évaluer si l'âge peut avoir cet effet sur l'efficacité d'une enzyme, CYP3A, et les équations de Michaelis-Menten vont être utilisées à des fins de quantification.

C'est en 1903 que Victor Henri publie le premier modèle mathématique capable de prédire la vitesse de réaction en fonction de la concentration de substrat et qui tient compte de l'inhibition de la réaction enzymatique par les produits formés (Copeland and Retey 1996, Johnson and Goody 2011). S'inspirant fortement de ce modèle, en 1913, Leonor Michaelis et Maud Menten publie un article très approfondi sur

la cinétique enzymatique (Michaelis and Menten 1913, Copeland and Retey 1996, Johnson and Goody 2011). Cet article présente un nouveau modèle mathématique plus complet que le précédent et tient compte d'éléments qui leur étaient inconnus à l'époque (par exemple: concentration d'enzymes) (Johnson and Goody 2011). Aujourd'hui leur nom sont connus pour les équations de Michaelis-Menten qui décrivent la vitesse de formation de produits à partir de substrat et enzymes. Ce modèle mathématique est encore très utilisé aujourd'hui et c'est celui qui servira à atteindre les objectifs de ce projet. Même s'il consiste en une approximation, ce modèle est très fiable lorsque appliqué dans des conditions expérimentales très précises (Chen, Niepel et al. 2010). Donc, dans le cas de réaction enzymatique *in vitro*, le modèle de Michaelis-Menten est adéquat et permet d'arriver sensiblement aux mêmes résultats que d'autres modèles mathématiques plus complexes (Chen, Niepel et al. 2010).

Équations de Michaelis-Menten

L'équation chimique d'une réaction enzymatique s'écrit de la façon suivante (Équation 1) (Murray, Bender et al. 2010, Han Le 2016) :



Le E représente l'enzyme, le S représente le substrat et le P représente le produit formé. Les constantes d'équilibre représentent la stabilité du complexe enzyme-substrat. Lorsque rassemblées, elles forment une nouvelle constante s'appelant K_m . Cette constante est justement celle que l'on appelle constante de Michaelis-Menten. Si l'on se fie à leur papier original de 1913 on retrouve une présentation différente de cette constante qui tient compte de leurs connaissances du temps (Johnson and Goody 2011). En regardant attentivement de quoi elle est constituée, on peut remarquer qu'elle indique au numérateur les constantes de rupture du complexe ES et au dénominateur la constante de formation du complexe ES (Équation 2) (Han Le 2016). On peut donc dire que sa valeur va être inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour le substrat (Murray, Bender et al. 2010). Ceci est un concept important puisqu'il nous permet d'identifier quelles molécules vont se lier aux CYP450 avec plus de facilité et ainsi identifier des potentielles interactions médicamenteuses.

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (2)$$

À l'aide d'équation différentielle, il est possible de lier les concentrations de substrat et d'enzymes à une vitesse de réaction enzymatique (Équation 3) (Han Le 2016).

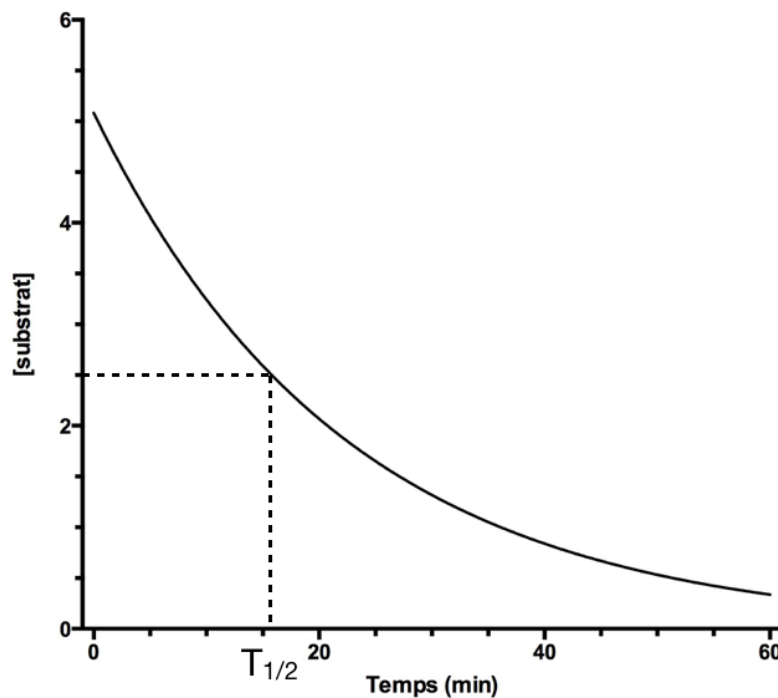
$$V_{\max} = k_2[E_T] \quad (3)$$

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

Toute réaction enzymatique atteindra éventuellement une vitesse maximale. Cela correspond au moment où tous les sites catalytiques des enzymes seront occupés par une molécule de substrat. Dans de tels cas, la vitesse maximale dépendra de la concentration d'enzymes et de la constante d'équilibre qui favorise la libération du produit (celle qu'on appelle également constante catalytique (K_{cat})) (Murray, Bender et al. 2010, Han Le 2016). Finalement, afin d'évaluer l'efficacité d'une enzyme à effectuer une réaction enzymatique, nous utiliserons le concept de clairance intrinsèque qui se calcule à l'aide de l'équation 4.

$$CL_{int} = \frac{V_{\max}}{K_m} \quad (4)$$

C'est à partir de l'équation trois, que l'on nomme de Michaelis-Menten, que nous sommes capables de tracer le graphique de K_m/V_{\max} (Figure 14). La vitesse maximale représente l'asymptote du plateau théorique que la réaction atteindra (fonction linéaire d'ordre zéro) (Murray, Bender et al. 2010). Le début de la courbe est tout aussi intéressant (fonction linéaire d'ordre un). C'est dans cette région de la courbe que l'on peut obtenir la constante de Michaelis-Menten; une partie importante de cette cinétique. Lors



$$[A_t] = [A_0] + e^{-kt}$$

$$\frac{[A_{t_{1/2}}]}{[A_0]} = \frac{1}{2}$$

$$\frac{1}{2} = e^{-kt_{1/2}}$$

$$\ln\left(\frac{1}{2}\right) = -kt_{1/2}$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

Figure 14 : Graphique de stabilité métabolique et preuve mathématique du temps de demi-vie.

d'administration de plusieurs médicaments simultanément, il faut tenir compte de ces données, car une des deux molécules, celle ayant le K_m le plus bas, pourrait inhiber la dégradation de l'autre molécule en se liant de façon prioritaire sur l'enzyme (Murray, Bender et al. 2010). Sur le graphique, il est indiqué comment la trouver: il s'agit de la concentration de substrat lorsque la vitesse est la moitié de la vitesse maximale (preuve mathématique en Figure 14) (Murray, Bender et al. 2010, Han Le 2016).

En complément aux informations sur la cinétique enzymatique fournies par les équations de Michaelis-Menten, nous procéderons à l'évaluation de la stabilité métabolique de la kétamine (Figure 15). Elle nous permettra de connaître entre autres le temps de demi-vie: temps requis afin de dégrader 50% de la concentration initiale de substrat (Lower 2010). Cela donne une idée de l'exposition aux concentrations systémiques. Cependant, il faut être prudent avec l'extrapolation de données *in vitro* vers *in vivo*, car le modèle *in vitro* ne tient pas compte des autres processus métaboliques et physiologiques pouvant intervenir en dehors des CYP450 (métabolisme phase II et III, distribution, accessibilité aux enzymes, etc.) (Chen, Niepel et al. 2010). Il est important de connaître la constante de Michaelis-Menten avant d'effectuer la digestion enzymatique, car il faut réaliser l'expérience en dessous de la concentration du K_m afin de s'assurer que nous nous situons dans la région d'ordre un de la courbe K_m/V_{max} (Lower 2010). Dans cette région de la courbe, l'interprétation mathématique afin d'obtenir le temps de demi-vie est

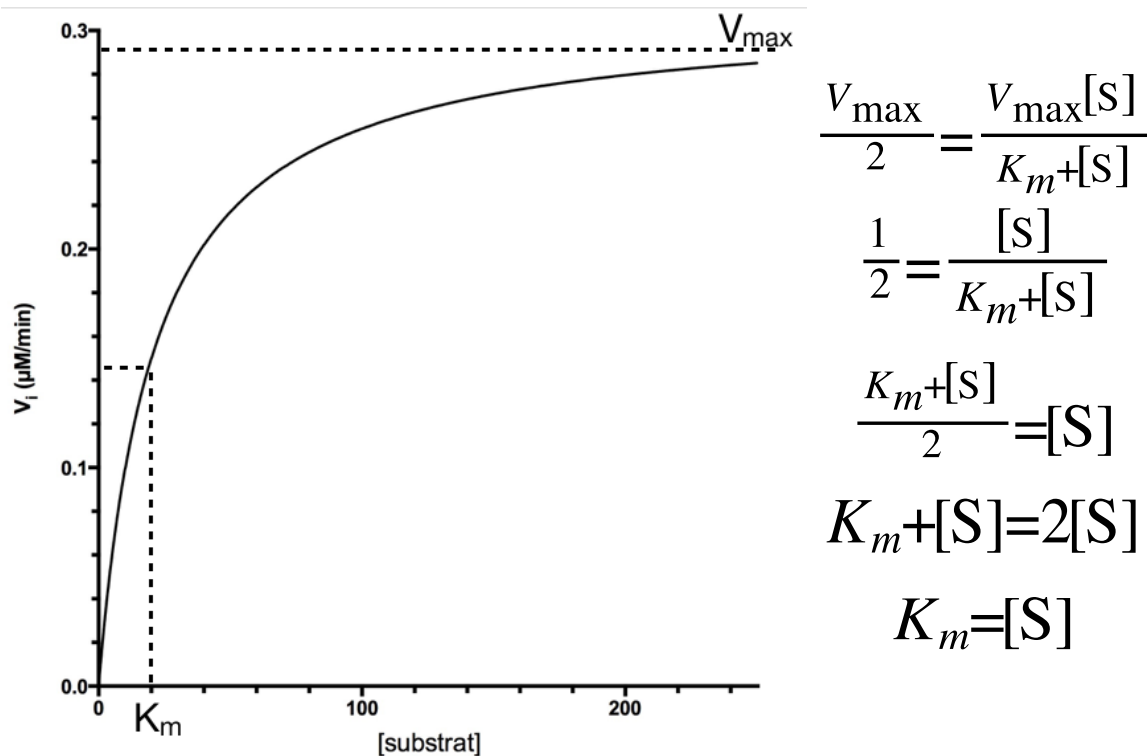


Figure 15 : Graphique de K_m/V_{max} tiré des équations de Michaelis-Menten et preuve mathématique de la valeur de K_m .

beaucoup plus facile et robuste. En utilisant une concentration de substrat très inférieure à la valeur de K_m obtenue, la réaction n'est limitée que par le temps de dégradation et non la quantité d'enzyme limitée. Le graphique ainsi que le temps de demi-vie s'obtient à partir des équations présentées en Figure 15 (Lower 2010).

Finalement, nous procéderons également à l'inhibition du métabolisme de la kétamine par le midazolam et le kétoconazole (Figure 16). Le kétoconazole est l'inhibiteur de référence de la voie du CYP3A, alors que le midazolam est le substrat de référence de cette même voie métabolique (Cotreau, von Moltke et al. 2005, Halama, Hohmann et al. 2013, Mooiman, Maas-Bakker et al. 2013, Food and Drug Administration 2014). Tous deux nous serviront à confirmer avec haute certitude la voie métabolique par laquelle la formation de norkétamine se produit. De plus, le midazolam est fréquemment utilisé en combinaison avec la kétamine dans des protocoles anesthésiques (Pellier, Monrigal et al. 1999, Karapinar, Yilmaz et al. 2006, Craven 2007, Plumb 2011). Donc, ces données nous permettront d'évaluer l'interaction métabolique que les deux molécules présentent. L' IC_{50} est la concentration inhibitrice médiane, c'est-à-dire la concentration à laquelle l'inhibiteur inhibera de moitié la réaction enzymatique. C'est à partir de cette valeur que nous pourrons comparer la capacité inhibitrice de chacune des molécules sur le métabolisme de la kétamine. Les mêmes équations de cinétiques sont utilisées (équations de Michaelis-Menten), auxquelles il faut rajouter des paramètres d'inhibition pour tenir compte de l'influence d'un deuxième substrat (Peter Abboud 2016).

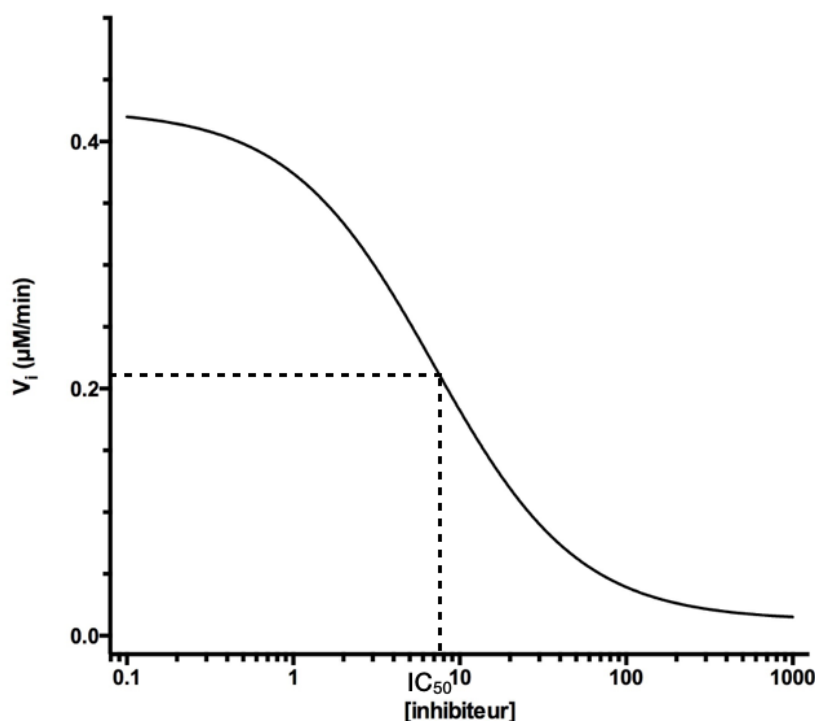


Figure 16 : Graphique de la concentration d'inhibiteur nécessaire afin d'inhiber 50% de la réaction enzymatique avec représentation de la valeur d' IC_{50} .

2.3 - Méthode analytique

Afin de répondre à notre question initiale, nous aurons besoin de quantifier les substrats et leurs métabolites des réactions enzymatiques. Pour ce faire, nous utiliserons la chromatographie en phase liquide de haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (MS). De plus, une technique de dilution isotopique sera utilisée pour quantifier adéquatement les concentrations de ces molécules. Cette méthode est la technique de référence dans le domaine de l'étude de petites molécules (Hopfgartner, Husser et al. 2003, Korfmacher 2005).

2.3.1 - Chromatographie en phase liquide de haute performance

La chromatographie en phase liquide de haute performance (HPLC) (Figure 17) est une méthode de séparation dans le temps des constituants d'un échantillon en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules composant ce dernier (Pailleux 2013, Waters 2016). La colonne de chromatographie utilisée aujourd'hui en pharmacologie est un cylindre de fin diamètre et de longueur variable dans lequel on retrouve des particules de silice compactées (Waters 2016). Il faudra donc une pompe pour faire circuler la phase mobile, dont la composition peut varier, au travers d'un circuit qui comprend la colonne de chromatographie (Pailleux 2013). Un injecteur incorporera à la phase mobile l'échantillon biologique à analyser sur le circuit (Pailleux 2013). Le mélange passera par la colonne et sera séparé avant d'atteindre le détecteur qui, dans le cadre de ce projet, est un spectromètre de masse. La résolution chromatographique dépendra du pouvoir de mécanique de séparation (longueur de la colonne et taille des particules) et du pouvoir chimique de séparation (interactions de type van der Waals entre phase mobile et stationnaire) (Heftmann 2004, Waters 2016). Le pouvoir chimique de séparation est fonction de la polarité

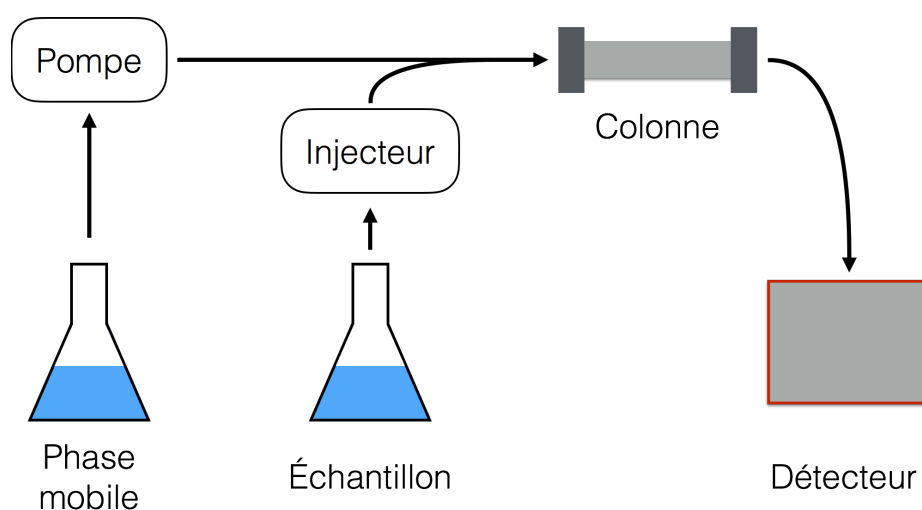


Figure 17 : Schéma du fonctionnement d'un système de chromatographie en phase liquide. (selon Korfmacher 2005)

et de la charge électrique des deux phases ainsi que des molécules des échantillons (Heftmann 2004, Waters 2016). Si ces dernières ont une polarité semblable à la phase mobile, alors elles suivront la phase mobile presque sans ralentir (Waters 2016). Au contraire, si elles partagent les caractéristiques de la phase stationnaire, leur cheminement sera ralenti, voire arrêté et elles se retrouveront piégées dans la colonne (Waters 2016). Pour ce qui est de la charge électrique, c'est le contraire: les molécules auront plus d'affinité avec la phase qui aura une charge contraire (Heftmann 2004, Waters 2016).

2.3.2 - Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qui permet de distinguer les substances entre elles selon leur masse et leur charge. Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur (Hopfgartner, Husser et al. 2003, Korfmacher 2005).

Source d'ionisation

Différentes sources d'ionisation existent dont celle d'électronébulliseur (ESI pour *electrospray ionization* en anglais) (Figure 18) qui sera utilisée dans le cadre de notre étude. Elle permet de produire des ions en phase gazeuse à partir de la phase liquide (HPLC) sans fragmenter les molécules d'intérêt (Kearle and Peschke 2000, Soares, Franco et al. 2012). La source est composée d'une électrode à laquelle sera appliqué un fort voltage (Kearle and Peschke 2000, Wang and Cole 2000). Le liquide provenant de l'HPLC passera donc en plein centre de l'électrode. Suite à l'application du voltage les charges positives du liquide seront attirées vers l'anode alors que les charges négatives voudront s'en éloigner, ce qui engendrera la formation du cône de Taylor (Kearle and Peschke 2000, Pailleux 2013). Depuis ce cône, des gouttelettes s'échapperont en direction de l'anode (Kearle and Peschke 2000, Wang and Cole 2000). L'idée est de favoriser la formation des plus petites gouttelettes possible à l'aide du voltage, du gaz de nébulisation et des conditions chromatographiques afin de produire le plus d'ions possibles (Kearle and Peschke 2000, Heftmann 2004, Nguyen and Fenn 2007). Une fois formés, les ions entreront dans le spectromètre de masse sous l'effet des champs électriques et de la pression négative qui existe entre la source (pression atmosphérique) et les analyseurs (vide théorique) (Barker and Ando 1999).

Les analyseurs

Il existe différents types d'analyseurs (quadripôles, trappe ionique, *time-of-flight* (TOF), orbitrap, *etc.*) de même que des instruments hybrides contenant différents analyseurs (Korfmacher 2005, de Hoffmann and Stroobant 2007). Pour ce projet, nous avons utilisé un instrument de type triple quadripôle et un autre de type trappe ionique. Quelques caractéristiques sont communes aux différents modèles qui existent dont entre autres le vide théorique dans l'instrument (Barker and Ando 1999, de Hoffmann and Stroobant 2007). Cela permet de diriger les ions par pression négative dans l'appareil, favoriser l'état gazeux, éviter les collisions avec l'air ambiant, ce qui pourrait faire perdre la charge des ions aux profits de ce gaz, et

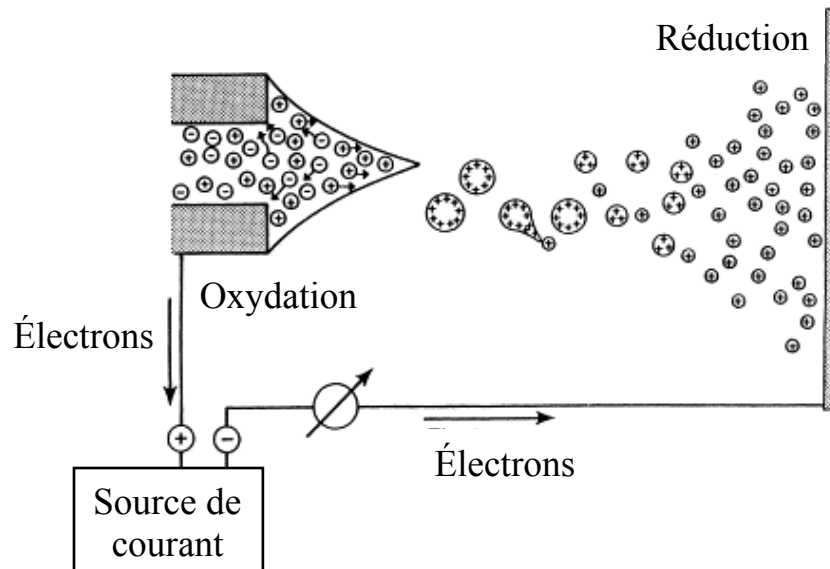


Figure 18 : Représentation schématique d'une source d'ionisation ESI. (selon Kebarle and Peschke 2000)

prolonger la vie de la source d'ionisation en évitant son oxydation (Barker and Ando 1999, de Hoffmann and Stroobant 2007). Le principe d'un analyseur est simple : acheminer les ions au détecteur en fonction de leur ratio masse sur charge (Barker and Ando 1999, de Hoffmann and Stroobant 2007).

L'analyseur de type quadropôle est l'instrument le plus utilisé en spectrométrie de masse (Figure 19) (Barker and Ando 1999, Korfmacher 2005). Il est fréquemment utilisé pour des protocoles d'analyse biologique et d'identification de métabolites (Korfmacher 2005). Comme son nom l'indique le quadropôle est composé de 4 pôles qui font office d'électrodes (de Hoffmann and Stroobant 2007). Lorsque les ions entrent dans le quadropôle, ils conservent leur vitesse de déplacement vers le détecteur. Cependant, les électrodes produiront un champ électrique de façon à faire osciller les ions (Barker and Ando 1999, de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). De cette façon, seuls les ions ayant le ratio masse sur charge approprié, donc l'énergie cinétique appropriée, atteindront le détecteur et seront quantifiés (Barker and Ando 1999, de Hoffmann and Stroobant 2007). Le triple quadropôle quant à lui est

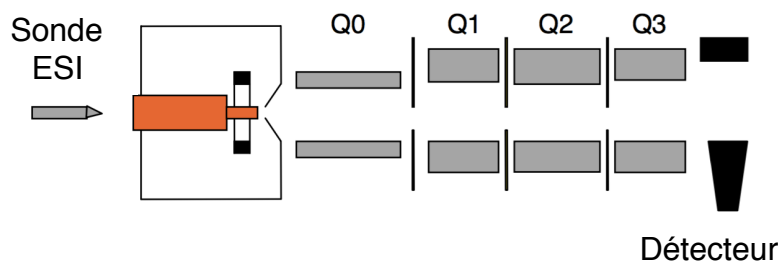


Figure 19 : Structure d'un triple quadropôle. (selon de Korfmacher 2005)

composé de trois quadrupôles (de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). Le premier (Q1) et le dernier (Q3) sont des analyseurs alors que celui du milieu (Q2) est une cellule de collision (de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). Cette cellule de collision contiendra un gaz à pression prédéterminée qui permettra de produire des fragments à partir des ions précurseurs (de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). Les fragments sont spécifiques à la structure des ions précurseurs, ce qui permettra d'accroître la sélectivité de l'analyse (Pailleux 2013).

La trappe ionique (Figure 20) est également un instrument couramment rencontré. Il est apprécié surtout pour les protocoles d'élucidation structurale de molécules. Comme le nom l'indique, la trappe ionique piègera les ions dans un petit espace. Deux types de trappe ionique existent: la trappe tridimensionnelle (3D) et la bidimensionnelle (2D; ou trappe ionique linéaire) (de Hoffmann and Stroobant 2007). La trappe 3D est constituée d'une électrode annulaire faisant le tour de la chambre, en forme d'hyperbole, et de deux autres électrodes se localisant à l'entrée et à la sortie de l'espace (Barker and Ando 1999, Korfmacher 2005, de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). Les ions passeront par l'ouverture de l'électrode d'entrée et ils resteront à l'intérieur de la structure jusqu'à leur extraction par l'ouverture de l'électrode de sortie menant au détecteur (Barker and Ando 1999, de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). La trappe ionique linéaire consiste en un quadrupôle contenant à ses extrémités des lentilles permettant de refléter les ions vers l'intérieur du quadrupôle (de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). Les principaux avantages de la trappe ionique linéaire est de contenir une quantité beaucoup plus grande d'ions et d'offrir une meilleure sensibilité, résolution et précision de masse (de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013). Ces deux systèmes de trappe peuvent elles aussi produire des fragments (de Hoffmann and Stroobant 2007, Pailleux 2013).

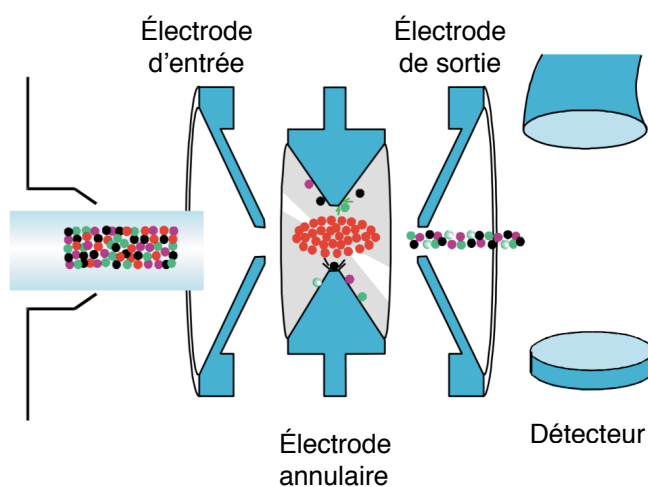


Figure 20 : Structure d'une trappe ionique 3D. (selon de Korfmacher 2005)

2.3.3 - Technique de dilution isotopique

La dilution isotopique consiste en une méthode de quantification (de Hoffmann and Stroobant 2007). Une fois que les ions atteignent le détecteur et que le signal électrique est converti en intensité de signal, il faut pouvoir convertir ce signal en concentration, masse, volume ou quantité quelconque. Pour ce faire, différentes techniques existent. On peut utiliser un échantillon de référence ou de contrôle qui sera utilisé pour attribuer une valeur quantitative à un signal donné à partir duquel pourront être extrapolées celles des autres échantillons (Pailleux and Beaudry 2012). Il est également possible de recréer une référence à partir de l'ensemble des échantillons analysés (Pailleux and Beaudry 2012). Toutefois, il est important de se rappeler que la spectrométrie de masse est un outil d'analyse très sensible, ce qui constitue un de ses principaux avantages, mais qui la rend aussi plus sensible aux subtiles variations des conditions expérimentales. Ainsi, ces

méthodes peuvent parfois subir une certaine variabilité. En effet, leur reproductibilité est moins bonne que la dilution isotopique (Pailleux and Beaudry 2012). Cette dernière remédie à ce problème en apportant la possibilité de combiner la référence et l'échantillon en un seul. Comme son nom l'indique, il s'agit de diluer l'échantillon avec une solution contenant des isotopes de concentration connue une fois que la

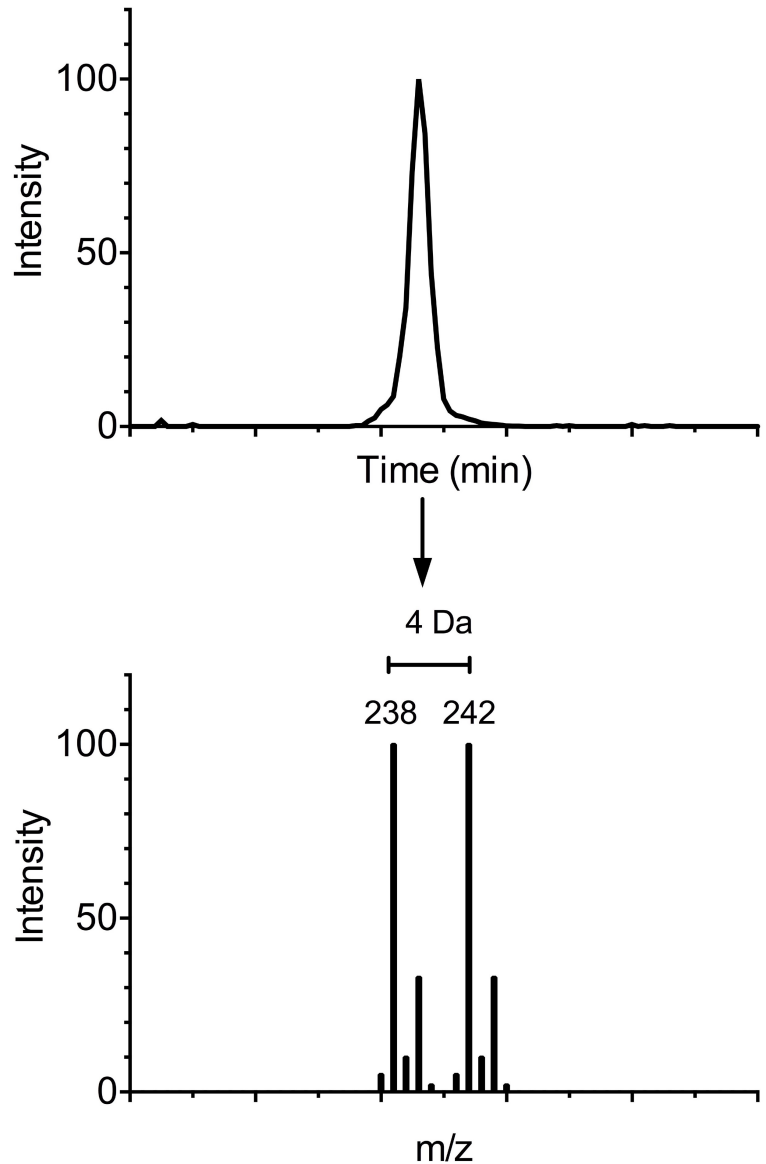


Figure 21 : Sur le graphique du haut, on peut voir un chromatogramme montrant l'intensité de signal d'un ion ciblé. Comme l'ion de l'échantillon et son standard ont exactement la même structure, ils vont apparaître au même moment au chromatogramme. Ensuite, en extrayant le spectre de masse, on peut voir deux masses: l'ion cible et son standard interne séparés par 4 unités de masse.

digestion enzymatique est terminée (de Hoffmann and Stroobant 2007). Ainsi, l'isotope utilisé comme référence et l'ion cible seront tous deux exposés à la même variabilité expérimentale. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé des standards internes des molécules parents (d_4 -kétamine, d_4 -midazolam) ou métabolites (d_4 -norkétamine, d_4 -1-hydroxymidazolam) qui contiennent chacun quatre atomes de deutérium. Un deutérium est un isotope de l'hydrogène contenant une unité de masse de plus que ce dernier. Ainsi, la masse des isotopes de quantification différera de celle des molécules à analyser par quatre unités de masse. Au spectre de masse, nous obtiendrons donc deux pics: la molécule cible et le standard interne quatre unités de masse plus loin (Figure 21). La concentration du deuxième étant connue, il sera possible d'effectuer un rapport des aires de ces pics pour quantifier adéquatement le premier (de Hoffmann and Stroobant 2007). Cette méthode de quantification a déjà démontré sa fiabilité, précision et reproductibilité (Pailleux and Beaudry 2012).

3 - Hypothèses et objectifs

Nos hypothèses pour ce projet sont:

1. La voie métabolique principale de formation de norkétamine à partir de la kétamine dans le foie chez le rat est celle du CYP3A.
2. La clairance intrinsèque de la voie métabolique majeure de dégradation de la kétamine diminuera en fonction de l'âge.

Pour confirmer ou infirmer ces hypothèses nous avons divisé le projet en trois volets:

1. Confirmer la voie métabolique principale de la formation de norkétamine chez le rat, le chien et l'humain. Nous désirons également caractériser l'interaction métabolique entre le midazolam et la kétamine.
2. Évaluer l'impact de l'âge sur le métabolisme hépatique de groupes de rats âgés de 3, 6, 12 et 18 mois.
3. Quantifier la contribution du métabolisme cérébral ainsi qu'évaluer l'impact de l'âge sur le métabolisme cérébral de groupes de rats âgés de 3, 6, 12 et 18 mois (Annexe 1).

Tous ces objectifs se concrétiseront par la détermination des paramètres cinétiques suivant: K_m/V_{max} , $T_{1/2}$ et IC_{50} .

4 - Premier volet

In Vitro Ketamine CYP3A Mediated Metabolism Study using Mammalian Liver S9 Fractions, cDNA Expressed Enzymes and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Raphaël Santamaria, Floriane Pailleux and Francis Beaudry*

Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

*Corresponding author:

Francis Beaudry, Ph.D.

Assistant Professor in analytical pharmacology

Département de Biomédecine Vétérinaire

Faculté de Médecine Vétérinaire

Université de Montréal

3200 Sicotte

Saint-Hyacinthe, QC

Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

Tel (514) 343-6111 ext. 8647

Published in :

Santamaria, R., Pailleux, F. and Beaudry, F. (2014). In vitro ketamine CYP3A-mediated metabolism study using mammalian liver S9 fractions, cDNA expressed enzymes and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 28(12), 1660-1669.

Abstract

Ketamine is widely used in medicine in combination with several benzodiazepines including midazolam. The objectives of this study were to develop a novel HPLC-MS/SRM method capable of quantifying ketamine and norketamine using an isotopic dilution strategy in biological matrices and study the formation of norketamine, the principal metabolite of ketamine with and without the presence of midazolam, a well-known CYP3A substrate. The chromatographic separation was achieved using a Thermo Betasil Phenyl 100 x 2 mm column combined with an isocratic mobile phase composed of acetonitrile, methanol, water and formic acid (60:20:20:0.4) at a flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mass spectrometer was operating in selected reaction monitoring mode and the analytical range was set at 0.05–50 μM . The precision (%CV) and accuracy (%NOM) observed were ranging from 3.9–7.8 and 95.9.2–111.1% respectively. The initial rate of formation of norketamine was determined using various ketamine concentration and K_m values of 18.4 μM , 13.8 μM and 30.8 μM for rat, dog and human liver S9 fractions were observed respectively. The metabolic stability of ketamine on liver S9 fractions was significantly higher in human ($T_{1/2} = 159.4$ min) compared with rat ($T_{1/2} = 12.6$ min) and dog ($T_{1/2} = 7.3$ min) liver S9 fractions. Moreover significantly lower IC_{50} and K_i values observed in human compared with rat and dog liver S9 fractions. Experiments with cDNA expressed CYP3A enzymes showed the formation of norketamine is mediated by CYP3A but results suggest an important contribution from others isoenzymes, most likely CYP2C particularly in rat.

Keywords: Ketamine, Cytochrome P450, CYP3A, Drug Metabolism, Drug-Drug Interactions, Mass Spectrometry, Bioanalysis, Anesthesia

Introduction

Ketamine is a N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist blocking glutamatergic functions, widely used in veterinary medicine in combination with xylazine [Stokes et al., 2009; Veilleux-Lemieux et al. 2012; St-Germain Lavoie et al. 2013] and several benzodiazepines [Hall, 2012; Maruf et al., 2010; Cartwright and Pingel, 1984]. Ketamine is used in concomitance with midazolam for analgesia/sedation of adult and pediatric patients [Wood, 2013; Barkan et al., 2013]. An exhaustive characterization of ketamine metabolism would provide the basis to foster a better understanding of possible drug-drug interactions in mammals in order to prevent treatment failure or adverse effects resulting from possible alterations in drug metabolism when co-administered with other drugs. The impairment of drug metabolism resulting from enzymatic competition and inhibition has severe clinical implications as a result of an increased bioavailability and hampered clearance [Armstrong et al., 2009]. Recent in vitro metabolism studies revealed that ketamine is extensively metabolized to norketamine, dehydronorketamine, and 3-hydroxylated norketamine [Mössner et al. 2011; Kwan and Thormann, 2011]. These studies identified the cytochrome P450 (CYP) enzymes involved in the phase I metabolism of ketamine, principally CYP3A, and to a notably lesser extent CYP2C, CYP2B and CYP2D. Interestingly, historical data has shown that common metabolism by CYP3A enzymes have resulted in numerous clinically significant drug-drug interactions [Ogu and Maxa, 2000]. Thus, to explore possible drug-drug interactions, a comprehensive ketamine metabolism study in liver S9 fractions and cDNA-expressed CYP3A enzymes is required. The liver S9 fraction contains both microsomal and cytosolic fractions enabling the study of phase I and phase II drug metabolism. Liver S9 fraction is widely used as a simple and rapid in vitro method to examine drug metabolism. cDNA-expressed CYP3A enzymes are readily available and will allow to study the very specific metabolic pathway associated with the transformation of ketamine to norketamine, the main metabolite observed in vitro and in vivo [Desta et al., 2012; Capponi et al., 2009].

Midazolam is a sedative drug with anxiolytic and amnesic properties with observed short-acting effects. It is widely used as a premedication in children [Barkan et al., 2013]. Midazolam is primarily metabolized in the liver by the CYP3A (CYP3A4 in human) to its pharmacologic active metabolite, α -hydroxymidazolam [Shimizu et al., 2007]. Moreover, α -hydroxymidazolam potency is comparable with the parent drug and contributes to the overall effect of midazolam. Midazolam is the preferred phenotyping CYP3A4 probe substrate used for in vitro and in vivo studies [Halama et al., 2013; Mooiman et al., 2013]. Co-administration of ketamine and midazolam to animals or humans could lead to competitive inhibition of CYP3A and result in an increase of systemic concentrations. Thus, it may produce significant adverse effects. It is therefore important to assess the potential of metabolic interactions particularly, interaction with CYP3A.

There are some analytical methods available in the literature for the measurement of ketamine and its metabolites in several biological matrices including hair, urine and plasma [Lin et al., 2013; Parkin et al., 2013; Moaddel et al., 2010]. Most of these published methods are used for forensic toxicology studies and they were not adapted, nor validated for metabolism studies. The method selectivity, precision and accuracy are critical in determining metabolic kinetic parameters. The first objective of the current study was to develop a HPLC-MS/SRM method quantifying ketamine and norketamine in liver S9 fraction suspensions using an isotopic dilution strategy. The second objective was to determine the relative substrate affinity for the CYP3A and the metabolic stability of ketamine in rat, dog and human liver S9 fractions. A third objective was to estimate the inhibitory effect of midazolam on ketamine CYP3A metabolism and compare with the preferred CYP3A inhibitor ketoconazole [Bourri  et al., 1996]. Finally, a fourth objective was to confirm inhibition results using cDNA-expressed CYP3A enzymes.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Ketamine, d4-ketamine, norketamine, d4-norketamine and midazolam were obtained in solution from Cerilliant (Round Rock, TX). Ketoconazole (CYP3A inhibitor) was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Other chemicals, including acetonitrile, formic acid, methanol, sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Mammalian liver S9 fractions, cDNA-expressed CYP3A enzymes (SupersomesTM) and NADPH-regenerating system solutions were obtained from BD Biosciences (Woburn, MA, USA). S9 fractions and SupersomesTM were tested for activities with standard testing procedure prior usage.

Quantitative Analytical Methods

The concentrations of ketamine and norketamine were determined using an HPLC-MS/SRM assay. Briefly, 50 μ L of matrix samples (i.e. 0.5 mg/mL liver S9 fraction suspension) were mixed with 250 μ L of deuterated internal standard solution (1 μ M of d4-ketamine and d4-norketamine in acetonitrile) in a 1.5 mL centrifuge tube. The samples were then vortexed vigorously and were allowed to rest for 10 min at room temperature prior to centrifugation. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 μ L of the supernatant was transferred into an injection vial. Two μ L of samples were injected using a Perkin Elmer Series 200 HPLC (Shelton, CT) onto a Thermo Hypersil Phenyl 100 x 2 mm column (5 μ m) with flow rate of 300 μ L/min. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile, methanol, water and formic acid at a ratio of 60:20:20:0.4, respectively. The AB SCIEX API 2000 QTRAP[®] mass spectrometer (Concord, Ontario, Canada) was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The nitrogen gas 1 was set to 25 PSI, the nitrogen gas 2 was set to 45 PSI

and heated at 400°C. The electrospray electrode was set to 5000V. The declustering potential (DP) was set to 25V and the collision energy (CE) was set to 30V. The selected reaction monitoring (SRM) transitions were set to m/z 238.1 → 125.0, 242.1 → 129.0, 224.1 → 125.0 and 228.1 → 129.0 for ketamine, d4-ketamine, norketamine and d4-norketamine respectively. The dwell time was set to 100 msec and the pause time at 5 msec. The analytical range used was ranging from 0.05 to 50 µM. Standard and quality control samples were prepared in liver S9 enzyme suspensions but NADPH-regeneration solution A and B were added after the precipitation with acetonitrile to avoid the degradation of ketamine.

Liver S9 Fraction Incubation

The incubations were performed as previously described [Lavoie et al., 2013] and were performed minimally in triplicate. The incubations were performed in a microcentrifuge tube and contained various concentrations ranging from 1 to 100 µM of ketamine, 0.5 mg/mL of S9 fraction proteins diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Liver S9 enzyme suspensions (total volume of 1 mL) were preincubated with 50 µL of NADPH-regenerating solution A (BD Biosciences Cat. No. 451220), 10 µL of solution B (BD Biosciences Cat. No. 451200), in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 5 min prior fortification with ketamine. Immediately after fortification of ketamine into the liver S9 fraction suspension containing the NADPH-regeneration system, the sampling point for $t = 0$ was taken, and further sampling points were taken at 5, 15, 30, 45 and 60 min for metabolic stability experiments. For the determination of K_m and V_{max} , the concentration of norketamine was determined after 10 min incubation. Fifty µL of samples were taken and mixed with 250 µL of the deuterated internal standard solution (1 µM of d4-ketamine and d4-norketamine in acetonitrile) in a 1.5 mL centrifuge tube. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 µL of the supernatant was transferred into an injection vial for HPLC-MS/SRM analysis.

Similarly, incubation of ketamine in liver S9 fractions at 30 µM with the presence of logarithmic concentrations of midazolam or ketoconazole was performed to determine IC_{50} value. Liver S9 enzyme suspensions were preincubated with the NADPH regeneration system and midazolam or ketoconazole at various concentrations (0.01 µM to 1000 µM) for 5 min at 37°C prior fortification with 30 µM of ketamine. Sampling points at 10 min were taken and 50 µL of samples were mixed with 250 µL of the deuterated internal standard solution (1 µM of d4-ketamine and d4-norketamine in acetonitrile) in a 1.5 mL centrifuge tube. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 µL of the supernatant was transferred into an injection vial for HPLC-MS/SRM analysis.

cDNA Expressed CYP3A Incubation

Incubation of ketamine in cDNA expressed CYP3A at 30 µM with the presence of logarithmic concentrations of midazolam or ketoconazole was used to determine IC_{50} values. cDNA expressed CYP3A enzyme suspensions (20 pmol/mL in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) were preincubated with the

NADPH regeneration system and midazolam or ketoconazole at various concentrations (0.01 μM to 1000 μM) for 5 min at 37°C prior fortification with 30 μM of ketamine. Sampling points at 10 min were taken and 50 μL of samples were mixed with 250 μL of the deuterated internal standard solution (1 μM of d4-ketamine and d4-norketamine in acetonitrile) in a 1.5 mL centrifuge tube. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 μL of the supernatant were transferred into an injection vial for HPLC-MS/SRM analysis.

Data analysis and regression

All non-linear regression analyses were performed with PRISM (6.0c) GraphPad software (La Jolla, CA) using the non-linear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The Michaelis-Menten equation describes the rates of irreversible enzymatic reactions that are generally observed for CYP mediated metabolic reactions. Michaelis-Menten parameters can be estimated by various linearization methods. However, non-linear regression analysis was performed using the Michaelis-Menten equation [Michaelis and Menten, 1913].

$$v_i = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Where the initial velocity (v_i) was determined using equation 2.

$$v_i = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[norketamine]_{10 \text{ min}}}{10 \text{ min}} \quad (2)$$

The initial rate (v_i) was calculated based on the concentration norketamine measured after 10 minutes incubation of ketamine in liver S9 enzyme or SupersomesTM suspensions. Following sample analysis, the analyte/deuterated internal standard peak area ratio was used to determine ketamine and norketamine concentrations at various time points to determine the metabolic stability. All depletion data were fitted to the monoexponential decay model described in equation (3) where $C(t)$ are substrate concentration at time t and C_0 is the initial concentration.

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (3)$$

In vitro half-life was obtained using equation (4):

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (4)$$

Additionally, the enzyme-mediated clearance (CL_{uint}) that would occur without physiological limitations including protein binding or hepatic blood flow was determined using equation (5).

$$CLu_{int} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad (5)$$

IC50 values for the inhibition of the formation of norketamine, the principal hepatic metabolite of ketamine were determined by nonlinear regression analysis using the following equation (6).

$$V_i = V_{i\ min} + \left(\frac{V_{i\ max} - V_{i\ min}}{1 + 10^{(\log[I] - \log IC_{50})}} \right) \quad (6)$$

Results and Discussion

Tandem Mass Spectrometry

Precursor ion and product ion mass spectra for ketamine, norketamine and deuterated analog internal standards were obtained in positive ion mode. The precursor ion spectra of ketamine and norketamine showed an intense signal for the protonated molecular ion ([M+H]⁺) at m/z 238 and m/z 224, respectively (Fig. 1A and Fig 1B). Precursor ions detected for d4-ketamine and d4-norketamine were m/z 242 and m/z 228 respectively (data not shown). The product ion spectrum of ketamine has predominant fragment ions at m/z 125, m/z 163 and m/z 179 (Fig. 1C). The product ion spectrum of norketamine has predominant fragment ions at m/z 125 and m/z 179 (Fig. 1D). The deuterated analog internal standards showed an intense fragment ion at m/z 129 compatible with the introduction of deuterium atoms on the benzene ring (data not shown). The mass transition in SRM mode was set for best sensitivity and selectivity at m/z 238 → 125, 242 → 129, 224 → 125 and 228 → 129 for ketamine, d4-ketamine, norketamine and d4-norketamine respectively. As illustrated in Fig. 1C and Fig. 1D, the product ion spectra were compatible with the molecular structures. The limit of detection, defined as being the quantity of analyte required to obtain 3-5 times the signal-to-noise ratio response, was established at 5 pg injected on column for both analytes using the SCIEX API 2000 QTRAP® equipped with a Turbo IonSpray™ source.

Calibration Curve Analysis

A linear regression (weighted 1/concentration) produced the best fit for the concentration–detector relationship. The regression model used was determined using the sum of the squares of the deviations [Beaudry, 1999]. By convention, the regression line is considered to properly fit the calibration set when the sum of squares of the deviations is minimized. The calculated coefficients of correlation (r) were better than 0.998 for an analytical range set from 0.05 to 50 μM in liver S9 enzyme suspensions.

Precision and Accuracy

The reproducibility of the method was evaluated by analyzing twelve replicates of liver S9 enzyme suspension samples fortified with ketamine and norketamine at the nominal concentration of 0.1, 1 and 50 μM. The precision and accuracy results are displayed in Table 1. The results obtained demonstrate that acceptable precision and accuracy results were achieved and were compatible with generally accepted

criteria in bioanalysis (CDER and CVM, 2001). A representative chromatogram of LOQ samples is shown in Fig. 2. As illustrated in Fig 2., extracted blank liver S9 fraction did not show any interference from endogenous substances at the mass transition monitored for ketamine and norketamine. Moreover, the signal-to-noise ratio of the LOQ sample was above 10:1 with a significant number of points to adequately determine peak area allowing the quantification these two analytes with acceptable figure of merits for a metabolism study. This analytical method was also successfully adapted for analysis in rat plasma.

Determination of the apparent Michaelis constant K_m and V_{max}

The effect of substrate concentration on the initial rate (V_i) of an enzyme-catalyzed reaction is a fundamental concept in enzyme kinetics. The Michaelis constant K_m of an enzyme represents the substrate concentration at which the reaction occurs at half of the maximum rate. K_m is an indicator of the affinity that an enzyme has for a particular substrate, and hence the stability of the enzyme-substrate complex. Low K_m value may suggest that enzyme has a greater affinity for substrate and vice-versa. To adequately determine the value of the apparent Michaelis-Menten constant K_m as well as the maximum rate achieved by the system (V_{max}), the data were fitted with the Michaelis-Menten equation (1). The initial rate (V_i) was calculated using the equation (2) and concentrations of norketamine were determined after 10 min ketamine incubation in liver S9 fraction suspensions by HPLC-MS/SRM. Figure 3 shows results coherent with a kinetics following a Michaelis-Menten enzymatic reaction for all three species. The derived results from the regression analyses suggest K_m values of 18.4 (+/- 2.3) μM , 13.8 (+/- 1.5) μM and 30.8 (+/- 7.1) μM for rat, dog and human liver S9 fractions respectively. It has been previously determined that the formation of norketamine is mainly mediated by CYP3A but other CYP enzymes are involved into the metabolism of ketamine [Mössner et al. 2011; Kwan and Thormann, 2011]. There is a two-fold difference between the apparent K_m values observed in animal liver S9 fractions compared with human liver S9 fractions. This is interesting since K_m is an indicator of the stability of the enzyme-substrate complex. A lower K_m may indicate that the substrate might be less susceptible to competitive inhibition in animal species compared with human. This is interesting since hepatic drug clearance depend on hepatic blood flow rate but also on the extraction coefficient. The extraction coefficient will be altered in the context of competitive inhibition and will significantly impact drug exposition. These early results may suggest that CYP3A mediated ketamine metabolism will be less susceptible to competitive inhibition in rat and dog compared to human.

Ketamine metabolic stability evaluations in mammalian liver S9 fractions

Metabolism is a key element of drug clearance and it directly influences the systemic drug exposure. Ketamine metabolic stability at 5 μM ($[S] < K_m$) was evaluated in rat, dog and human liver S9 fractions. The data presented in Fig. 4 were fitted with a mono-exponential decay model as described in equation

(3) and the coefficients of determination (R^2) were comprised between 0.88 and 0.99 for each fitted data series, suggesting that ketamine first-order kinetics was observed and the condition of the model was met [Masimirembwa et al., 2001]. The in vitro $T_{1/2}$ derived were 12.6 (\pm 0.4) min, 7.3 (\pm 1.0) min and 159.4 (\pm 29.8) min in rat, dog and human liver S9 fractions respectively. There is an important discrepancy between the metabolic fate observed in human liver S9 fractions compared to rat and dog liver S9 fractions. If the in vitro difference observed translate in vivo, drug exposition will therefore be considerably different between species. Presently the pharmacokinetic data available from the literature are difficult to compare since dose, formulation, route of administration and regiment are inconsistent. Thus, we are unable to make a thoughtful comparison with our in vitro results. However, in all species, total clearance observed is relatively high but the terminal half-life is longer in human compared to rodents [Clements et al., 1982; Veilleux-Lemieux et al. 2013]. During the elimination phase, the plasma concentration is specifically linked with the elimination of ketamine from the body and the elimination is then considered independent of the amount of drug remaining. Consequently, the difference in terminal half-life observed in vivo is compatible with our in vitro results despite their dissimilarity. The derived intrinsic clearance (CL_{int}) data presented in Table 2 suggest that the extent of ketamine CYP3A metabolism is reduced extensively in human liver S9 fractions compared to rat and dog liver S9 fractions suggesting that ketamine exposition in human could be significantly higher using an equivalent dose, formulation and route of administration. However, there are various elements affecting drug elimination other than liver phase 1 metabolism.

Evaluation of the effect of midazolam and ketoconazole on ketamine CYP3A mediated metabolism

Ketamine-midazolam is amongst the most frequently used anesthetic mixtures used in veterinary and human medicine. Interestingly, children patients receiving intravenous ketamine with midazolam for sedation show more pronounced adverse effects with patients younger than 10 years [Wathen et al., 2000]. Dosing infants and children is impeded by a general lack of knowledge about drug bioavailability and disposition in this specific population particularly when concomitant drugs are used as anesthetic mixtures. In a previous study [Lavoie et al., 2013], we demonstrated that CYP3A xylazine metabolism was hampered by ketamine and ketoconazole in rat liver microsomes. The ketamine-xylazine combination is also commonly used and the impairment of drug metabolism resulting from enzymatic competitive inhibition may have severe clinical implications as a result of an increased bioavailability and hampered clearance [Lavoie et al., 2013; Veilleux-Lemieux et al., 2012]. In vitro metabolism studies revealed that the principal hepatic metabolite of ketamine was norketamine and the formation was principally catalyzed by CYP3A [Mössner et al. 2011; Kwan and Thormann, 2011]. Hence, midazolam is a well-characterized CYP3A substrate used for in vitro and in vivo metabolism studies [Halama et al., 2013; Mooiman et al., 2013]. One objective was to verify if midazolam could affect ketamine metabolism in rat, dog and human S9 liver fractions. As displayed in Figure 5 A, C and E, the determinations of

midazolam IC₅₀ suggest that indeed, midazolam can inhibit the formation of norketamine, the main metabolite of ketamine. Moreover, as shown in Table 2, the calculated inhibition constant (K_i) suggest that midazolam inhibition was notably more important in human liver S9 fractions compared with rat and dog liver S9 fractions. This observation was also compatible with data obtained for cDNA expressed CYP3A enzymes as illustrated in Fig. 6 A, C and E. Also, the Fig. 5 A, C and E revealed that midazolam can completely inhibit the formation of norketamine at concentrations beyond IC₅₀. However, as shown in Fig. 5 B, D and F, ketoconazole, a well established CYP3A inhibitor, did not completely inhibit the formation of norketamine even at concentrations considerably higher than IC₅₀. These results are compatible with a previous ketamine metabolism study performed with canine, equine and human liver microsomes [Mössner et al. 2011]. Additional experiments were conducted using cDNA expressed CYP3A enzymes and results shown in Fig.6 demonstrate that midazolam and ketoconazole were able to completely inhibit the formation of norketamine. This is an interesting result suggesting that the formation of norketamine in liver S9 fractions is not only mediated by CYP3A. Midazolam metabolism is primarily mediated by CYP3A, but a non-negligible CYP2C contribution was shown in recent studies [van Waterschoot et al. 2008]. Remarkably, the relative concentrations of individual P450 enzymes are different between rat and human favoring CYP2C in rat. This may explain why ketoconazole did not completely inhibit the formation of norketamine, particularly in rat liver S9 fractions where the rate of norketamine formation was still very high but midazolam was able to inhibit completely the formation of norketamine. Besides, derived K_i values suggest that ketoconazole is a much stronger inhibitor of CYP3A metabolism compared to midazolam, particularly in human liver S9 fractions and cDNA express human CYP3A4.

Mutual competitive inhibition caused by co-administration of drugs, may contribute to improve bioavailability in certain cases and this is one major reason the concomitant administration of ketamine and midazolam is an effective method for sedation and analgesia. A recent study demonstrated that combined ketamine-midazolam provided better results than midazolam alone for sedation of young children [Moreira et al., 2013]. But, children patients younger than 10 years receiving intravenous ketamine along with midazolam display more pronounced adverse effects [Wathen et al., 2000]. Drug-drug interactions have become an important issue in health care and concomitant drug administration is widely recognized to be a major cause. It is just in the last decade that evidences of major pharmacokinetic interactions between drugs were shown to be associated to hepatic CYP enzymatic metabolism interactions and more specifically, resulting from competitive inhibition. Drug-drug interactions may have severe consequences particularly anesthetized patients due to hemodynamic effects of anesthetic drugs and reduced renal clearance. Anaesthetic protocols in veterinary and human medicine often use multiple drugs to obtain the desired level of sedation and anesthesia. It is therefore important to investigate potential metabolism interactions since only limited data are available in specific patient

subpopulations and animals. Genetic polymorphism of CYP3A and CYP2C may also contribute to aggravate drug-drug interactions in subpopulations and very little data on animal genetic polymorphism exist. Our results clearly demonstrate interactions between ketamine and midazolam metabolism. It is important to denote that our results show that midazolam has significantly more inhibitory effects on ketamine metabolism in human liver S9 fractions. This may explain the reason the administration of ketamine and midazolam in adult patient is considered very safe but more adverse effects were observed in young children.

Conclusion

A novel high-performance liquid chromatographic-mass spectrometry SRM method was developed to quantify ketamine and norketamine. The novel method meets all requirements of specificity, sensitivity, linearity, precision and accuracy generally accepted in bioanalytical chemistry (CDER and CVM, 2001). In vitro metabolism studies were performed in rat, dog and human liver S9 fractions and cDNA expressed CYP3A enzymes. The data presented in this manuscript revealed that ketamine has a low affinity for CYP3A particularly in human liver S9 fractions. The metabolic stability of ketamine on liver S9 fractions was significantly higher in human liver S9 fractions compared with rat and dog liver S9 fractions. This result may suggest that concomitant administration of ketamine with other drugs in human appear to be more susceptible to drug-drug interactions. This is confirmed with significantly lower IC₅₀ and K_i values observed in human compared with rat and dog liver S9 fractions. Further experiments with ketamine, midazolam and ketoconazole strongly supported that the metabolism of ketamine to its main metabolite norketamine is mediated by CYP3A in rat, dog and human liver S9 fractions. Although, results also suggest the contribution of other isoforms, most likely CYP2C. The involvement of CYP3A and CYP2C in ketamine metabolism suggest that further pharmacokinetic studies in subpopulations would be required to assure a more define, predictable potency and a better control of side effects particularly in the context of concomitant administration of ketamine. Dose adjustments might be required when using ketamine with other analgesic, anesthetic and/or sedative drugs to avoid potential undesired drug-drug interactions.

Acknowledgments

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. 386637-2010). R. Santamaria received a scholarship from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC-USRA Program). F. Pailleux received a scholarship from the Coopération et Mobilité Internationales Rhône-Alpes (CMIRA Explora'doc 2011 and 2013).

References

Armstrong SC, Wynn GH, Sandson NB. Pharmacokinetic drug interactions of synthetic opiate analgesics. *Psychosomatics*. 2009;50(2):169-176.

Barkan S, Breitbart R, Brenner-Zada G, Feldon M, Assa A, Toledano M, Berkovitch S, Shavit I, Kozer E. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of oral midazolam plus oral ketamine for sedation of children during laceration repair. *Emergency Medicine Journal*. 2013. doi:10.1136/emmermed-2012-202189.

Beaudry F. Statistical evaluation of linearity and non linearity of LC/MS/MS quantitation analysis. *Pharmaceutical Science*. 1999;1(4): 2437.

Bourrié M, Meunier V, Berger Y, Fabre G. Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1996;277:321-332.

Capponi L, Schmitz A, Thormann W, Theurillat R, Mevissen M. In vitro evaluation of differences in phase I metabolism of ketamine and other analgesics among humans, horses, and dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 2009;70(6):777-786

Cartwright PD and Pingel SM. Midazolam and diazepam in ketamine anaesthesia. *Anaesthesia*. 1984;39:439-442.

CDER and CVM. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine, May 2001. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.

Clements JA, Nimmo WS, Grant IS. Bioavailability, pharmacokinetics, and analgesic activity of ketamine in humans. *Journal of Pharmaceutical Science*. 1982;71(5):539-542.

Destá Z, Moaddel R, Ogburn ET, Xu C, Ramamoorthy A, Venkata SL, Sanghvi M, Goldberg ME, Torjman MC, Wainer IW. Stereoselective and regiospecific hydroxylation of ketamine and norketamine. *Xenobiotica*. 2012;42(11):1076-1087.

Halama B, Hohmann N, Burhenne J, Weiss J, Mikus G, Haefeli WE. A nanogram dose of the CYP3A probe substrate midazolam to evaluate drug interactions. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2013;93(6):564-571.

Hall RW. Anesthesia and analgesia in the NICU. *Clinics in Perinatology*. 2012;39(1):239-254.

Kwan HY and Thormann W. Enantioselective capillary electrophoresis for the assessment of CYP3A4-mediated ketamine demethylation and inhibition in vitro. *Electrophoresis*. 2011;32(19):2738-2745.

Lavoie DS, Pailleux F, Vachon P, Beaudry F. Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(7):882-888.

Lin HR, Choi KI, Lin TC, Hu A. Simultaneous quantification of amphetamine, opiates, ketamine and relative metabolites in urine for confirmatory analysis by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2013;929:133-141.

Moaddel R, Venkata SL, Tanga MJ, Bupp JE, Green CE, Iyer L, Furimsky A, Goldberg ME, Torjman MC, Wainer IW. A parallel chiral-achiral liquid chromatographic method for the determination of the stereoisomers of ketamine and ketamine metabolites in the plasma and urine of patients with complex regional pain syndrome. *Talanta*. 2010;82(5):1892-1904

Maruf AA, Hossain MD, Ahmed M, Samsad IA. Procedural sedation in children for magnetic resonance imaging--comparison between ketamine diazepam combination with midazolam fentanyl combination. *Mymensingh Medical Journal*. 2010;19(1):60-65.

Masimirembwa CM, Thompson R and Andersson TB. In vitro high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 2001; 4: 245-263.

Michaelis L and Menten ML. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 1913; 49:334-336.

Mooiman KD, Maas-Bakker RF, Rosing H, Beijnen JH, Schellens JH, Meijerman I. Development and validation of a LC-MS/MS method for the in vitro analysis of 1-hydroxymidazolam in human liver

microsomes: application for determining CYP3A4 inhibition in complex matrix mixtures. *Biomedical Chromatography*. 2013;27(9):1107-1116.

Moreira TA, Costa PS, Costa LR, Jesus-França CM, Antunes DE, Gomes HS, Neto OA. Combined oral midazolam-ketamine better than midazolam alone for sedation of young children: a randomized controlled trial. *International journal of paediatric dentistry*. 2013;23(3):207-215.

Mössner LD, Schmitz A, Theurillat R, Thormann W, Mevissen M. Inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in ketamine metabolism by use of liver microsomes and specific cytochrome P450 enzymes from horses, dogs, and humans. *American Journal of Veterinary Research*. 2011;72(11):1505-1513.

Ogu CC, Maxa JL. Drug interactions due to cytochrome P450. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 2000;13(4):421-423.

Parkin MC, Longmoore AM, Turfus SC, Braithwaite RA, Cowan DA, Elliott S, Kicman AT. Detection of ketamine and its metabolites in human hair using an integrated nanoflow liquid chromatography column and electrospray emitter fritted with a single porous 10 µm bead. *Journal of Chromatography A*. 2013;1277:1-6.

Shimizu M, Uno T, Tamura HO, Kanazawa H, Murakami I, Sugawara K, Tateishi T. A developed determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: application of human pharmacokinetic study for measurement of CYP3A activity. *Journal of Chromatography B*. 2007;847(2):275-281.

Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Laboratory Animal*. 2009;43(2):149-154.

van Waterschoot RA, van Herwaarden AE, Lagas JS, Sparidans RW, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, Goldstein JA, Zeldin DC, Beijnen JH, Schinkel AH. Midazolam metabolism in cytochrome P450 3A knockout mice can be attributed to up-regulated CYP2C enzymes. *Molecular Pharmacology*. 2008;73(3):1029-1036.

Veilleux-Lemieux D, Beaudry F, Hélie P and Vachon P, Effects of endotoxemia on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketamine and xylazine anesthesia in Sprague–Dawley rats. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2012;3:99-109.

Wood M. The use of intravenous midazolam and ketamine in paediatric dental sedation. SAAD Digest. 2013;29:18-30.

Wathen JE, Roback MG, Mackenzie T, Bothner JP. Does midazolam alter the clinical effects of intravenous ketamine sedation in children? A double-blind, randomized, controlled, emergency department trial. Annals of emergency medicine journal. 2000;36(6):579-588.

Table 1. Determination of the precision and accuracy for the analysis of ketamine and norketamine in S9 liver fractions¹ by HPLC-MS/MRM

		Concentration (μM)		
		0.1	1	50
Intra-assay precision and accuracy (Run 1)				
Ketamine				
n		4	4	4
Mean		0.113	1.10	47.2
SD		0.0101	0.125	2.21
% NOM		112.9%	109.9%	94.4%
% CV		9.0%	11.3%	4.7%
Norketamine				
n		4	4	4
Mean		0.111	1.13	48.1
SD		0.00856	0.104	2.33
% NOM		111.0%	112.5%	96.1%
% CV		7.7%	9.2%	4.8%
Intra-assay precision and accuracy (Run 2)				
Ketamine				
n		4	4	4
Mean		0.111	1.12	47.9
SD		0.00945	0.0888	1.34
% NOM		111.1%	112.2%	95.7%
% CV		8.5%	7.9%	2.8%
Norketamine				
n		4	4	4
Mean		0.110	1.11	48.2
SD		0.00893	0.0749	1.35
% NOM		109.8%	110.9%	96.4%
% CV		8.1%	6.8%	2.8%
Intra-assay precision and accuracy (Run 3)				
Ketamine				
n		4	4	4
Mean		0.109	1.08	48.8
SD		0.00608	0.0518	2.02
% NOM		109.4%	108.5%	97.6%
% CV		5.6%	4.8%	4.1%
Norketamine				
n		4	4	4
Mean		0.106	1.09	48.3
SD		0.00207	0.0522	3.47
% NOM		105.9%	109.2%	96.6%
% CV		2.0%	4.8%	7.2%

		Inter-assay precision and accuracy		
Ketamine				
	n	12	12	12
	Mean	0.111	1.10	48.0
	SD	0.00803	0.0859	1.85
	% NOM	111.1 %	110.2 %	95.9 %
	% CV	7.2 %	7.8 %	3.9 %
Norketamine				
	n	12	12	12
	Mean	0.109	1.11	48.2
	SD	0.00694	0.0735	2.30
	% NOM	108.9 %	110.9 %	96.4 %
	% CV	6.4 %	6.6 %	4.8 %

¹ Precision and accuracy evaluations were performed using rat S9 fraction supernatant.

Table 2. Kinetic parameters associated with the formation norketamine in liver S9 fractions and cDNA express CYP3A enzymes.

	V_{max} nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	K_m μM (nmol mL ⁻¹)	CLu _{int}	IC ₅₀ ¹ Midazolam	K_i ²	IC ₅₀ ¹ Ketoconazole	K_i ²
Rat liver S9	3.16(±0.13)	18.4(±2.3)	0.172	33.4(±1.6)	12.7	9.9(±1.5)	3.8
Dog liver S9	2.05(±0.07)	13.8 (±1.5)	0.149	46.6(±1.5)	14.7	1.42(±0.18)	0.45
Human liver S9	0.39 (±0.04)	30.8 (±7.1)	0.013	9.4(±0.6)	4.8	0.43(±0.15)	0.22
		Rat cDNA CYP3A1		19.3(±0.3)		8.9(±0.9)	
		Rat cDNA CYP3A2		24.5(±0.9)		7.3(±1.0)	
		Dog cDNA CYP3A12		35.3(±2.6)		0.90(±0.22)	
		Human cDNA CYP3A4		5.4(±0.9)		0.23(±0.10)	

¹ The substrate concentration was 30μM

² Determination of K_i was based in this formula:
$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Figure legends

Figure 1. Precursor (MS) and product ion spectra (MS2) of ketamine (A and C) and norketamine (B and D).

Figure 2. HPLC-MS/SRM analysis of ketamine and norketamine in liver S9 fractions. Overlay SRM extracted ion chromatograms of a reference (ref), a blank sample (black) and an extracted liver S9 fraction LOQ samples (blue) for ketamine (A) and norketamine (B).

Figure 3. Determination of Michaelis constant K_m and maximum velocity V_{max} using non-linear regression fitting. Each point represents the mean (\pm SD) of triplicate experiments.

Figure 4. Depletion profile of ketamine in rat, dog and human liver S9 fractions rat at 5 μ M. Data presented on a linear scale and each point represents the mean (\pm SD) of triplicate experiments.

Figure 5. Determination of the inhibitory concentration 50% (IC50) of midazolam and ketoconazole on the formation of norketamine in rat (A and B), dog (C and D) and human (E and F) liver S9 fractions. Each point represents mean (\pm SD) of triplicate experiments.

Figure 6. Determination of the inhibitory concentration 50% (IC50) of midazolam and ketoconazole on the formation of norketamine in cDNA express rat CYP3A1 and CYP3A2 (A and B), dog CYP3A12 (C and D) and human CYP3A4 (E and F). Each point represents mean (\pm SD) of triplicate experiments.

Figure 1.

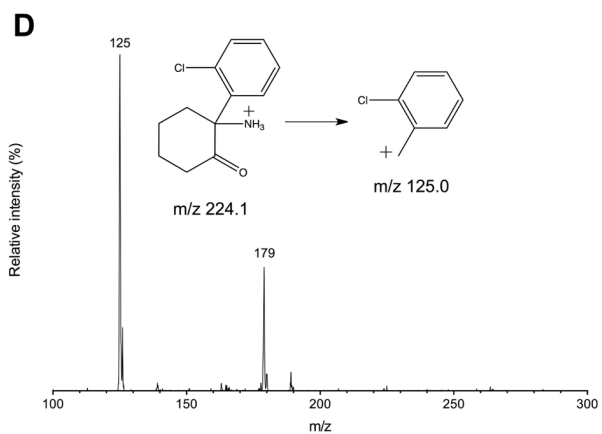
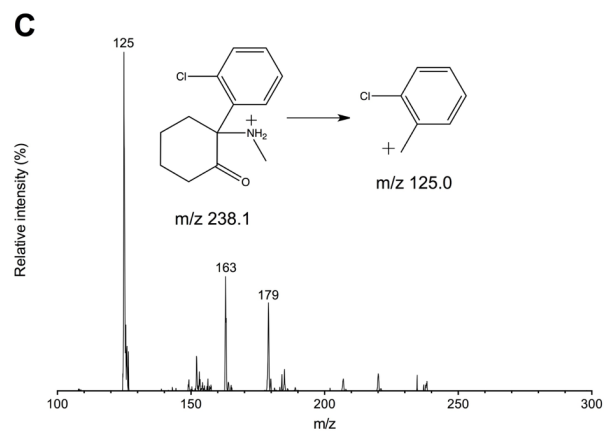
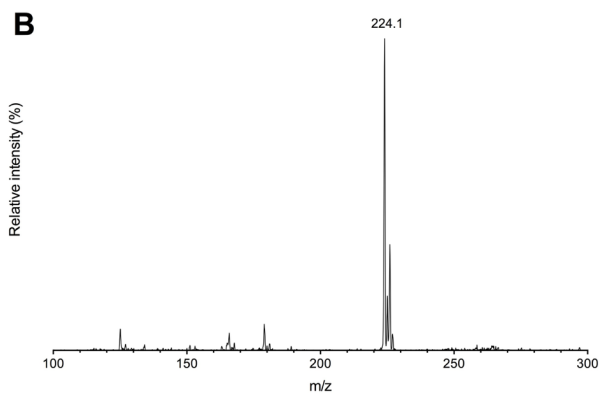
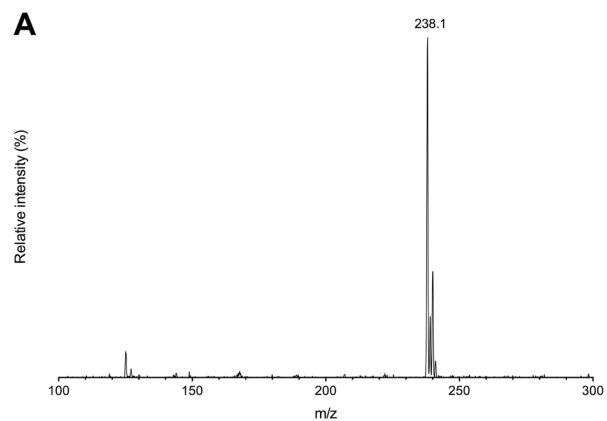


Figure 2.

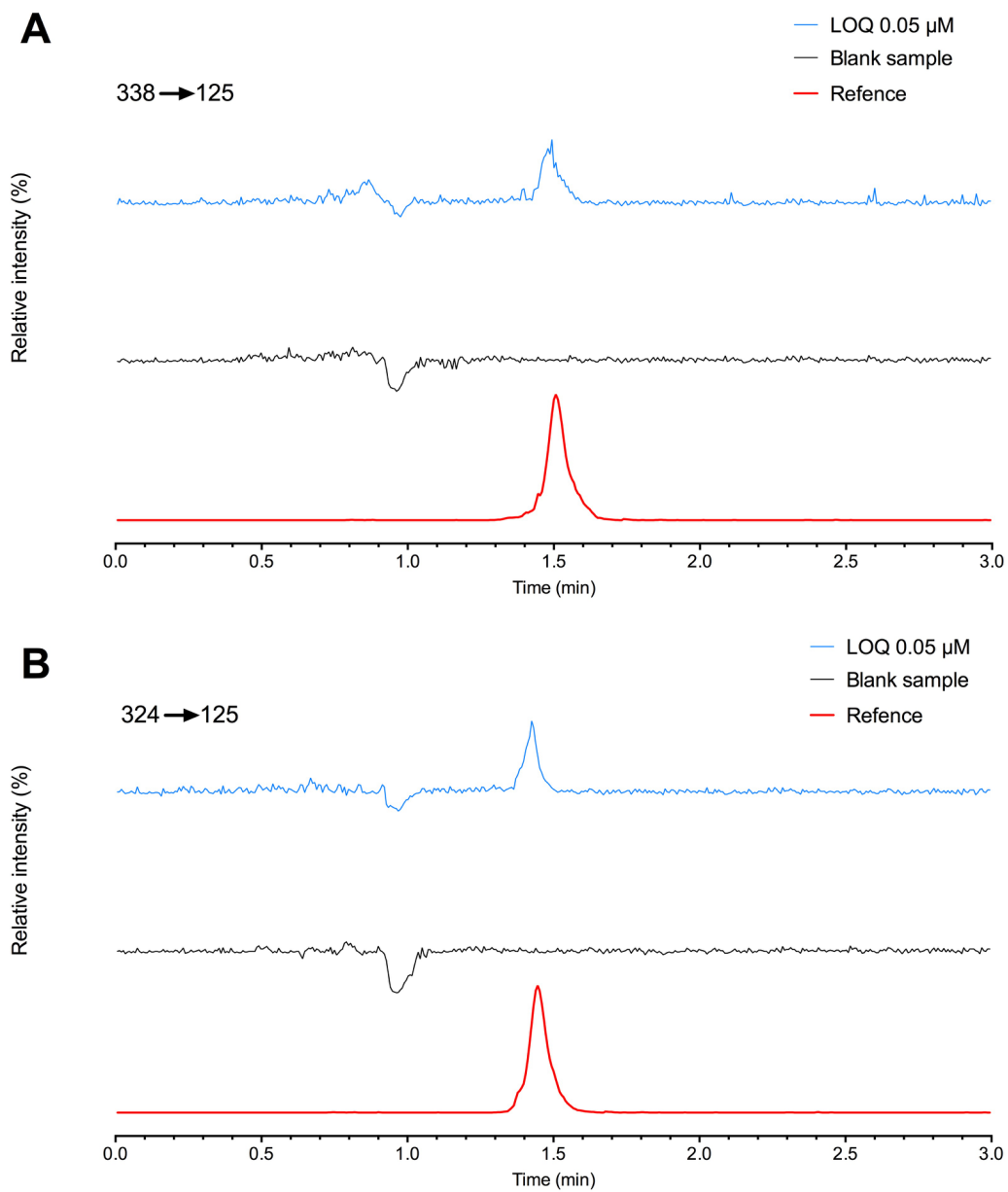


Figure 3.

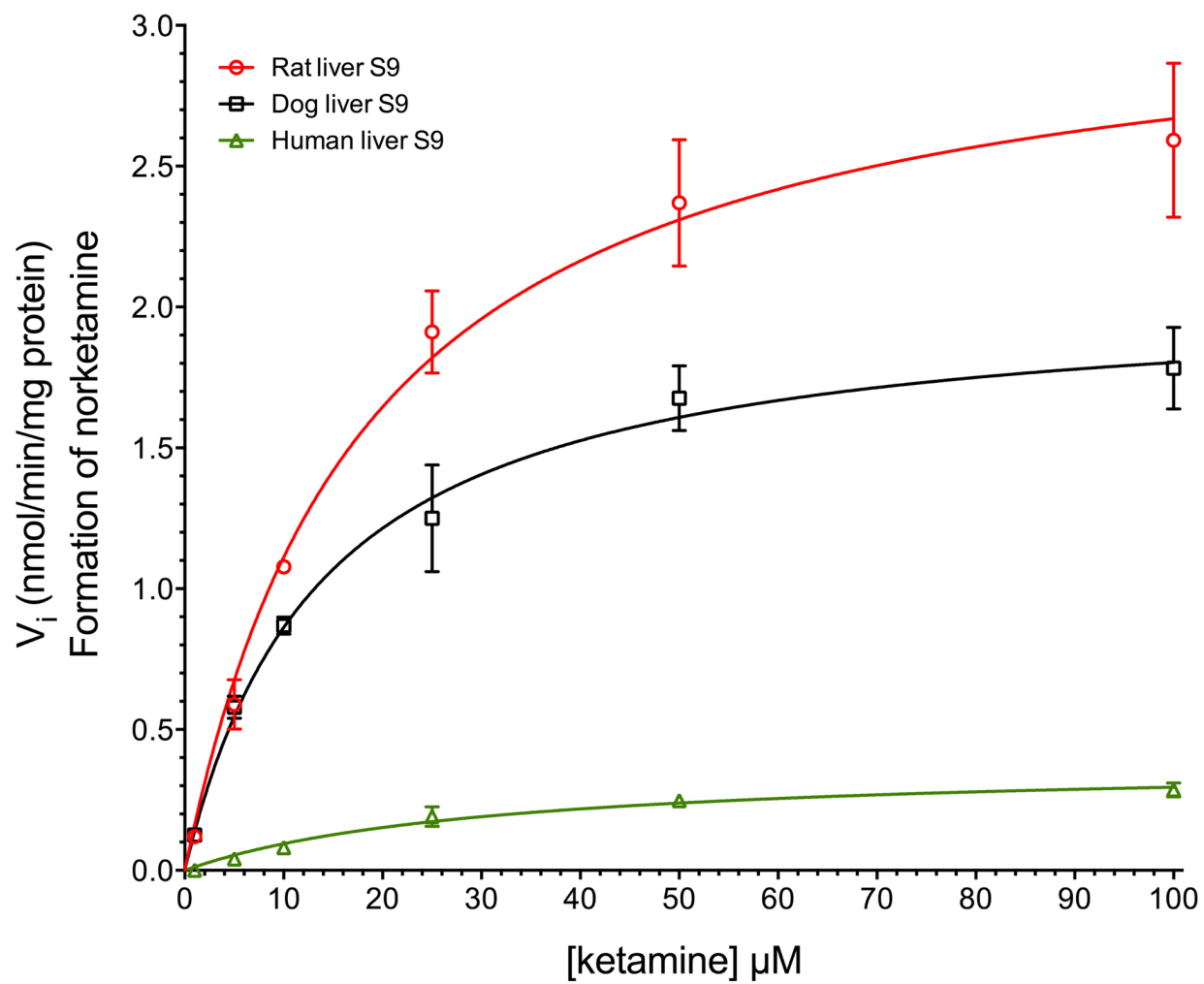


Figure 4.

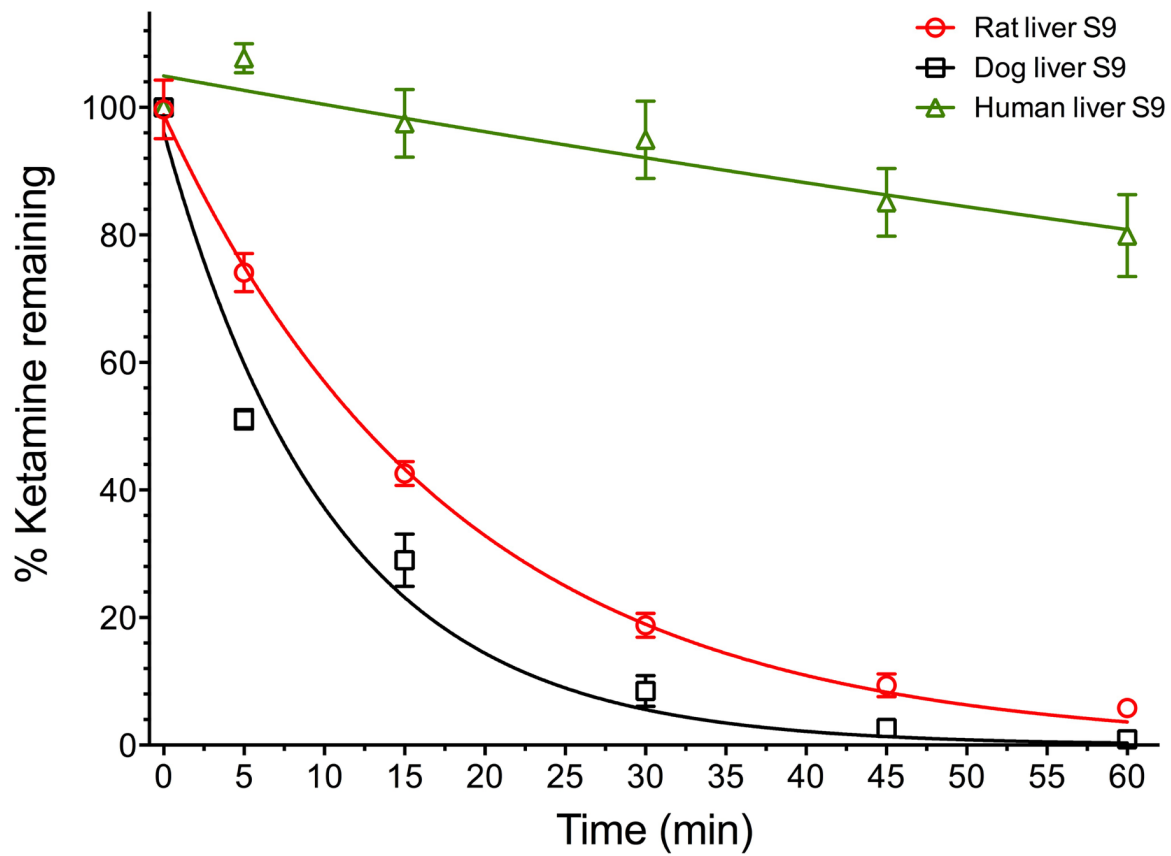


Figure 5.

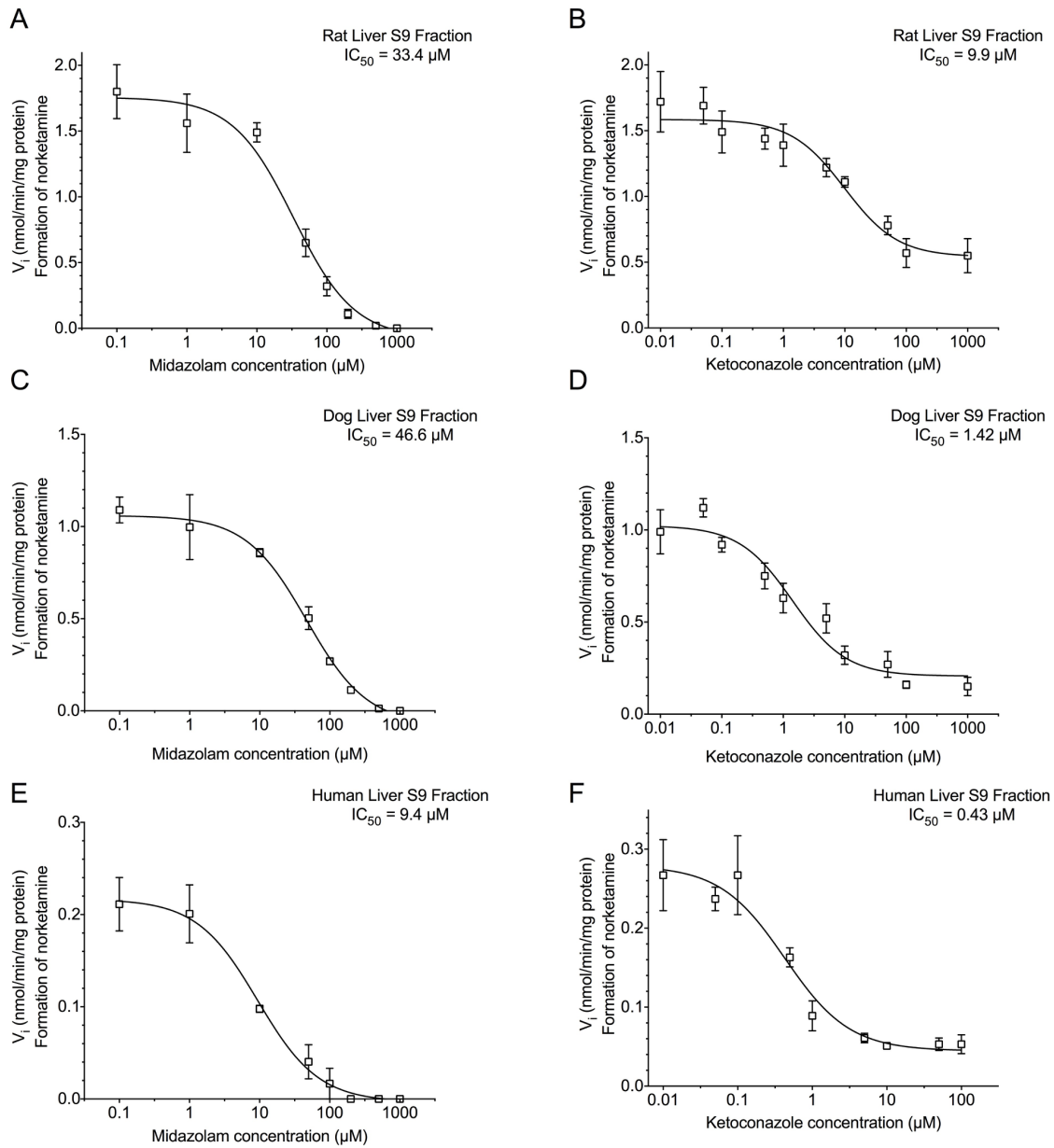
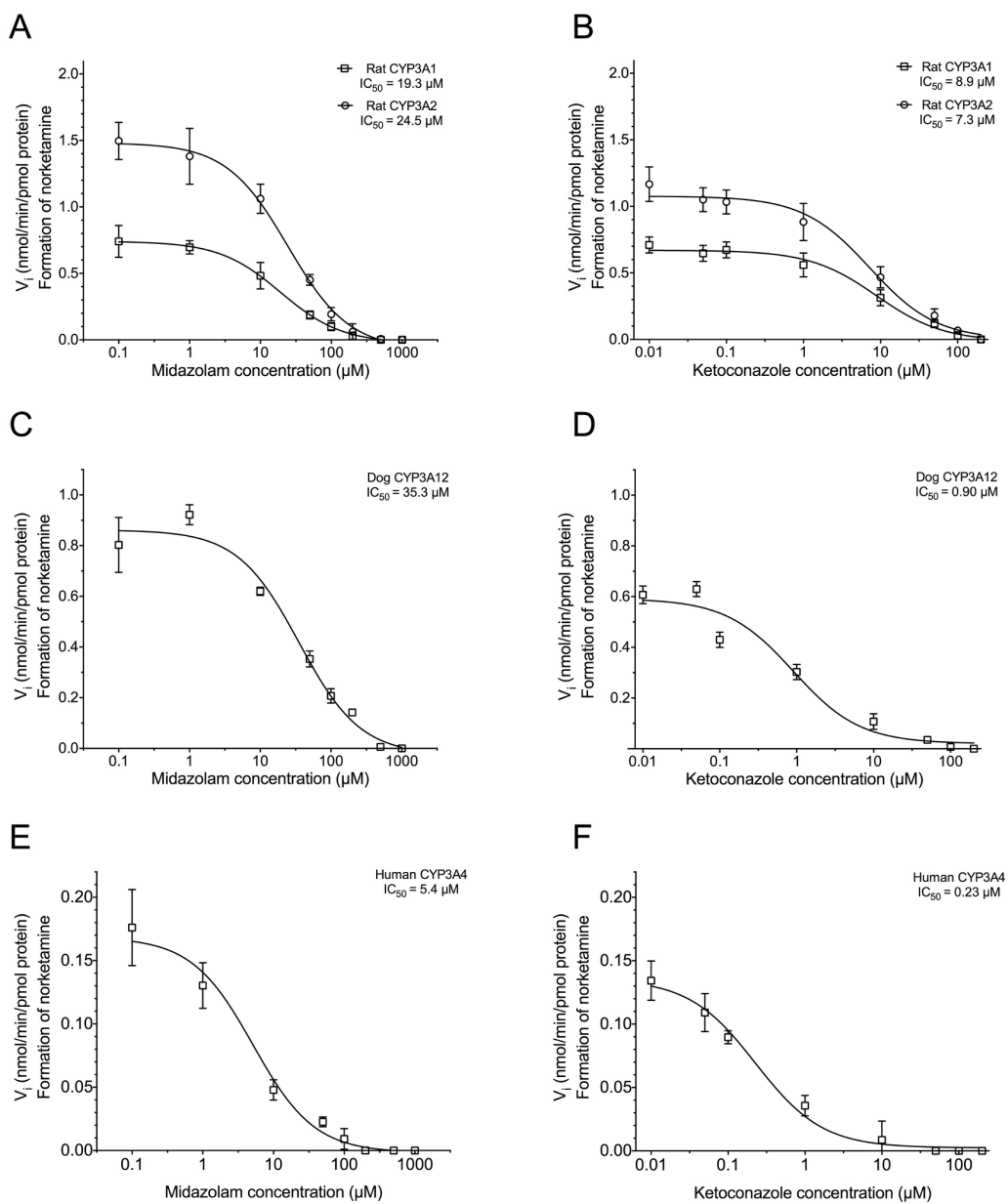


Figure 6.



5 - Deuxième volet

CYP3A Mediated Ketamine Metabolism is Severely Impaired in Liver S9 Fractions from Aging Sprague Dawley Rats

Raphaël Santamaria¹, Marie-Chantal Giroux², Pascal Vachon^{2,3} and Francis Beaudry¹

¹ Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

² Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

³ Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

*Corresponding author:

Francis Beaudry, Ph.D.
Associate Professor in analytical pharmacology
Département de Biomédecine Vétérinaire
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal
3200 Sicotte
Saint-Hyacinthe, QC
Canada J2S 2M2

Email: francis.beaudry@umontreal.ca

Tel (514) 343-6111 ext. 8647

Published in :

Santamaria, R., Giroux, M. C., Vachon, P. and Beaudry, F. (2015). CYP3A Mediated Ketamine Metabolism is Severely Impaired in Liver S9 Fractions from Aging Sprague Dawley Rats. arXiv preprint arXiv:1509.07786.

Abstract

Ketamine is widely used in veterinary medicine and in medicine. Ketamine is metabolized to its active metabolite norketamine principally by liver CYP3A. Drug metabolism alterations during aging have severe consequences particularly in anesthesiology and very few studies on older animals were conducted for ketamine. The objective of the present study is to assess the influence of aging on CYP3A metabolism of ketamine. Liver S9 fractions from 3, 6, 12 and 18 month old male Sprague Dawley rats were prepared and Michaelis-Menten parameters were determined for primary metabolic pathways. The derived maximum enzyme velocity (i.e. V_{max}) suggests a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites in liver S9 fractions of 18-month old rats. Observed V_{max} for Liver S9 fractions from 3, 6 and 12 month old male Sprague Dawley rats were 2.39 (± 0.23), 2.61 (± 0.18), and 2.07 (± 0.07) respectively compared to 0.68 (± 0.02) for Liver S9 fractions from 18 month old male Sprague Dawley rats. Interestingly, we observed a 6 to 7 fold change in the derived K_m when comparing Liver S9 fractions from 18 month old male Sprague Dawley rats with Liver S9 fractions from younger rats. Our results suggest that rat CYP3A enzyme undergoes conformational changes with age particularly in our geriatric group (e.g. 18 month rats) leading significant decrease in the rate of formation of norketamine. Moreover, our results strongly suggest a severe impairment of CYP3A ketamine mediated metabolism.

Keywords: Ketamine, Geriatrics, Midazolam, Cytochrome P450, Michaelis-Menten, Drug Metabolism, Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Introduction

In recent years, the improvements in medicine, and life style changes, have increased life expectancy and consequently there is a significant increase of geriatric patients needing medical and pharmacological treatments. A very large proportion of marketed drugs were not thoroughly tested in pediatric and geriatric patients and this has led to numerous medical complications [Richardson *et al.*, 2014; Crentsil *et al.*, 2014; Hines, 2013]. Older patients certainly have more risks of suffering from adverse drug effects which may be associated with a decreased clearance (CL) caused by physiologic changes associated with aging [Meziere *et al.*, 2013; Woodhouse & Wynne, 1988]. Additionally, other studies show a significant increase of terminal half-life ($T_{1/2}$) of many drugs related to aging [Iirola *et al.*, 2012; Shi and Klotz, 2011] leading to important differences in pharmacokinetic profiles [Veilleux-Lemieux *et al.*, 2013]. Pharmacokinetic and drug metabolism alterations during aging have severe consequences particularly in anesthesiology [Meziere *et al.*, 2013]. Geriatric surgeries in animal and human are often avoided when possible since adverse effects could lead to serious consequences including death.

Recently, we performed an exhaustive comparison of ketamine and xylazine pharmacokinetics and pharmacodynamics using 3, 6, 12 and 18 month old male Sprague Dawley rats and observed significant differences in drug exposition (AUC), terminal half-life ($T_{1/2}$) and clearance (CL) in 12 and 18 months old rats [Giroux *et al.*, 2015]. Pharmacokinetic parameters ($T_{1/2}$ and AUC) significantly increased and drug CL significantly decreased with aging and these observations correlated with physiological results (anesthesia duration, reflexes, cardiac and respiratory frequencies and oxygen saturation). As shown in Figure 1, ketamine is metabolized primarily by the liver to an active metabolite, norketamine and it is excreted in the urine [Meyer and Fish, 2008]. In our previous study using rat liver S9 fractions and cDNA CYP3A1 and CYP3A2 expressed enzymes, we demonstrated that ketamine is a substrate of CYP3A (i.e. CYP3A1 and CYP3A2) [Santamaria *et al.*, 2014]. The significant increase of $T_{1/2}$ and decrease of CL observed *in vivo* could possibly be associated with hampered CYP450 liver enzymes, which requires further investigation.

The objective of the present study is to assess the influence of aging on CYP3A metabolism of ketamine. Liver S9 fractions from 3, 6, 12 and 18 month old male Sprague Dawley rats were prepared and Michaelis-Menten parameters were determined for primary metabolic pathways. Midazolam, is primarily metabolized in the liver by the CYP3A to its pharmacologic active metabolite, α -hydroxymidazolam [Shimizu *et al.*, 2007] and it is a preferred CYP3A substrate extensively used for *in vitro* and *in vivo* studies [Halama *et al.*, 2013; Mooiman *et al.*, 2013]. Midazolam was used to verify and validate CYP3A activity in liver S9 fractions prepared from tissues obtained from animals of different age groups. Drug and metabolite analyses were performed using a HPLC-MS/SRM method capable of quantifying norketamine and α -hydroxymidazolam using an isotopic dilution strategy in liver S9 fraction suspensions.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Ketamine, d₄-ketamine, norketamine, d₄-norketamine, midazolam, d₄-midazolam and α -hydroxymidazolam and d₄- α -hydroxymidazolam were obtained in solution from Cerilliant (Round Rock, TX). Other chemicals, including acetonitrile, formic acid, methanol, sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Commercial rat liver S9 fractions and NADPH regeneration solutions were obtained from Corning Gentest (Tewksbury, MA, USA).

Animal study

Twenty-four specific pathogen free male Sprague Dawley rats from Charles River Canada (St-Constant, QC) were used for this study. Seven to nine weeks old rats (n=6/age group) were purchase and kept until they were respectively 3 and 6 months old. Twelve 8 month old rats were purchased and kept until they were 12 and 18 months of age (n=6/age group). All rats were housed in a standard laboratory animal environment. The rats had *ad libidum* access to food (2018 Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Teklad, Bartonville, IL) and reverse osmosis water. They were single housed in ventilated cages (Green Line IVC Sealsafe Plus, Tecniplast, USA) changed once a week. Rats were housed on corn cob bedding (7097 corncob, Harlan Teklad, Bartonville, IL) and they had a high temperature polycarbonate rat retreat (Bioserv, Flemington, NJ) and one nylabone (Bioserv, Flemington, NJ) for environmental enrichment. The Institutional Animal Care and Use Committee approved the protocol prior to animal use in agreement with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care [Canadian Council on Animal Care, 1993]. Rats were euthanized with CO₂, livers were rapidly remove and S9 fractions where prepared.

Rat Liver S9 preparation and incubation

For each age group, three livers were pooled and homogenized in a 50 mM TRIS-HCl buffer, pH 7.4, containing 150 mM KCl and 2 mM EDTA at a ratio of 1:4 (w:v). The homogenates were centrifuged at 9,000 g for 20 minutes. The total amount of protein in each supernatant was determined using the standard Coomassie protein assay (Bradford). Supernatant aliquots were kept à -80 °C until usage.

The incubations were performed as previously described [Lavoie *et al.*, 2013; Santamaria *et al.* 2014] and were performed minimally in triplicate. The incubations were performed in a microcentrifuge tube and contained various concentrations ranging from 1 to 100 μ M of ketamine or midazolam, 0.5 mg/mL of S9 fraction proteins diluted in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Liver S9 enzyme suspensions (total volume of 100 μ L) were fortified with 5 μ L of NADPH-regenerating solution A (Corning BD Biosciences Cat. No. 451220) and 1 μ L of solution B (Corning BD Biosciences Cat. No. 451200) and preincubated at 37°C

for 5 min prior the addition of ketamine or midazolam. For the determination of K_m and V_{max} , the concentration of norketamine or α -hydroxymidazolam was determined after 10 min incubation to calculate the initial rate of formation (i.e. V_i). Fifty μL of samples were taken and mixed with 250 μL of the deuterated internal standard solution (1 μM d_4 -norketamine or d_4 - α -hydroxymidazolam in acetonitrile) in a 1.5 mL centrifuge tube. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 μL of the supernatant was transferred into an injection vial for HPLC-MS/SRM analysis.

Quantitative Analytical Methods

The concentrations of norketamine and α -hydroxymidazolam were determined using an HPLC-MS/SRM assay. Two μL samples were injected using a Thermo Scientific Accela HPLC System (San Jose, CA, USA) onto a Thermo Hypersil Phenyl 100 x 2 mm column (5 μm) with flow rate of 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile, methanol, water and formic acid at a ratio of 60:20:20:0.1, respectively. The Thermo Scientific linear ion trap mass spectrometer (Thermo LTQ-XL) was interfaced with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source. The mass spectrometer was coupled with the HPLC system using a pneumatically assisted electrospray ion source (ESI). The sheath gas was set to 25 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300 $^\circ\text{C}$, the capillary voltage to 15 V and the collision energy was set to 40%. All scan events were acquired with a 100 msec maximum injection time. Metabolites and corresponding deuterium-labeled molecule analogues were analyzed in full scan MS/MS and the quantification was based on specific post-processing SRM extracted ion chromatograms. The selected reaction monitoring (SRM) transitions were set to m/z 224.1 \rightarrow 179.0, 228.1 \rightarrow 183.0, 342.1 \rightarrow 297.0 and 346.1 \rightarrow 301.0 for norketamine, d_4 -norketamine, α -hydroxymidazolam and d_4 - α -hydroxymidazolam respectively. The analytical range used was ranging from 0.05 μM to 50 μM .

Data analysis and regression

All non-linear regression analyses were performed with PRISM (6.0f) GraphPad software (La Jolla, CA) using the non-linear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The Michaelis-Menten equation describes the rates of irreversible enzymatic reactions that are generally observed for CYP mediated metabolic reactions. Michaelis-Menten parameters can be estimated with non-linear regression analysis using the Michaelis-Menten equation [Michaelis and Menten, 1913].

$$v_i = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Where the initial velocity (v_i) was determined using equation 2.

$$v_i = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[\alpha\text{-hydroxymidazolam}]_{10\text{ min}}}{10\text{ min}} \text{ OR } \frac{[\text{norketamine}]_{10\text{ min}}}{10\text{ min}} \quad (2)$$

The initial rate (v_i) was calculated based on the concentration of norketamine or α -hydroxymidazolam measured after a 10 minutes incubation of ketamine or midazolam in rat liver S9 enzyme suspensions. Additionally, the enzyme-mediated clearance ($CL_{u_{int}}$) that would occur without physiological limitations including protein binding or hepatic blood flow was determined using equation (5).

$$CL_{u_{int}} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad (5)$$

Statistical analysis

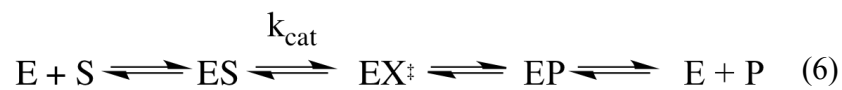
Results are presented as means (\pm SD). The statistical difference was assessed with a one-way ANOVA and a Tukey's multiple comparisons test using GraphPad PRISM (version 6.0f); $p < 0.05$ was considered significant.

Results and Discussion

In our previous study, an intraperitoneal administration of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) in male Sprague Dawley rats of 3, 6, 12 and 18 months of age ($n=6$ /age group) caused a significant increase of the AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ with aging [Giroux *et al.*, 2015]. Compared to 3 month old rats, the ketamine exposure (AUC_{0-t}) increased up to a factor of 4.15 compared with 18 month old rats. The elimination half-life ($T_{1/2}$) and relative clearance (CL/F) significantly decreased with aging. The decrease in $T_{1/2}$ and CL/F might be explained by an age-associated reduction in renal function or an increase in volume of distribution of lipid soluble drugs resulting in a prolongation of $T_{1/2}$ but we can't exclude hepatic clearance impairments. Ketamine is metabolized primarily by the liver CYP3A [Santamaria *et al.*, 2014; Mössner *et al.* 2011] (i.e. CYP3A1 and CYP3A2) to its active metabolite norketamine. Alterations in liver metabolism (e.g. hepatic clearance) with aging could explain the higher AUC observed in the aging rats. Moreover, selected organs, including liver, were taken for histopathology to confirm tissue integrity with aging.

The effect of substrate concentration on the initial rate (V_i) of an enzyme-catalyzed reaction is a fundamental concept in enzyme kinetics. K_m is an indicator of the affinity that an enzyme has for a particular substrate, hence the thermodynamic stability of the enzyme-substrate complex. The stability of the enzyme-substrate complex is closely related to primary, secondary and tertiary structures of the enzyme. It plays a central role in defining the energetically favored binding cluster of the substrate into the active enzyme site [Sun and Scott, 2010]. As shown *in silico*, the structure of the binding cluster may lead to different metabolites or affect the rate of formation [Sun and Scott, 2010]. To adequately

determine the value of the apparent Michaelis-Menten constant K_m as well as the maximum rate achieved by the system (V_{max}), the data were fitted with the Michaelis-Menten equation (1). The initial rate (V_i) was calculated using the equation (2) and concentrations of α -hydroxymidazolam or norketamine were determined after 10 min midazolam or ketamine incubation in rat liver S9 fraction suspensions by HPLC-MS/SRM. Figure 2 shows results coherent with a kinetics following a Michaelis-Menten enzymatic reaction for all rat liver S9 fractions from all age groups and data were compatible with commercial rat liver S9 fractions (data not shown). The derived data are presented in Table 1. Midazolam is a well-characterized substrate of CYP3A and the primary biotransformation product is α -hydroxymidazolam. As illustrated in Table 1 and Figure 2, the observed K_m values were not significantly different when comparing age groups. This is interesting because it suggest that enzyme-substrate complex structure was not significantly different between midazolam and CYP3A (i.e. CYP3A1 and CYP3A2) with age. However, the derived V_{max} suggest a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites in liver S9 fractions of 18-month old rats, thus affecting significantly the intrinsic clearance ($CL_{u(int)}$) of the drug. Interestingly for ketamine, the derived K_m value significantly changed in geriatric rats. This observation is very distinctive compared to rat liver CYP3A mediated metabolism of midazolam. The K_m value is directly related to the thermodynamic stability of the binding cluster of ketamine in the active site of CYP3A. The data indicates a significant decrease of K_m in liver S9 fractions of 18-month old rats and suggest that ketamine may have stronger interactions with CYP3A active site residues leading to a more thermodynamically stable enzyme-substrate complex. However it may also suggest that the enzyme binds the substrate more tightly and consequently necessitates more energy to form the activated transition state complex (EX^\ddagger), a necessary intermediate to form the enzyme-product complex (EP) as shown in Equation 6.



Free energy difference associated with the formation of the enzyme-substrate complex ($G_{binding}$) can have a significant impact on the observed K_m but an increase of the G^\ddagger (difference of free energy between EX^\ddagger and ES) can also significantly decrease the rate constant k_{cat} (i.e. turnover number) which represents the number of substrate molecules each enzyme site can convert to a metabolite per unit of time. The rate constant k_{cat} can be related to V_{max} using the Equation 7.

$$V_{max} = k_{cat} \times [E_{total}] \quad (7)$$

As illustrated in Figure 2 and in Table 1, derived V_{max} values shows significant differences with age specifically when comparing with results obtain from liver S9 fractions of 18-month old rats. A decrease of V_{max} suggest a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites similar to what has been observed with the reference CYP3A substrate midazolam. These results are therefore compatible with the formation

of a more stable enzyme-substrate complex (ES) but a less favorable transition state complex (EX^\ddagger) leading to an increase of G^\ddagger , thus a decrease of k_{cat} and V_{max} . Conformational change of the CYP3A active site with age can potentially explain these results and protein misfolding is characteristic of several age-related problems. The interaction of the active site residues is substrate dependent and the results appear to suggest that an energetically favored binding cluster of ketamine in the active site of CYP3A is observed with age but interestingly this effect was not observed for midazolam. The formation of a more stable enzyme-substrate complex (ES) may have severe consequences on drug-drug interactions, a major issue in geriatric populations. Equation 5 was used to calculate the $CL_{U_{int}}$, and the observed $CL_{U_{int}}$ diminishes with aging, associated to the midazolam CYP3A catalyzed reaction, but increases for ketamine (Table 1). When using equation 5, the calculation of $CL_{U_{int}}$ assumes that the concentration of the enzyme catalytic sites remain constant. This assumption cannot be made if conformational changes of the CYP3A active site occurs with aging. Consequently, the $CL_{U_{int}}$ cannot be compared between age groups for the ketamine CYP3A mediated reaction. As shown in Figure 2, the rate of formation of norketamine undergoes a very rapid saturation in the liver S9 fractions of 18-month old rats suggesting that following a relatively high ketamine dose (80 mg/kg), drug metabolism is impaired leading to a significant increase of drug exposition (AUC) and elimination. These results are in accordance with our recent in vivo investigation [Giroux et al., 2015].

Conclusion

Age and related factors have a substantial effect on ketamine bioavailability that can be related to physiological changes but also to liver metabolism alterations. Our results suggest that rat CYP3A enzyme undergoes conformational changes with age particularly in our geriatric group (e.g. 18 month rats) leading to significant decrease in the rate of formation of norketamine. Moreover, results strongly suggest a severe impairment of CYP3A ketamine mediated metabolism.

Acknowledgments

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F.Beaudry discovery grant no. 386637-2010). The HPLC-MS/MS analyses were performed on instruments funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F.Beaudry Research Tools and Instruments Grants no. 439748-2013). R. Santamaria received a scholarship from *Le Fond du Centenaire* (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal). The animal study was funded by CALAM/CALAS (P. Vachon 2014 research fund).

Authorship Contributions

Each author's contributions to the manuscript are the following;

Participated in research design: Santamaria R, Vachon P, Beaudry F

Conducted experiments: Santamaria R, Giroux MC, Vachon P, Beaudry F

Performed data analysis: Santamaria R, Beaudry F

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Santamaria R, Vachon P, Beaudry F

All authors: No reported conflicts of interest. The research was funded by recognized Canadian research funding agencies.

References

Canadian Council on Animal Care (1993). Guide to the care and use of experimental animals, vol 1, 2nd ed. Ottawa (Canada): Canadian Council on Animal Care

Crentsil V, Lee J, Jackson A (2014). Quantitative drug benefit-risk assessment: utility of modeling and simulation to optimize drug safety in older adults. *Ann Pharmacother.* 48(3):306-313.

Giroux MC, Beaudry F, Santamaria R, Hélie P, Burns P, and Vachon P (2015), Physiological, biochemical and pharmacokinetic comparisons between 3, 6, 12 and 18 month old male Sprague Dawley rats following ketamine-xylazine anesthesia, *BMC Veterinary Research*. MS ID : 9382132761532116. *In Press*

Halama B, Hohmann N, Burhenne J, Weiss J, Mikus G, Haefeli WE (2013). A nanogram dose of the CYP3A probe substrate midazolam to evaluate drug interactions. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 93(6):564-571.

Hines RN (2013). Developmental expression of drug metabolizing enzymes: impact on disposition in neonates and young children. *Int J Pharm.* 452(1-2):3-7.

Iirola T, Ihmsen H, Laitio R, Kentala E, Aantaa R, Kurvinen JP, Scheinin M, Schwilden H, Schüttler J, Olkkola KT. Population pharmacokinetics of dexmedetomidine during long-term sedation in intensive care patients. *Br J Anaesth.* 108(3):460-468.

Lavoie DS, Pailleux F, Vachon P, Beaudry F (2013). Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 27(7):882-888

Meyer RE, Fish RE (2008). Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers, *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2nd ed. San Diego, (CA): Academic Press. p. 27-82.

Meziere A, Paillaud E, Plaud B (2013). Anesthesia in the elderly. *Presse Med,* 42(2), 197-201.

Michaelis L and Menten ML (1913). *Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochemische Zeitschrift* 49:334-336.

Mooiman KD, Maas-Bakker RF, Rosing H, Beijnen JH, Schellens JH, Meijerman I (2013). Development and validation of a LC-MS/MS method for the in vitro analysis of 1-hydroxymidazolam in human liver

microsomes: application for determining CYP3A4 inhibition in complex matrix mixtures. *Biomedical Chromatography*. 27(9):1107-1116.

Mössner LD, Schmitz A, Theurillat R, Thormann W, Mevissen M (2011). Inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in ketamine metabolism by use of liver microsomes and specific cytochrome P450 enzymes from horses, dogs, and humans. *American Journal of Veterinary Research*. 72(11):1505-1513.

Richardson K, Bennett K and Kenny RA (2014). Polypharmacy including falls risk-increasing medications and subsequent falls in community-dwelling middle-aged and older adults. *Age Ageing*. afu141 (Epub ahead of print)

Santamaria R, Pailleux F, Beaudry F (2014). In vitro ketamine CYP3A-mediated metabolism study using mammalian liver S9 fractions, cDNA expressed enzymes and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 28(12):1660-1669

Shi S, Klotz U (2011), Age-related changes in pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*. 12(7):601-10.

Shimizu M, Uno T, Tamura HO, Kanazawa H, Murakami I, Sugawara K, Tateishi T (2007). A developed determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: application of human pharmacokinetic study for measurement of CYP3A activity. *Journal of Chromatography B*. 847(2):275-281.

Sun H, Scott DO (2010). Structure-based drug metabolism predictions for drug design. *Chem Biol Drug Des*. 75:3-17

Veilleux-Lemieux D, Castel A, Carrier D, Beaudry F, Vachon P (2013), Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 52(5):567-70

Table 1. Kinetic parameters associated with the formation -hydroxymidazolam and norketamine in liver S9 fractions from aging rats.

α-hydroxymidazolam	V_{\max} nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	K_m μ M (nmol mL ⁻¹)	CL_{int} mL min ⁻¹
3 month liver S9 fractions	0.247 (\pm 0.017)	4.32 (\pm 0.26)	0.057
6 month liver S9 fractions	0.264 (\pm 0.021)	6.22 (\pm 0.99)	0.042
12 month liver S9 fractions	0.216 (\pm 0.020)	4.18 (\pm 0.05)	0.052
18 month liver S9 fractions	0.0398 (\pm 0.003) ¹	3.76 (\pm 1.45) ³	0.011
norketamine			
3 month liver S9 fractions	2.39 (\pm 0.23)	15.99 (\pm 4.28)	0.150
6 month liver S9 fractions	2.61 (\pm 0.18)	18.38 (\pm 3.85)	0.142
12 month liver S9 fractions	2.07 (\pm 0.073)	19.04 (\pm 0.94)	0.109
18 month liver S9 fractions	0.68 (\pm 0.02) ²	2.65 (\pm 0.49) ⁴	0.256

^{1,2}, **p < 0.001**

³ **p > 0.05**

⁴ **p < 0.05**

Figure legends

Figure 1. Molecular structures of ketamine, norketamine, midazolam and α -hydroxymidazolam

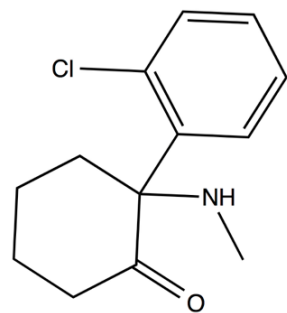
Figure 2. Determination of Michaelis constant K_m and maximum velocity V_{max} using non-linear regression fitting. Each point represents the mean (\pm SD) of experiments in triplicate. Significant differences of the initial rate of formation (V_i) were observed starting at $5\mu\text{M}$ substrate concentration for liver S9 fractions of 18-month old rats.

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

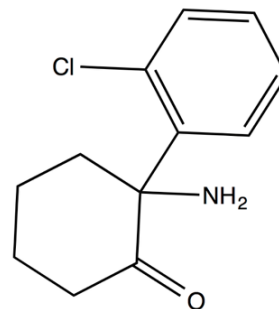
**** $p < 0.0001$

Figure 1.

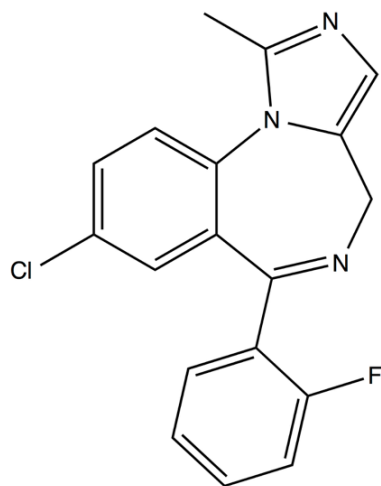


Ketamine

CYP3A
→

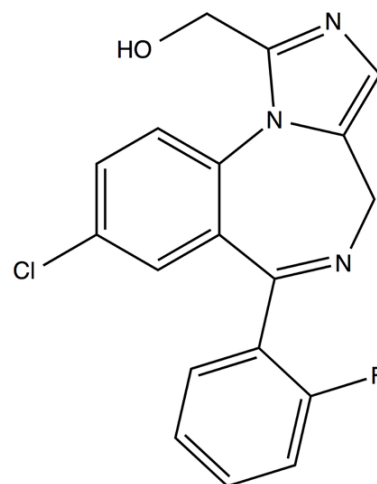


Norketamine



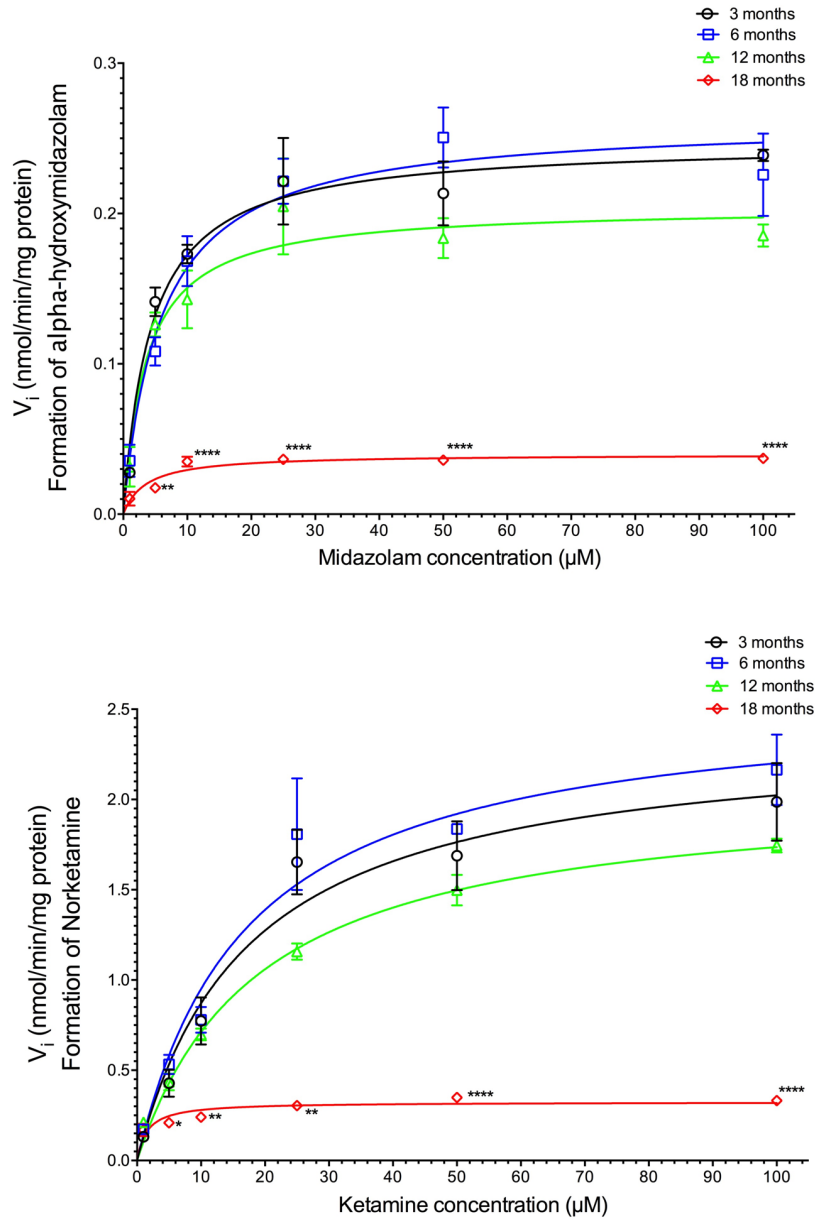
Midazolam

CYP3A
→



α-hydroxymidazolam

Figure 2.



6 - Discussion

Les patients gériatriques forment la sous-population qui subit le plus de réactions adverses aux médicaments (Shi, Mörike et al. 2008, Klotz 2009). Il est même possible d'établir une corrélation linéaire entre l'âge et le risque de subir des effets adverses (Meziere, Paillaud et al. 2013). De plus, cette classe de patients est au prise avec de nombreux problèmes de santé. Cette morbidité, voire co-morbidité, exercera en soi des modifications sur la pharmacocinétique du médicament (Shi, Mörike et al. 2008). On peut penser, par exemple, à l'insuffisance hépatique ou rénale. C'est sans surprise que l'on découvre que la classe gériatrique représente la sous-population qui consomme le plus de médicaments (Shi, Mörike et al. 2008). C'est également ces mêmes individus qui requerront le plus souvent des chirurgies afin de corriger divers problèmes (Meziere, Paillaud et al. 2013). Il est donc très courant que ces patients fassent usage de polypharmacie en vue d'une chirurgie ou même au quotidien. Le potentiel d'interactions médicamenteuses est donc très important (Ogu and Maxa 2000). Tous ces facteurs amènent donc à se poser la question suivante : est-ce que l'âge en soi exercera des modifications sur le métabolisme ou si ce n'est que le résultat des facteurs associés à l'âge comme la morbidité et la polypharmacie? Tout d'abord, on sait que les compartiments de distribution seront affectés par l'âge. Les patients gériatriques ont tendance à avoir plus de tissus adipeux et une perfusion sanguine des organes qui est modifiée (O'Malley, Crooks et al. 1971, Woodhouse and Wynne 1988, Tanaka 1998). Tous ces éléments de réponse contribuent à expliquer la raison pour laquelle ces patients subiront autant d'effets adverses aux médicaments. Toutefois, une avenue de réponse n'a pas encore été totalement élucidée : il s'agit de l'activité métabolique intrinsèque des organes. Les auteurs ne s'entendent pas sur ce point. D'où la pertinence d'évaluer l'impact de l'âge sur le métabolisme de médicament.

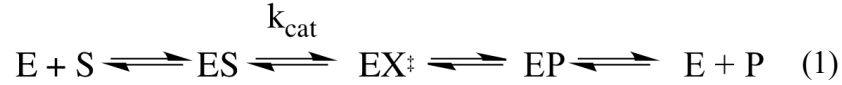
La kétamine est une molécule utilisée en anesthésie et, moins fréquemment, dans le traitement de la douleur chronique (Sleigh, Harvey et al. 2014). C'est une des rares molécules à agir sur les récepteurs NMDA, ce qui lui permet de contrer des phénomènes de douleur chronique comme le *wind-up* et la sensibilisation centrale. Elle est autant utilisée en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, dont entre autres chez les animaux de laboratoire. En effet, la kétamine combinée à la xylazine permet une anesthésie rapide, efficace et fiable, ce qui en fait le protocole anesthésique de choix après les anesthésiques volatils (Veilleux-Lemieux, Castel et al. 2013). Malgré cela, des travaux à notre laboratoire ont montré précédemment que l'usage de ce protocole était un mauvais choix chez des rats âgés (Veilleux-Lemieux, Castel et al. 2013). L'exposition aux concentrations systémiques était significativement augmentée chez les rats âgés, ce qui causait une anesthésie et un réveil prolongés. De plus, des concentrations plasmatiques résiduelles étaient présentes jusqu'à quatre jours après.

Le métabolisme de la kétamine s'effectue en premier lieu dans le foie pour excréter ensuite les métabolites dans l'urine (Gupta 2011, Plumb 2011). Or, afin d'évaluer si l'âge affecte spécifiquement l'activité métabolique de la kétamine, il convient de réaliser des digestions enzymatiques *in vitro* à l'aide de fractions cellulaires provenant du foie. Toutefois, il faut connaître la voie métabolique majeure de formation du norkétamine (principal métabolite de la kétamine) afin d'évaluer spécifiquement l'impact de l'âge sur cette voie métabolique. Dans la littérature, les plus récents articles semblent pencher vers la voie du CYP3A, donc nous avons utilisé le substrat et l'inhibiteur de référence du CYP3A (respectivement midazolam et kétoconazole) afin de confirmer la voie métabolique principale de formation du norkétamine dans des fractions S9 et des supersomes chez le rat, le chien et d'humain (Hijazi and Boulieu 2002). De plus, le midazolam est une molécule fréquemment utilisée en combinaison avec la kétamine pour ses effets anxiolytiques, sédatif et myorelaxants (Pellier, Monrigal et al. 1999, Plumb 2011). Donc, par la même occasion nous avons caractérisé l'interaction métabolique des deux molécules.

Avant toute chose, nous avons commencé par caractériser la cinétique de base pour les trois espèces les espèces. Nous avons observé que V_{max} était inférieure chez l'humain comparé aux deux autres espèces qui avaient des valeurs comparables, ce qui veut dire que l'activité enzymatique de l'enzyme humaine est moins grande que celle du rat et du chien. Ensuite, nous avons observé un K_m inférieur chez le rat et le chien comparativement à l'humain. Il est important de se rappeler que K_m est inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Donc, cela signifie que l'enzyme humaine a moins d'affinité pour la kétamine que les deux autres espèces ayant un K_m similaire. Cela suggère que l'humain est plus susceptible à de potentielles interactions médicamenteuses entre la kétamine et d'autres molécules ayant la même voie métabolique. Ensuite, nous avons effectué des réactions de stabilité métabolique desquelles on peut obtenir le $T_{1/2}$. Chez l'humain, le $T_{1/2}$ est supérieur aux deux autres espèces, ce qui est cohérent avec l'expérience de V_{max} qui montrait que l'activité métabolique était plus faible chez l'humain. Cela suggère également que l'humain sera exposé à des concentrations systémiques plus élevées. Après avoir obtenu ces données de base, nous avons effectué plusieurs réactions d'inhibition de formation de norkétamine. Du midazolam ou du kétoconazole a été rajouté à la mixture contenant de la kétamine afin d'observer l'inhibition de la réaction enzymatique des fractions S9. À haute dose de midazolam, toute formation de norkétamine a été inhibée chez les trois espèces, ce qui suggère que la kétamine et le midazolam partagent exactement les mêmes voies métaboliques. L' IC_{50} était significativement inférieur chez l'humain, ce qui est cohérent avec l'expérience de K_m précédente puisque cela suggère qu'il faut moins de midazolam pour inhiber le métabolisme de la kétamine étant donné que l'affinité de l'enzyme pour le substrat (kétamine) est moindre. Chose intéressante, avec le kétoconazole, même à concentration élevée, l'inhibition de formation de norkétamine n'était pas totale. Comme le kétoconazole est spécifique au CYP3A, cela suggère donc que d'autres voies métaboliques ont continué à produire le norkétamine. Rappelons-nous que l'expérience a été effectuée dans une fraction S9 et donc que l'on retrouve d'autres

voies métaboliques que le CYP3A. Or, comme le midazolam inhibait à 100% la formation de norkétamine, on peut déduire que la kétamine et le midazolam partagent les mêmes voies métaboliques principales et secondaires. Lorsque l'expérience est répétée dans des supersomes, on obtient une inhibition à 100% avec les deux molécules puisque seulement le CYP3A est présent dans l'échantillon. Ainsi, il est possible de conclure que la kétamine a comme voie métabolique majeure le CYP3A et qu'elle partage les mêmes voies métaboliques principale et secondaires que le midazolam. Par conséquent, lorsque administrés conjointement, la kétamine et le midazolam interagissent d'un point de vue métabolique et seront métabolisées plus lentement, ce qui suggère que l'exposition aux concentrations systémiques sera considérablement augmentée.

À partir de ces connaissances, nous avons pu déterminer les paramètres cinétiques de la réaction chimique entre le substrat (kétamine) et l'enzyme (CYP3A) chez des rats âgés (12 et 18 mois) en comparaison avec des plus jeunes (3 et 6 mois). Tout d'abord, tous les organes ont été analysés histologiquement et n'ont démontré aucune pathologie. Ainsi, on peut considérer que les observations de nos travaux ne sont pas le résultat de morbidité qu'auraient pu subir ces rats. Pour la kétamine le V_{max} était de 2.39 (\pm 0.23), 2.61 (\pm 0.18) et 2.07 (\pm 0.07) pour les plus jeunes comparativement à 0.68 (\pm 0.02) pour le groupe de 18 mois ($p < 0.001$). On parle d'un V_{max} trois fois inférieur pour les rats les plus âgés. Même constat pour le midazolam: V_{max} de 0.247 (\pm 0.017), 0.264 (\pm 0.021) et 0.216 (\pm 0.020) pour les plus jeunes comparativement à 0.0398 (\pm 0.003) pour le groupe de 18 mois ($p < 0.001$). Ici, il s'agit d'un V_{max} cinq fois inférieur pour les rats les plus âgés. Ce résultat montre clairement qu'il y a un changement de l'activité métabolique associé à l'âge. Afin d'obtenir la clairance intrinsèque de la réaction enzymatique, il nous faut les valeurs de K_m . Pour le midazolam, aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes ayant pour conséquence que la CL_{int} est significativement diminuée pour le groupe de 18 mois. À notre surprise, la valeur de K_m pour la kétamine a diminuée de façon significative pour le groupe le plus vieux : 15.99 (\pm 4.28), 18.38 (\pm 3.85), 19.04 (\pm 0.94) comparativement à 2.65 (\pm 0.49). Lorsque l'on calcule la CL_{int} pour le groupe de 18 mois, on se retrouve avec une valeur supérieure aux groupes plus jeunes. Or, il faut être prudent puisqu'il s'agit fort bien d'un artefact. Il faut revenir à des notions de base afin de comprendre la situation. K_m est un indicateur de la stabilité thermodynamique du complexe enzyme-substrat, donc une modification du K_m représente une modification de ce complexe. On pourrait penser que si K_m est diminuée, cela signifie que l'interaction entre l'enzyme et le substrat sera favorisée et donc que la réaction enzymatique sera plus rapide. Or, ici on peut observer la situation contraire : le V_{max} a diminué plutôt que d'augmenter. Un K_m diminué peut aussi indiquer que le substrat est lié à l'enzyme plus fortement et donc plus d'énergie est requise pour provoquer la réaction chimique (Équation 1) :



Cela aura comme conséquence de diminuer le vitesse de la réaction enzymatique. La constante catalytique (k_{cat}) que l'on voit inscrite dans l'équation 1 sera diminuée par l'augmentation de la stabilité du complexe ES. Si k_{cat} diminue alors forcément V_{max} va diminuer selon l'équation 2 :

$$V_{max} = k_{cat} \times [E_{total}] \quad (2)$$

Comme le K_m représente l'interaction entre le substrat et l'enzyme et que c'est hautement dépendant de l'assemblage tridimensionnel des deux, nous estimons que la stabilité du complexe ES est augmentée en raison d'une modification de la conformation de l'enzyme. Il ne faut pas oublier que chaque complexe ES est unique, ce qui explique la raison pour laquelle le K_m du midazolam n'a pas été affecté. Le changement de conformation du CYP3A aurait affecté la vitesse de la réaction enzymatique du midazolam sans pour autant modifier la stabilité de ce complexe ES. Alors que pour la kétamine, cette modification aurait eu des répercussions sur les deux paramètres cinétiques. Il est également possible qu'avec l'âge la production de CYP3A soit diminuée ou qu'il y ait production d'une forme non active de CYP3A. Dans ce cas, même si nous contrôlons la concentration totale de protéines, il est impossible de savoir si la concentration de CYP3A est stable entre les groupes d'âge. Cela pourrait expliquer les modifications de K_m/V_{max} observées. Or, par une digestion tryptique nous avons quantifié la concentration de CYP3A et CYP2D entre les différents groupes d'âge (Annexe 2). Aucune différence significative n'a été observée. De plus, il est fréquent d'observer des erreurs de repliement de protéines dans plusieurs maladies liées à l'âge, ce qui est cohérent avec une modification de la conformation de l'enzyme.

Ces résultats montrent que non seulement il y a une baisse de l'activité métabolique chez les rats âgés, mais également une modification de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. On peut également émettre l'hypothèse que ces changements sont irréversibles et s'aggraveront encore dans le temps. Les répercussions chez des patients *in vivo* peuvent être considérables. Tout d'abord, on s'attend à une augmentation de l'exposition aux concentrations systémiques en raison de la diminution de l'activité enzymatique. De plus, l'augmentation de la stabilité du complexe ES pourrait avoir des répercussions sur le risque d'interactions médicamenteuses. Ces modifications de la cinétique de dégradation de la kétamine auront évidemment des impacts sur la pharmacodynamie. C'est donc cohérent avec les résultats préalablement obtenus au laboratoire lors d'anesthésie à la kétamine-xylazine chez des rats gériatriques (Veilleux-Lemieux, Castel et al. 2013). De plus, des collaborateurs ont effectué l'expérience *in vivo* et ont obtenu des résultats cohérents avec les nôtres (Giroux, Santamaria et al. 2015). Une augmentation des concentrations systémiques a été observée chez les rats les plus âgés. Conséquemment, on assiste à une augmentation de la durée de l'anesthésie et une modification de nombreux paramètres d'anesthésie. La

voie métabolique du CYP3A est clairement détériorée et cela suggère donc que ce protocole anesthésique est un mauvais choix chez les rats gériatriques.

À partir de ces données, comme nous estimons que les modifications de la cinétique du métabolisme de la kétamine sont dus à des changements de la conformation tridimensionnelle du CYP3A, il serait intéressant d'observer la structure tridimensionnelle de l'enzyme. En effectuant de la modélisation de la réaction enzymatique nous pourrions tenter de reproduire la situation observée *in vitro* afin de comprendre si une modification tridimensionnelle de l'enzyme peut mener à une telle modification de la cinétique de K_m/V_{max} . D'autres techniques d'enzymologie permettent également de visualiser la structure tridimensionnelle d'une protéine et pourrait confirmer ou infirmer notre hypothèse.

Finalement, nous avons exploré la contribution du métabolisme cérébral (Annexe 1). Comme le foie est l'organe émonctoire le plus important, il est évident que le centre du projet porterait avant toute chose sur le métabolisme hépatique. Cependant, comme de nombreux articles montrent la présence de CYP450 dans le cerveau et leur contribution au métabolisme de certains médicaments, il aurait été intéressant d'ajouter à ce projet des données sur le métabolisme *in situ* du cerveau des rats en fonction de l'âge. Malheureusement, nos expériences à partir de fractions S9 n'ont pas montré de métabolisme cérébral de la kétamine. Toutefois, ces résultats sont loin d'être définitifs. Il serait intéressant de développer cet aspect innovateur du métabolisme de la kétamine en reprenant le même protocole dans des microsomes par exemple. Les microsomes contiennent généralement une concentration plus élevées de CYP450 et nous permettrait probablement d'observer de la dégradation de kétamine.

7 - Conclusion

Nous avons démontré un changement d'activité métabolique chez des rats âgés comparativement à des plus jeunes. Pour ce faire, nous avons débuté par confirmer hors de tout doute la voie métabolique principale de formation de norkétamine depuis la kétamine chez les rats, chiens et humains: CYP3A. Par la même occasion nous avons caractérisé l'interaction entre la kétamine et le midazolam. Ensuite, nous avons caractérisé l'impact de l'âge sur le métabolisme hépatique de la kétamine par le CYP3A chez le rat. Une différence significative était observable pour la vitesse maximale de la réaction enzymatique entre les rats du groupe de 18 mois et les 3 autres groupes plus jeunes (cinq fois inférieur pour le midazolam et 3 fois inférieur pour la kétamine). De plus, un changement de K_m était observé seulement pour la kétamine, ce qui suggère donc une modification de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme CYP3A. Comme les erreurs de repliement de protéines sont fréquentes lors de maladies reliées à l'âge, cette théorie est hautement plausible. D'autant plus que nous avons confirmé qu'il n'y avait pas de différence significative des concentrations de CYP450 entre les différents groupes d'âge (Annexe 2).

Notre but principal était de démontrer des changements de l'activité métabolique reliés à l'âge, chose que nous avons réussi à faire. Cependant, ce projet s'inscrit dans une démarche beaucoup plus large qui est de développer une pharmacothérapie adaptée aux phénotypes individuels. Une des façons de se rapprocher de cet objectif est par la caractérisation des différentes sous-populations afin de mieux cerner le phénotype du patient en fonction des catégories dont il fait partie. Comme on peut le voir avec nos résultats, les patients gériatriques sont fortement susceptibles d'être exposés à des concentrations systémiques plus élevées des médicaments ainsi que de subir des interactions médicamenteuses. Nos collègues ont d'ailleurs confirmé ces résultats chez des rats *in vivo* (Annexe 3). Il reste tout de même beaucoup de travaux et recherches à faire avant de pouvoir caractériser les phénotypes individuels de façon rapide et réaliste dans un contexte médical. C'est grâce à une meilleure compréhension des profils PK/PD de sous-population que l'on se rapproche de l'objectif final : développer une pharmacothérapie adaptée au phénotype individuel.

Nos résultats concernant le métabolisme cérébral sont peu encourageants. Cependant, considérant que plusieurs papiers dans la littérature scientifique font objet d'une contribution importante du métabolisme cérébral, il conviendrait alors d'explorer davantage le sujet avant de tirer des conclusions définitives. Il serait également intéressant d'observer la structure tridimensionnelle de l'enzyme CYP3A pour laquelle nous suggérons un changement de conformation afin d'expliquer nos résultats.

Bibliographie

American Society of Anesthesiologists (2013). "Anesthesiology: An Overview." URL : <https://www.asahq.org/WhenSecondsCount/overview.aspx>.

International Association for the Study of Pain (2012). "IASP Taxonomy." URL : <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>.

Ainslie, G. R., K. K. Wolf, Y. Li, E. A. Connolly, Y. V. Scarlett, J. H. Hull and M. F. Paine (2014). "Assessment of a Candidate Marker Constituent Predictive of a Dietary Substance–Drug Interaction: Case Study with Grapefruit Juice and CYP3A4 Drug Substrates." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 351(3): 576-584.

Akin, A., A. Bayram, A. Esmoğlu, Z. Tosun, R. Aksu, R. Altuntas and A. Boyacı (2012). "Dexmedetomidine vs midazolam for premedication of pediatric patients undergoing anesthesia." *Paediatr Anaesth* 22(9): 871-876.

Almenrader, N., M. Passariello, B. Coccetti, R. Haiberger and P. Pietropaoli (2007). "Premedication in children: a comparison of oral midazolam and oral clonidine." *Paediatr Anaesth* 17(12): 1143-1149.

Armstrong, S. C., G. H. Wynn and N. B. Sandson (2009). "Pharmacokinetic drug interactions of synthetic opiate analgesics." *Psychosomatics* 50(2): 169-176.

Barker, J. and D. J. Ando (1999). *Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning*, Wiley.

Beaufay, H., A. Amar-Costesec, D. Thinès-Sempoux, M. Wibo, M. Robbi and J. Berthet (1974). "ANALYTICAL STUDY OF MICROSOMES AND ISOLATED SUBCELLULAR MEMBRANES FROM RAT LIVER III. Subfractionation of the Microsomal Fraction by Isopycnic and Differential Centrifugation in Density Gradients." *The Journal of cell biology* 61(1): 213-231.

Benedetti, M. S., R. Whomsley and M. Canning (2007). "Drug metabolism in the paediatric population and in the elderly." *Drug discovery today* 12(15): 599-610.

Bourinet, E., C. Altier, M. E. Hildebrand, T. Trang, M. W. Salter and G. W. Zamponi (2014). "Calcium-permeable ion channels in pain signaling." *Physiological reviews* 94(1): 81-140.

Brandon, E. F., C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen and J. H. Schellens (2003). "An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons." *Toxicology and applied pharmacology* 189(3): 233-246.

- Brandstetter, Y., J. Kaplanski, V. Leibson and Z. Ben-Zvi (1986). "The effects of estrus cycle on drug metabolism in the rat." *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 11(4): 251-254.
- Cao, J., X. Shi, X. Miao and J. Xu (2009). "Effects of premedication of midazolam or clonidine on perioperative anxiety and pain in children." *Biosci Trends* 3(3): 115-118.
- Chen, W. W., M. Niepel and P. K. Sorger (2010). "Classic and contemporary approaches to modeling biochemical reactions." *Genes & development* 24(17): 1861-1875.
- Chen, X., S. Shu and D. A. Bayliss (2009). "HCN1 channel subunits are a molecular substrate for hypnotic actions of ketamine." *The Journal of Neuroscience* 29(3): 600-609.
- Clements, J., W. Nimmo and I. Grant (1982). "Bioavailability, pharmacokinetics, and analgesic activity of ketamine in humans." *Journal of pharmaceutical sciences* 71(5): 539-542.
- Copeland, R. A. and J. Reley (1996). *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, VCH Publishers New York:.
- Cotreau, M. M., L. L. von Moltke and D. J. Greenblatt (2005). "The influence of age and sex on the clearance of cytochrome P450 3A substrates." *Clinical pharmacokinetics* 44(1): 33-60.
- Craven, R. (2007). "Ketamine." *Anaesthesia* 62 Suppl 1: 48-53.
- Cummins, C. L., C. Y. Wu and L. Z. Benet (2002). "Sex-related differences in the clearance of cytochrome P450 3A4 substrates may be caused by P-glycoprotein." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 72(5): 474-489.
- Dahmani, S., C. Brasher, I. Stany, J. Golmard, A. Skhiri, B. Bruneau, Y. Nivoche, I. Constant and I. Murat (2010). "Premedication with clonidine is superior to benzodiazepines. A meta analysis of published studies." *Acta Anaesthesiol Scand* 54(4): 397-402.
- Dawling, S. and P. Crome (1989). "Clinical pharmacokinetic considerations in the elderly." *Clinical pharmacokinetics* 17(4): 236-263.
- Dayton, P., R. Stiller, D. Cook and J. Perel (1983). "The binding of ketamine to plasma proteins: emphasis on human plasma." *European journal of clinical pharmacology* 24(6): 825-831.
- de Hoffmann, E. and V. Stroobant (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Wiley.
- Depaz, I. M. B., F. Toselli, P. A. Wilce and E. M. Gillam (2013). "Differential expression of human cytochrome P450 enzymes from the CYP3A subfamily in the brains of alcoholic subjects and drug-free controls." *Drug Metabolism and Disposition* 41(6): 1187-1194.

- Depaz, I. M. B., F. Toselli, P. A. Wilce and E. M. Gillam (2015). "Differential expression of cytochrome P450 enzymes from the CYP2C subfamily in the human brain." *Drug Metabolism and Disposition* 43(3): 353-357.
- Duffus, J. H., M. Nordberg and D. M. Templeton (2007). "Glossary of terms used in toxicology, (IUPAC recommendations 2007)." *Pure and Applied Chemistry* 79(7): 1153-1344.
- Duman, R. S., N. Li, R.-J. Liu, V. Duric and G. Aghajanian (2012). "Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine." *Neuropharmacology* 62(1): 35-41.
- Dundee, J., N. Halliday, K. Harper and R. Brogden (1984). "Midazolam." *Drugs* 28(6): 519-543.
- Eide, P. K. (2000). "Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. » *European Journal of Pain* 4(1): 5-15.
- Evans, M. S. and K. E. Viola-McCabe (1996). "Midazolam inhibits long-term potentiation through modulation of GABA A receptors." *Neuropharmacology* 35(3): 347-357.
- Favetta, P., J. Guitton, C. Degoute, L. Van Daele and R. Bouliou (2000). "High-performance liquid chromatographic assay to detect hydroxylate and conjugate metabolites of propofol in human urine." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 742(1): 25-35.
- Fazi, L., E. C. Jantzen, J. B. Rose, C. D. Kurth and M. F. Watcha (2001). "A comparison of oral clonidine and oral midazolam as preanesthetic medications in the pediatric tonsillectomy patient." *Anesth Analg* 92(1): 56-61.
- Fish, R., P. J. Danneman, M. Brown and A. Karas (2011). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, Elsevier Science.
- Flecknell, P. (2015). *Laboratory animal anaesthesia*. Academic Press.
- Food and Drug Administration (2014). *Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers*, U.S. Food and Drug Administration.
- Fox, J. G., L. C. Anderson, F. M. Loew and F. W. Quimby (2002). *Laboratory Animal Medicine*, Elsevier Science.
- Gagliese, L. and R. Melzack (1997). "Chronic pain in elderly people." *Pain* 70(1): 3-14.
- Giroux, M.C., Santamaria, R., Hélie, P., Burns, P., Beaudry, F. and Vachon, P. (2015). Physiological, pharmacokinetic and liver metabolism comparisons between 3-, 6-, 12- and 18- month-old male Sprague Dawley rats under ketamine-xylazine anesthesia. *Experimental Animals* 65(1): 63-75

Golan, D. E., A. H. Tashjian and E. J. Armstrong (2011). Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy, Wolters Kluwer Health.

Gramer, I., R. Leidolf, B. Doring, S. Klintzsch, E. M. Kramer, E. Yalcin, E. Petzinger and J. Geyer (2011). "Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs." *Vet J* 189(1): 67-71.

Grant, I., W. Nimmo and J. Clements (1981). "Pharmacokinetics and analgesic effects of im and oral ketamine." *British Journal of Anaesthesia* 53(8): 805-810.

Green, S. M., G. Andolfatto and B. S. Krauss (2015). "Ketamine and intracranial pressure: no contraindication except hydrocephalus." *Annals of emergency medicine* 1(65): 52-54.

Grint, N. J. and P. J. Murison (2008). "A comparison of ketamine-midazolam and ketamine-medetomidine combinations for induction of anaesthesia in rabbits." *Vet Anaesth Analg* 35(2): 113-121.

Guillouzo, A., A. Corlu, C. Aninat, D. Glaise, F. Morel and C. Guguen-Guillouzo (2007). "The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics." *Chemico-biological interactions* 168(1): 66-73.

Gupta, R. C. (2011). *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, Elsevier Science.

Halama, B., N. Hohmann, J. Burhenne, J. Weiss, G. Mikus and W. E. Haefeli (2013). "A nanogram dose of the CYP3A probe substrate midazolam to evaluate drug interactions." *Clin Pharmacol Ther* 93(6): 564-571.

Han Le, S. A., Eva Tan. (2016). "Michaelis-Menten Kinetics." 2016, from http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Biological_Chemistry/Catalysts/Enzymatic_Kinetics/Michaelis-Menten_Kinetics.

Hans, P. and V. Bonhomme (2006). "Why we still use intravenous drugs as the basic regimen for neurosurgical anaesthesia." *Curr Opin Anaesthesiol* 19(5): 498-503.

Heftmann, E. (2004). *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques*, Elsevier Science.

Hijazi, Y. and R. Boulieu (2002). "Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 Isoforms to N-Demethylation of Ketamine in Human Liver Microsomes." *Drug Metabolism and Disposition* 30(7): 853-858.

Hijazi, Y. and R. Boulieu (2002). "Protein binding of ketamine and its active metabolites to human serum." *European journal of clinical pharmacology* 58(1): 37-40.

Hopfgartner, G., C. Husser and M. Zell (2003). "Rapid screening and characterization of drug metabolites using a new quadrupole-linear ion trap mass spectrometer." *Journal of mass spectrometry* 38(2): 138-150.

Hu, Z.-Y. and Y.-S. Zhao (2010). "Sex-dependent differences in cytochrome P450 3A activity as assessed by midazolam disposition in humans: a meta-analysis." *Drug Metabolism and Disposition* 38(5): 817-823.

Johnson, K. A. and R. S. Goody (2011). "The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper." *Biochemistry* 50(39): 8264-8269.

Johnson, T. N., A. Rostami-Hodjegan, J. M. Goddard, M. S. Tanner and G. T. Tucker (2002). "Contribution of midazolam and its 1-hydroxy metabolite to preoperative sedation in children: a pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis." *Br J Anaesth* 89(3): 428-437.

Julius, D. and A. I. Basbaum (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* 413(6852): 203-210.

Kain, Z. N., M. B. Hofstadter, L. C. Mayes, D. M. Krivutza, G. Alexander, S. M. Wang and J. S. Reznick (2000). "Midazolam: effects on amnesia and anxiety in children." *Anesthesiology* 93(3): 676-684.

Kain, Z. N., L. C. Mayes, C. Bell, S. Weisman, M. B. Hofstadter and S. Rimar (1997). "Premedication in the United States: a status report." *Anesth Analg* 84(2): 427-432.

Kanazawa, H., A. Okada, E. Igarashi, M. Higaki, T. Miyabe, T. Sano and R. Nishimura (2004). "Determination of midazolam and its metabolite as a probe for cytochrome P450 3A4 phenotype by liquid chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1031(1): 213-218.

Karapinar, B., D. Yilmaz, K. Demirag and M. Kantar (2006). "Sedation with intravenous ketamine and midazolam for painful procedures in children." *Pediatr Int* 48(2): 146-151.

Kashuba, A. D. and A. N. Nafziger (1998). "Physiological changes during the menstrual cycle and their effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs." *Clinical pharmacokinetics* 34(3): 203-218.

Alexander, K., Kona-Boun, J.-J., Nadeau, M.-È., Paquette, D. (2010). Colloque gériatrie. AMVQ - Colloque sur la gériatrie, Académie de médecine vétérinaire du Québec.

Katsma, D. L. and C. H. Souza (2000). "Elderly pain assessment and pain management knowledge of long-term care nurses." *Pain Management Nursing* 1(3): 88-95.

Kebarle, P. and M. Peschke (2000). "On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions." *Analytica Chimica Acta* 406(1): 11-35.

- Kennedy, R. M., F. L. Porter, J. P. Miller and D. M. Jaffe (1998). "Comparison of fentanyl/ midazolam with ketamine/midazolam for pediatric orthopedic emergencies." *Pediatrics* 102(4): 956-963.
- Kettner, N. W. (2008). *The functional neuroanatomy of pain perception. Integrative Pain Medicine*, Springer: 63-83.
- Kim, S. K. (2007). "Common aging pathways in worms, flies, mice and humans." *Journal of Experimental Biology* 210(9): 1607-1612.
- Kirn, R. B., C. Wandel, B. Leake, M. Cvetkovic, M. F. Fromm, P. J. Dempsey, M. M. Roden, F. Belas, A. K. Chaudhary and D. M. Roden (1999). "Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein." *Pharmaceutical research* 16(3): 408-414.
- Klotz, U. (2009). "Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly." *Drug metabolism reviews* 41(2): 67-76.
- Kolars, J. C., W. M. Awni, R. M. Merion and P. B. Watkins (1991). "First-pass metabolism of cyclosporin by the gut." *Lancet* 338(8781): 1488-1490.
- Kolenda, H., A. Gremmelt, S. Rading, U. Braun and E. Markakis (1996). "Ketamine for analgosedative therapy in intensive care treatment of head-injured patients." *Acta neurochirurgica* 138(10): 1193-1199.
- Korfmacher, W. A. (2005). "Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery." *Drug discovery today* 10(20): 1357-1367.
- Lahat, E., M. Goldman, J. Barr, T. Bistrizter and M. Berkovitch (2000). "Comparison of intranasal midazolam with intravenous diazepam for treating febrile seizures in children: prospective randomised study." *Bmj* 321(7253): 83-86.
- Lautenbacher, S. and R. B. Fillingim (2004). *Pathophysiology of Pain Perception*, Springer US.
- Lavandera, J., S. Ruspini, A. Battle and A. M. Buzaleh (2015). "Cytochrome P450 expression in mouse brain: specific isoenzymes involved in Phase I metabolizing system of porphyrinogenic agents in both microsomes and mitochondria." *Biochem Cell Biol* 93(1): 102-107.
- Livingston, A. and A. Waterman (1978). "The development of tolerance to ketamine in rats and the significance of hepatic metabolism." *British journal of pharmacology* 64(1): 63-69.
- Lo, J. N. and Cumming, J. F. (1975). Interaction between sedative premedicants and ketamine in man in isolated perfused rat livers. *Anesthesiology*, 43(3), 307-312.

Loflin, R. and A. Koyfman (2015). "When used for sedation, does ketamine increase intracranial pressure more than fentanyl or sufentanil?" *Annals of emergency medicine* 65(1): 55.

Lower, S. (2010, 2015-10-19). "Chem1 Virtual Textbook." 2016, from <http://www.chem1.com/acad/webtext/dynamics/dynamics-2.html#4B>.

Lu, Y.-F., T. Jin, Y. Xu, D. Zhang, Q. Wu, Y.-K. J. Zhang and J. Liu (2013). "Sex differences in the circadian variation of cytochrome p450 genes and corresponding nuclear receptors in mouse liver." *Chronobiology international* 30(9): 1135-1143.

Macdonald, R. L. and R. W. Olsen (1994). "GABAA receptor channels." *Annual review of neuroscience* 17(1): 569-602.

MacPherson, R. D., D. Woods and J. Penfold (2008). "Ketamine and midazolam delivered by patient-controlled analgesia in relieving pain associated with burns dressings." *The Clinical journal of pain* 24(7): 568-571.

Mandema, J. W., B. Tuk, A. L. van Steveninck, D. D. Breimer, A. F. Cohen and M. Danhof (1992). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite alpha-hydroxymidazolam in healthy volunteers." *Clin Pharmacol Ther* 51(6): 715-728.

Mandema, J. W., Tukker, E. and Danhof, M. (1991). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the EEG effects of midazolam in individual rats: influence of rate and route of administration. *British journal of pharmacology*, 102(3), 663-668.

Marlow, R., D. L. Reich, S. Neustein and G. Silvey (1991). "Haemodynamic response to induction of anaesthesia with ketamine/midazolam." *Canadian journal of anaesthesia* 38(7): 844-848.

Martignoni, M., G. M. Groothuis and R. de Kanter (2006). "Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 2(6): 875-894.

McFadyen, M. C., W. T. Melvin and G. I. Murray (1998). "Regional distribution of individual forms of cytochrome P450 mRNA in normal adult human brain." *Biochemical pharmacology* 55(6): 825-830.

McMillan, D. M. and R. F. Tyndale (2015). "Nicotine Increases Codeine Analgesia Through the Induction of Brain CYP2D and Central Activation of Codeine to Morphine." *Neuropsychopharmacology* 40(7): 1804-1812.

Meibohm, B., I. Beierle and H. Derendorf (2002). "How important are gender differences in pharmacokinetics?" *Clinical pharmacokinetics* 41(5): 329-342.

Meziere, A., E. Paillaud and B. Plaud (2013). "[Anesthesia in the elderly]." *Presse medicale* (Paris, France: 1983) 42(2): 197-201.

Michaelis, L. and M. L. Menten (1913). "Die kinetik der invertinwirkung." *Biochem. z* 49(333-369): 352.

Mooiman, K. D., R. F. Maas-Bakker, H. Rosing, J. H. Beijnen, J. H. Schellens and I. Meijerman (2013). "Development and validation of a LC-MS/MS method for the in vitro analysis of 1- hydroxymidazolam in human liver microsomes: application for determining CYP3A4 inhibition in complex matrix mixtures." *Biomed Chromatogr* 27(9): 1107-1116.

Muriel, V. C., G. J. Pérez-Castejón, M. I. Sánchez and A. M. Neira (2007). "[Effectiveness and safety of transdermal buprenorphine for chronic pain treatment in the elderly: a prospective observational study]." *Medicina clínica* 128(6): 204-210.

Murray, R. K., D. A. Bender, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. Weil and K. M. Botham (2010). *Biochimie de Harper, De Boeck Supérieur*.

Nagahara, A. H., D. A. Merrill, G. Coppola, S. Tsukada, B. E. Schroeder, G. M. Shaked, L. Wang, A. Blesch, A. Kim and J. M. Conner (2009). "Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease." *Nature medicine* 15(3): 331-337.

Nguyen, S. and J. B. Fenn (2007). "Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(4): 1111-1117.

Nishimura, M., H. Yaguti, H. Yoshitsugu, S. Naito and T. Satoh (2003). "Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR." *Yakugaku Zasshi* 123(5): 369-375.

Noppers, I., E. Olofsen, M. Niesters, L. Aarts, R. Mooren, A. Dahan, E. Kharasch and E. Sarton (2011). "Effect of rifampicin on S-ketamine and S-norketamine plasma concentrations in healthy volunteers after intravenous S-ketamine administration." *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 114(6): 1435-1445.

O'Malley, K., J. Crooks, E. Duke and I. Stevenson (1971). "Effect of age and sex on human drug metabolism." *BMJ* 3(5775): 607-609.

Oda, Y., K. Mizutani, I. Hase, T. Nakamoto, N. Hamaoka and A. Asada (1999). "Fentanyl inhibits metabolism of midazolam: competitive inhibition of CYP3A4 in vitro." *British journal of anaesthesia* 82(6): 900-903.

Ogu, C. C. and J. L. Maxa (2000). Drug interactions due to cytochrome P450. Baylor University Medical Center. Proceedings, Baylor University Medical Center.

Organization, W. H. (2016). "Definition of an older or elderly person." 2016, from [http:// www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/](http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/).

Pailleux, F. (2013). Étude des tachykinines et de leurs dérivés peptidiques associés à la douleur neuropathique grâce à l'utilisation de modèles animaux et de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. Ph.D., Université de Montréal.

Pailleux, F. and F. Beaudry (2012). "Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Biomedical Chromatography* 26(8): 881-891.

Paine, M. F., H. L. Hart, S. S. Ludington, R. L. Haining, A. E. Rettie and D. C. Zeldin (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." *Drug Metab Dispos* 34(5): 880-886.

Paine, M. F., D. D. Shen, K. L. Kunze, J. D. Perkins, C. L. Marsh, J. P. McVicar, D. M. Barr, B. S. Gillies and K. E. Thummel (1996). "First-pass metabolism of midazolam by the human intestine." *Clin Pharmacol Ther* 60(1): 14-24.

Pellier, I., J. P. Monrigal, P. Le Moine, B. Rod, X. Riolland and J. C. Granry (1999). "Use of intravenous ketamine-midazolam association for pain procedures in children with cancer. A prospective study." *Paediatr Anaesth* 9(1): 61-68.

Peter Abboud, J. C., Kristopher Restel. (2016). "Enzyme Inhibition." 2016, from http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Biological_Chemistry/Catalysts/Enzymatic_Kinetics/Enzyme_Inhibition.

Petrenko, A. B., T. Yamakura, N. Fujiwara, A. R. Askalany, H. Baba and K. Sakimura (2004). "Reduced sensitivity to ketamine and pentobarbital in mice lacking the N-methyl-D-aspartate receptor GluR1 subunit." *Anesthesia & Analgesia* 99(4): 1136-1140.

Petrenko, A. B., T. Yamakura, T. Kohno, K. Sakimura and H. Baba (2013). "Increased brain monoaminergic tone after the NMDA receptor GluN2A subunit gene knockout is responsible for resistance to the hypnotic effect of nitrous oxide." *European journal of pharmacology* 698(1): 200-205.

Phillips, P. M., K. A. Jarema, D. M. Kurtz and R. C. MacPhail (2010). "An observational assessment method for aging laboratory rats." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49(6): 792-799.

Plumb, D. C. (2011). *Plumb's veterinary drug handbook*. Stockholm, Wis. : Ames Iowa, Stockholm, Wis. : PharmaVet Ames Iowa : Distributed by John Wiley & Sons Inc.

- Remérand, F., C. Le Tendre, A. Baud, C. Couvret, X. Pourrat, L. Favard, M. Laffon and J. Fusciardi (2009). "The early and delayed analgesic effects of ketamine after total hip arthroplasty: a prospective, randomized, controlled, double-blind study." *Anesthesia & Analgesia* 109(6): 1963-1971.
- Renaud, H. J., J. Y. Cui, M. Khan and C. D. Klaassen (2011). "Tissue distribution and gender- divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice." *Toxicological Sciences*: kfr240.
- Royal Society of Chemistry (2013). "Ketamine." 2016, URL : <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m6613/ketamine?q=authorize>.
- Royal Society of Chemistry (2013). "Ketoconazole." 2016, URL : <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m6619/ketoconazole?q=authorize>
- Royal Society of Chemistry (2013). "Midazolam." 2016, URL : <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7531/midazolam?q=authorize>.
- Schwartz, J. B. (2003). "The influence of sex on pharmacokinetics." *Clinical pharmacokinetics* 42(2): 107-121.
- Seo, K.-A., S. K. Bae, Y.-K. Choi, C. S. Choi, K.-H. Liu and J.-G. Shin (2010). "Metabolism of 1'- and 4-hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDP- glucuronosyltransferases 1A4, 2B4, and 2B7." *Drug Metabolism and Disposition* 38(11): 2007-2013.
- Sherwin, T. S., S. M. Green, A. Khan, D. S. Chapman and B. Dannenberg (2000). "Does adjunctive midazolam reduce recovery agitation after ketamine sedation for pediatric procedures? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Annals of emergency medicine* 35(3): 229-238.
- Shi, S., K. Mörike and U. Klotz (2008). "The clinical implications of ageing for rational drug therapy." *European journal of clinical pharmacology* 64(2): 183-199.
- Sjaastad, O. V., K. Hove and O. Sand (2010). *Physiology of Domestic Animals*, Scandinavian Veterinary Press.
- Sleigh, J., M. Harvey, L. Voss and B. Denny (2014). "Ketamine–More mechanisms of action than just NMDA blockade." *Trends in Anaesthesia and Critical Care* 4(2): 76-81.
- Soares, R., C. Franco, E. Pires, M. Ventosa, R. Palhinhos, K. Koci, A. M. de Almeida and A. V. Coelho (2012). "Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species." *Journal of proteomics* 75(14): 4190-4206.

Sotaniemi, E. A., A. J. Arranto, O. Pelkonen and M. Pasanen (1997). "Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathologic conditions." *Clin Pharmacol Ther* 61(3): 331-339.

Takehita, H., Y. Okuda and A. Sari (1972). "The effects of ketamine on cerebral circulation and metabolism in man." *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 36(1): 69-75.

Tanaka, E. (1998). "In vivo age-related changes in hepatic drug-oxidizing capacity in humans." *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 23(4): 247-255.

Tozer, T. N. and M. Rowland (2006). *Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Quantitative Basis of Drug Therapy*, Lippincott Williams & Wilkins.

United Nations. (2007). *World population Ageing*. United Nations Department of Economic and Social Affairs, URL : <http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeingReport2007.pdf>

Veilleux-Lemieux, D., A. Castel, D. Carrier, F. Beaudry and P. Vachon (2013). "Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague–Dawley rats." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 52(5): 567.

Wang, G. and R. B. Cole (2000). "Charged residue versus ion evaporation for formation of alkali metal halide cluster ions in ESI." *Analytica Chimica Acta* 406(1): 53-65.

Wang, X., X. Ding, Y. Tong, J. Zong, X. Zhao, H. Ren and Q. Li (2014). "Ketamine does not increase intracranial pressure compared with opioids: meta-analysis of randomized controlled trials." *Journal of anesthesia* 28(6): 821-827.

Waters. (2016). "HPLC - High Performance Liquid Chromatography." Retrieved 25/07/2016, from http://www.waters.com/waters/fr_FR/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?locale=fr_FR&cid=10048919.

Wathen, J. E., M. G. Roback, T. Mackenzie and J. P. Bothner (2000). "Does midazolam alter the clinical effects of intravenous ketamine sedation in children? A double-blind, randomized, controlled, emergency department trial." *Annals of emergency medicine* 36(6): 579-588.

White, P. F., J. Schuttler, A. Shafer, D. R. Stanski, Y. Horai and A. J. Trevor (1985). "Comparative pharmacology of the ketamine isomers. Studies in volunteers." *Br J Anaesth* 57(2): 197-203.

Woodhouse, K. and H. Wynne (1988). "Age-related changes in liver size and hepatic blood flow." *Clinical pharmacokinetics* 15(5): 287-294.

- Yamasaki, K., K. Kuroe and R. Kamimura (2003). "A new method of inhalation anesthesia with nasopharyngeal insufflation in rat experiment." *Exp Anim* 52(4): 349-351.
- Yan, Z. and G. W. Caldwell (2001). "Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery." *Current topics in medicinal chemistry* 1(5): 403-425.
- Yanagihara, Y., S. Kariya, M. Ohtani, K. Uchino, T. Aoyama, Y. Yamamura and T. Iga (2001). "Involvement of CYP2B6 in n-demethylation of ketamine in human liver microsomes." *Drug metabolism and disposition* 29(6): 887-890.
- Yano, J. K., M. R. Wester, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout and E. F. Johnson (2004). "The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution." *Journal of Biological Chemistry* 279(37): 38091-38094.
- Young, C., V. Jevtovic-Todorovic, Y. Q. Qin, T. Tenkova, H. Wang, J. Labruyere and J. W. Olney (2005). "Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain." *British journal of pharmacology* 146(2): 189-197.
- Zhang, Y. L., P. B. Zhang, S. D. Qiu, Y. Liu, Y. F. Tian and Y. Wang (2006). "Effects of ketamine-midazolam anesthesia on the expression of NMDA and AMPA receptor subunit in the peri- infarction of rat brain." *Chin Med J (Engl)* 119(18): 1555-1562.
- Zhou, C., J. E. Douglas, N. N. Kumar, S. Shu, D. A. Bayliss and X. Chen (2013). "Forebrain HCN1 channels contribute to hypnotic actions of ketamine." *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 118(4): 785-795.
- Zhou, K., J. Y. Khokhar, B. Zhao and R. F. Tyndale (2013). "First demonstration that brain CYP2D-mediated opiate metabolic activation alters analgesia in vivo." *Biochemical pharmacology* 85(12): 1848-1855.
- Ziegler, W. H., E. Schalch, B. Leishman and M. Eckert (1983). "Comparison of the effects of intravenously administered midazolam, triazolam and their hydroxy metabolites." *Br J Clin Pharmacol* 16 Suppl 1: 63s-69s.

Annexe 1

Le troisième et dernier volet du projet consistait à évaluer la contribution du cerveau au métabolisme de la kétamine ainsi qu'évaluer l'impact de l'âge sur le métabolisme cérébral (Figure 22). L'expérience a été effectuée à partir de fractions S9 de cerveau de rats de 3 mois et les résultats ont été peu concluants. Lors de l'évaluation de la stabilité métabolique, entre le temps initial de la réaction et 60 minutes, nous n'avons obtenu aucune dégradation significative de la kétamine ou du midazolam. Ensuite, nous avons refait le même protocole avec des substrats du CYP3A et CYP2D (dextrométhorphan et codéine) afin de valider nos observations: toujours aucune dégradation. Toutefois, comme souligné dans la revue de littérature, d'autres scientifiques ont démontré la présence de CYP3A dans le cerveau et une contribution importante de cet organe au métabolisme de diverses molécules, dont entre autres des substrats du CYP2D (Depaz, Toselli et al. 2013, Zhou, Khokhar et al. 2013, McMillan and Tyndale 2015). Comme le coeur de notre projet portait sur l'évaluation du métabolisme hépatique, nous n'avons qu'explorer brièvement le métabolisme cérébral; nous n'avons pas eu le temps nécessaire pour mettre à l'épreuve d'autres protocoles. Cependant, avant de tirer des conclusions sur ce sujet, il nous faudrait faire un travail plus extensif.

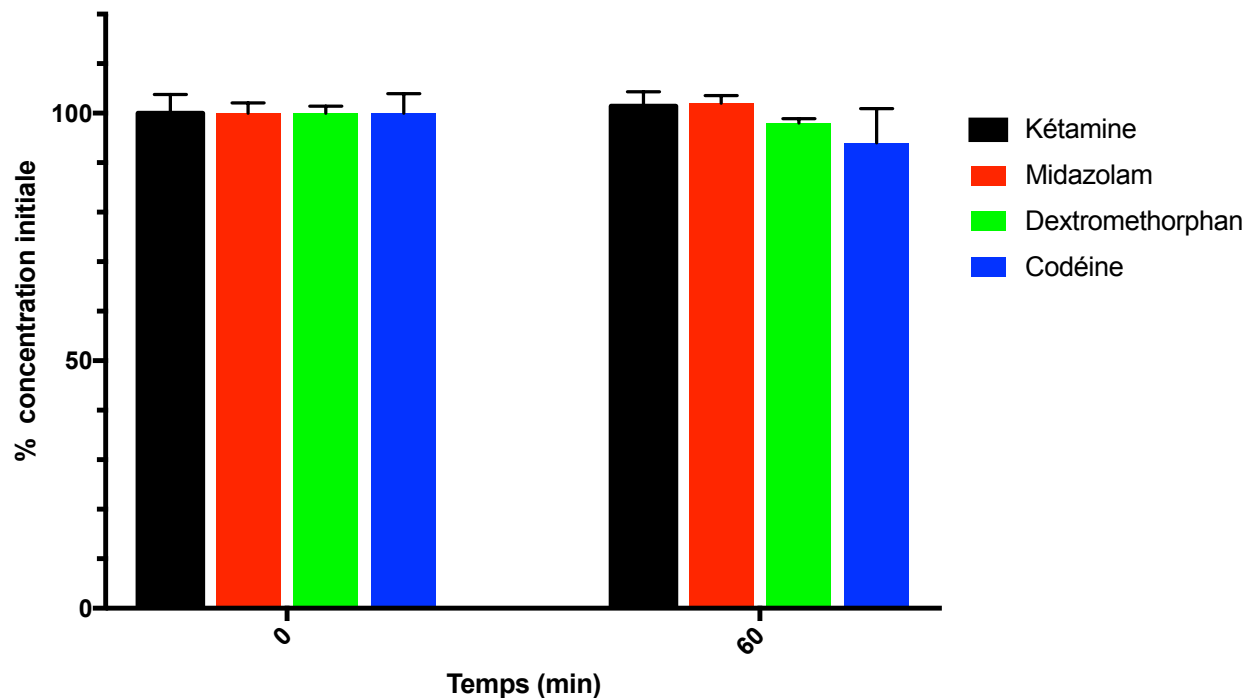


Figure 22 : Graphique de la stabilité métabolique de la kétamine, du midazolam, du dextrométhorphan et de la codéine. Entre le temps initial de la réaction et 60 minutes, aucune dégradation significative n'a lieu.

Annexe 2

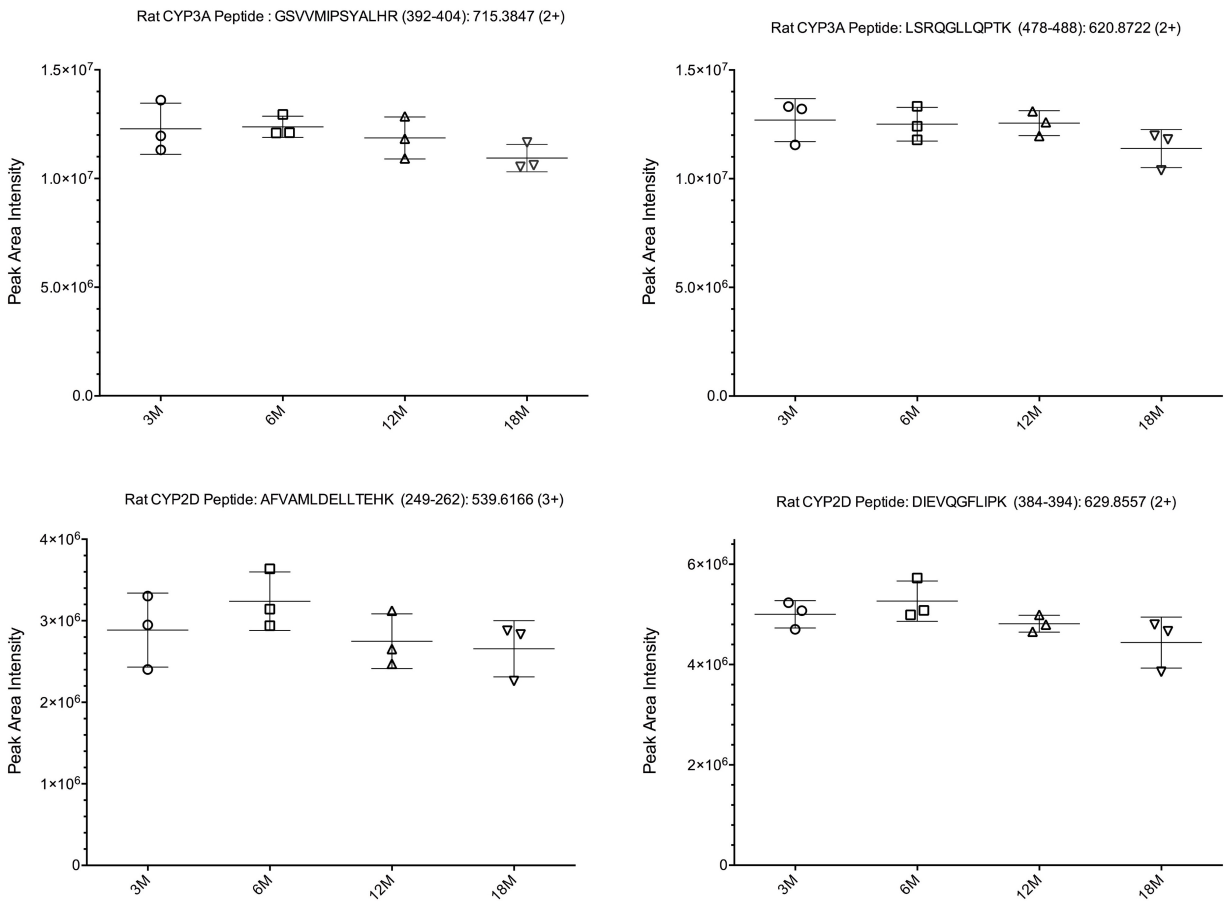


Figure 23 : Concentration de peptides obtenus par digestion tryptique de CYP3A et CYP2D. Aucune différence significative n'a été obtenue entre les différents groupes d'âge suggérant que l'âge n'influence pas la production de CYP450 et donc renforçant la théorie qu'il s'agirait d'une modification de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme.

Annexe 3

L'annexe 3 consiste en l'article original publié à partir des données *in vitro* et *in vivo* qui sont le fruit de la collaboration des membres de notre laboratoire. Dans le cadre de mon mémoire, j'ai choisi de placer cet article en annexe pour laisser place à un autre article publié dans la base de données ArXiv reprenant les résultats *in vitro* avec plus de détails. De cette façon, le lecteur peut avoir une meilleure compréhension des notions fondamentales de la partie *in vitro* et il peut ensuite consulter l'annexe 3 pour mieux comprendre les répercussions sur les paramètres *in vivo*.

Physiological, pharmacokinetic and liver metabolism comparisons between 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats under ketamine-xylazine anesthesia

Marie-Chantal GIROUX¹⁾, Raphael SANTAMARIA¹⁾, Pierre HÉLIE²⁾, Patrick BURNS³⁾, Francis BEAUDRY¹⁾, Pascal VACHON^{1,4)}*

Marie-Chantal Giroux and Raphael Santamaria contributed equally to this work.

Faculty of Veterinary Medicine, Departments of ¹⁾Veterinary Biomedicine ²⁾ Pathology and Microbiology and ³⁾ Veterinary Clinical Sciences, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada , ⁴⁾Ste-Justine Hospital Research Center, Montréal, Canada

Address corresponding: P. Vachon, Department of Veterinary Medicine Biomedicine, Faculty of Veterinary, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe Qc, Canada J2S 2M2

Published in :

Giroux, M.C., Santamaria, R., Hélie, P., Burns, P., Beaudry, F. and Vachon, P. (2015). Physiological, pharmacokinetic and liver metabolism comparisons between 3-, 6-, 12- and 18- month-old male Sprague Dawley rats under ketamine-xylazine anesthesia. *Experimental Animals* **65**(1): 63-75

Abstract

The main objective of this study was to compare the physiological changes (withdrawal and corneal reflexes, respiratory and cardiac frequency, blood oxygen saturation and rectal temperature) following the intraperitoneal administration of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) to 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats (n=6/age group). Plasma pharmacokinetics, liver metabolism and blood biochemistry were performed for a limited number of animals to better explain anesthetic drug effects. Selected organs were collected for histopathology. Results show that withdrawal and corneal reflexes suggest a shorter duration and decreased depth of anesthesia with aging. Significant cardiac and respiratory depression, as well as decreased blood oxygen saturation, occurred in all age groups, however cardiac frequency was the most affected parameter with aging since 6-, 12- and 18-month-old animals did not recuperate to normal value during recovery from anesthesia. Pharmacokinetic parameters ($T_{1/2}$ and AUC) increased and drug clearance decreased with aging, which strongly suggests that drug exposure is associated with the physiological results. Findings with liver S9 fractions of 18-month-old rats compared to other age groups suggest that following a normal ketamine anesthetic dose (80 mg/kg), drug metabolism is impaired leading to a significant increase of drug exposure. In conclusion, age and the related factors have a substantial effect on ketamine and xylazine availability reflected by significant changes in pharmacokinetics and liver metabolism on these drugs, which translates into shorter and less effective anesthesia with increasing age.

Key words: anesthesia, ketamine, xylazine, pharmacokinetics, liver metabolism

Introduction

The combination of ketamine and xylazine (KX) is commonly used for the anesthesia of rodents [10, 33]. Ketamine is an antagonist of the NMDA glutamate receptor [6] and it can also bind to opioids and GABAergic receptors [18]. Ketamine is known for its analgesic properties and its induction of a dissociative anesthesia [9, 10]. Xylazine is an α 2-adrenergic agonist which causes sedation, analgesia and muscular relaxation [6, 10, 12]. KX combinations prove to be non-irritating and suitable for intraperitoneal injections in laboratory rats [13, 45]. The sedative and muscle relaxant properties of xylazine are beneficial because they reduce the side effects of ketamine such as tremors and muscular rigidity [37]. KX combinations induce bradycardia, hypercapnia and acidosis [35, 48]. Other adverse effects, such as respiratory depression may be additive [40]. In rodents, the KX combination causes mainly hypotension and hypoventilation [6]. KX anesthesia varies greatly between individuals and some rodents do not achieve an adequate surgical anesthesia, which is reflected by the high ranges of anesthetic doses of these drugs that are reported in the literature [6, 37].

In a previous publication [51], we showed that the pharmacokinetics of ketamine (125 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) differed greatly between young (3 months) and old (>2 yrs of age) Sprague Dawley rats. The half-lives of both ketamine and xylazine in old rats were significantly increased, which could be explained in part by a decrease function of liver enzymes with aging. However, no pharmacodynamics parameters during anesthesia were evaluated in this study, and only a limited number of organs were collected for histopathology, which limits the rationalization of these findings. No study has presently evaluated the pharmacodynamics and pharmacokinetic changes associated with this increased anesthesia effect with aging.

The main objective of this study was therefore to compare the pharmacodynamic (withdrawal and corneal reflexes) changes associated with the administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine in rats aging from 3 to 18 months, as well as other associated anesthetic changes (cardiac and respiratory frequency, blood oxygen saturation, and rectal temperature) to better understand if the anesthesia modifications with aging are progressive or modified significantly after a given age. The reduced dose of ketamine was chosen due to the severe toxicity seen in 12-month-old rats in our previous study [11]. Pharmacokinetics and blood biochemistry were performed in a reduced number of animals to explain changes associated with physiological measures that occur during anesthesia. Ketamine is metabolized primarily by the liver CYP3A [28, 37] to its active metabolite norketamine. Alterations in liver metabolism (e.g. hepatic clearance) with aging could explain the higher AUC observed in the aging rats. The aim of the *in vitro* study is to assess the influence of aging on CYP3A metabolism of ketamine using liver S9 fractions from 3-, 6-, 12- and 18-month-old rats.

Materials and methods

Subjects

Twenty-four male specific pathogen free Sprague Dawley (CrI:CD(SD)) rats from Charles River (St-Constant, QC, Canada) were used for this study. Two- and 3-month-old rats (n=6/age group) were purchased and kept until they were respectively 3 and 6 months old. Twelve 8-month-old retired breeder rats were purchased and kept until they were at 12 and 18 months of age (n=6/age group). At the time of experimentation, the 3-, 6-, 12- and 18-month-old rats weighed respectively 484.0 ± 18.0 g, 732.1 ± 50.4 g, 790.0 ± 65.1 g and 998.0 ± 74.7 g. All rats were housed in a standard laboratory animal environment, under a 12:12-hour light cycle in a controlled environment: temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity $50 \pm 20\%$ with fresh filtered air, 15 changes/hour. The rats had *ad libitum* access to food (2018 Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Teklad, Bartonville, IL, USA) and reverse osmosis water. The rats were housed individually in ventilated cages (Green Line IVC Sealsafe Plus, Tecniplast, USA) changed once a week. They were housed on Corncob bedding (7097 corncob, Harlan Teklad, Bartonville, IL, USA) and they had a high temperature polycarbonate rat retreat (Bio-serv, Flemington, NJ, USA) and one Nylabone (Bioserv, Flemington, NJ, USA) for environmental enrichment. The Institutional Animal Care and Use Committee of the Ste-Justine Hospital Research Center approved the protocol prior to animal use in agreement with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care [3].

Treatments

The study was performed in two phases. Rats were first examined for physiological changes and reflexes following KX administration. The pharmacokinetics of KX administration was then evaluated in 3 animals of each age group after a one week washout period. It was considered that this interval was sufficient since repeated administration of ketamine will only affect the drug efficacy when rats receive moderate doses (40 mg/kg) of ketamine for 10 consecutive days [52]. The other 3 animals of each group were used to evaluate *in vitro* liver metabolism. For both study phases, animals received 80 mg/kg of ketamine (Ketalean, Bimeda-MT, Cambridge, ON, Canada) and 10 mg/kg of xylazine (Xylamax, Bimeda-MTC, Cambridge, ON, Canada) intraperitoneally and received non-medicated ophthalmic gel to maintain a good lubrication of the cornea following KX induction. Animals remained on a circulating hot water blanket (Heat-therapy pump, Kent Scientific, Harrington, CT, USA) during anesthesia up to recovery.

Evaluation of reflexes and physiological changes

Following the intraperitoneal KX injection, different parameters were monitored at chosen time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min). The corneal reflex was evaluated by softly pressing on the cornea with a cotton tip and the withdrawal reflex was assessed by pressing the interdigital hind paw skin with hemostatic forceps. A small animal oximeter (CANL-425V, Med Associates, St-Alban, VT, USA) was

used to monitor cardiac frequency and blood oxygen saturation (**SaO₂**) by taping the probe on the right hind paw. Respiratory frequency was taken over 1 min by direct observation and rectal temperature (Thermalert TH-8, Physitemp, Clifton, NJ, USA) was taken with a rectal probe. The recovery time was the time when the first voluntary movement occurred following the KX injection.

Blood sampling for the biochemistry and pharmacokinetics

During anesthesia, jugular vein blood collections (0.2 mL/time point) were rapidly collected for the pharmacokinetic study. When necessary (when the withdrawal reflex was present; after the 45, 60 and 90 min for the 3-, 6- and 12-18-month-old rats, respectively), the blood collections were performed under isoflurane anesthesia (0.5 mL/min oxygen) using a face mask for individual collections (total collection time: less than 1 min). Blood was collected in 1 mL microtainer K3-EDTA tubes (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ), preserved on ice and centrifuged within 30 min. Plasma was then collected and kept at -80°C until HPLC-MS/MS analysis. At the last blood collection of PK study, rats were euthanized with CO₂. Using the same 3 animals as for the pharmacokinetic study, intracardiac blood samples (1mL) were collected at the end of the study in serum tubes (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ, USA) for biochemistry and refrigerated until processed (within 24 h) at the diagnostic service of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal with a evaluated automatically with a Synchron CX5 Clinical System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Since all rats are under the influence of KX anesthesia, the different values obtained in each groups should vary with age. Selected biochemical parameters included glucose, blood urea nitrogen, creatinine, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total protein, albumin, and globulins. Experimental values were compared with normal ranges taken from published findings [4, 39].

Histological preparations

Immediately following euthanasia, the kidneys, liver, heart and lungs of each animal were collected and preserved in a formalin buffered solution (10%) prior to histological preparations (paraffin embedding; hematoxylin-eosin staining). Specimens were sent to the pathology department of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal for processing. All slides were evaluated by a board certified veterinary pathologist (Dr Pierre Hélie DMV, DACVP).

Bioanalytical methods and pharmacokinetics and statistical analyses

A high performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (HPLC-MS/MS) that has previously been described [44] was used for the analysis of ketamine and xylazine plasmatic concentrations. All pharmacokinetic parameters were calculated using WinNonLin 5.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA) using noncompartmental methods [36]. The elimination rate constant (K_{el}) was calculated using a minimum of three measured plasma concentrations and a terminal

elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693/k_{el}$. The area under the curve from time 0 to the last measurable concentration (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule and with the last measured plasma concentration, area under the curve extrapolated to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was calculated using $AUC_{0-t} + C_{last}/k_{el}$. Relative clearance (CL/F) was calculated by dividing administered drug dosage by the $AUC_{0-\infty}$.

Drug metabolism in liver S9 fractions

Liver S9 fractions from 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats were prepared, and Michaelis-Menten parameters were determined for primary metabolic pathways. Midazolam was used to verify and validate CYP3A activity in liver S9 fractions prepared from tissues obtained from animals of different age groups [15, 27, 41].

Ketamine, d₄-ketamine, norketamine, d₄-norketamine, midazolam, d₄-midazolam and α -hydroxymidazolam and d₄- α -hydroxymidazolam were obtained in solution from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Other chemicals, including acetonitrile, formic acid, methanol, sodium phosphate dibasic and sodium phosphate monobasic were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Commercial rat liver S9 fractions and NADPH regeneration solutions were obtained from Corning Gentest (Tewksbury, MA, USA).

For each age group, three livers were pooled and homogenized in a 50 mM TRIS-HCl buffer, pH 7.4, containing 150 mM KCl and 2 mM EDTA at a ratio of 1:4 (w:v). The homogenates were centrifuged at 9,000 g for 20 minutes. The total amount of protein in each supernatant was determined using the standard Coomassie protein assay (Bradford). Supernatant aliquots were kept at -80 °C until usage. No significant differences in total amount of proteins were noted between age groups. The incubations were performed as previously described [20, 38] and were performed minimally in triplicate. The incubations were performed at various concentrations ranging from 1 to 100 μ M of ketamine or midazolam, 0.5 mg/mL of S9 fraction proteins diluted in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Liver S9 enzyme suspensions (total volume of 100 μ L) were fortified with 5 μ L of NADPH-regenerating solution A (Corning BD Biosciences Cat. No. 451220) and 1 μ L of solution B (Corning BD Biosciences Cat. No. 451200) and preincubated at 37°C for 5 min prior the addition of ketamine or midazolam. For the determination of K_m and V_{max} , the concentration of norketamine or α -hydroxymidazolam was determined after 10 min incubation to calculate the initial rate of formation (i.e. V_i). Fifty μ L of samples were taken and mixed with 250 μ L of the deuterated internal standard solution (1 μ M d₄-norketamine or d₄- α -hydroxymidazolam in acetonitrile) in a 1.5 mL centrifuge tube. Samples were centrifuged at 12,000 g for 10 min and 200 μ L of the supernatant was transferred into an injection vial for HPLC-MS/SRM analysis.

The concentrations of norketamine and α -hydroxymidazolam were determined using an HPLC-MS/SRM assay derived from our previous publication [38]. Metabolites and corresponding deuterium-labeled molecule analogues were analyzed in full scan MS/MS using a Thermo Scientific linear ion trap mass spectrometer (Thermo LTQ-XL) and the quantification was based on specific post-processing SRM extracted ion chromatograms. The selected reaction monitoring (SRM) transitions were set to m/z 224.1 \rightarrow 179.0, 228.1 \rightarrow 183.0, 342.1 \rightarrow 297.0 and 346.1 \rightarrow 301.0 for norketamine, d₄-norketamine, α -hydroxymidazolam and d₄- α -hydroxymidazolam respectively. The analytical range used was ranging from 0.05 μ M to 50 μ M.

Michaelis-Menten equation [25] analyses were performed with PRISM (6.0f) GraphPad software (La Jolla, CA) using the non-linear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit.

The initial velocity (v_i) was determined using equation 1.

$$v_i = \frac{d[P]}{dt} = \frac{[\alpha\text{-hydroxymidazolam}]_{10\text{ min}}}{10\text{ min}} \text{ or } \frac{[\text{norketamine}]_{10\text{ min}}}{10\text{ min}} \quad (1)$$

The initial rate (v_i) was calculated based on the concentration of norketamine or α -hydroxymidazolam measured after a 10 minutes incubation of ketamine or midazolam in rat liver S9 enzyme suspensions. Additionally, the enzyme-mediated clearance ($CL_{u_{int}}$) that would occur without physiological limitations including protein binding or hepatic blood flow was determined using equation (2).

$$CL_{u_{int}} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad (2)$$

Statistics

For the physiological results (heart rate, respiratory frequency, oxygen saturation and rectal temperature), statistical analyses were performed for each age group using an analysis of variance (ANOVA) linear model with repeated measures and post hoc Dunnett test. All analyses were performed with SAS (version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to evaluate the effect of time for rectal temperature, heart rate, respiratory frequency and oxygen saturation results. An ANOVA linear model with repeated measures was used to compare the age effect. With an adjustment of alpha with a Bonferroni sequential correction, a priori contrasts were done to compare means of each group. All results are expressed as mean \pm SEM (excepted for pharmacokinetic and biochemistry results which are presented with standard deviation (SD)) and differences were considered significant at $p < 0.05$.

For the *in vitro* liver S9 fraction study, the statistical differences were assessed with a one-way ANOVA and a Tukey's multiple comparisons test using GraphPad PRISM (version 6.0f); $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Reflexes and physiological changes

The withdrawal reflex (WR) (Fig. 1) shows a clear difference in anesthesia duration between the different age groups following the administration of KX. The WR was absent in all 3- and 6-month-old animals at 15 and 30 min, whereas it was absent at 30 min only for all the 12-month-old animals. For **18-month-old animals**, only 83 % lost the reflex from 15 to 45 min. The withdrawal reflex was present again at 45, 60, 120 and 90 min for all the 3-, 6-, 12- and 18-month-old rats respectively. First voluntary movements were noted at 66.7 ± 7.3 , 88.8 ± 29.7 , 122.2 ± 16.5 and 104.3 ± 17.5 min for 3-, 6-, 12- and 18-month-old rats respectively. Corneal reflex results following KX anesthesia are shown in **Fig. 2**. The reflex was absent for all groups at **15 and 30 minutes**, except for two **3-month-old rats**. The 3 month old rats lost their corneal reflex very rapidly since it was already absent following KX administrations. The corneal reflex was present again in only 40-60 % of rats in all groups at tentatively selected time points ending evaluations when all animals had a positive corneal reflex.

Cardiac frequency (Fig. 3) varied significantly with time for the 3- ($F_{4,20}=2.71$ $P=0.05$), 6- ($F_{4,25}=3.12$ $P<0.05$), 12- ($F_{6,30}=7.13$ $P<0.01$) and 18-month-old rats ($F_{5,25}=4.61$ $P<0.01$). Significant age group differences are shown in **Fig. 3**. Respiratory frequency (Fig. 4) varied significantly with time for 3- ($F_{4,20}=6.99$ $P=0.002$), 6- ($F_{4,20}=7.21$ $P<0.001$), 12- ($F_{6,30}=4.78$ $P<0.002$) and 18-month-old rats ($F_{5,25}=6.45$ $P<0.01$). No significant age group differences occurred (Fig. 4). Blood oxygen saturation (Fig. 5) did not vary significantly for 6 month old rats but varied significantly for the 3- ($F_{4,20}=3.71$ $P=0.03$), 12- ($F_{6,30}=10.12$ $P<0.001$) and 18-month-old rats ($F_{5,25}=7.07$ $P<0.0005$). Since these comparisons were done with the 5 min time point result, this suggests that **blood oxygen saturation** returned to near normal values ($> 90\%$) at the end of the anesthesia, except for the 6-month-old rats. Significant age group differences are shown in **Fig. 5**.

Rectal temperature (Fig. 6) did not vary with time for the 3- ($F_{4,20}=1.79$ $P<0.17$), 6- ($F_{4,20}=2.30$ $P<0.09$) and 12-month-old rats ($F_{6,30}=1.32$ $P<0.28$). However rectal temperature was significantly affected for the 18-month-old rats ($F_{5,25}=5.57$ $P<0.0005$).

Pharmacokinetics

Mean pharmacokinetic parameters (\pm SD) are presented in Table 1 and mean concentration-time profiles in Fig.7. The drug exposure for both ketamine and xylazine increased with aging as with the AUC_{0-t} and

$AUC_{0-\infty}$. Compared to 3-months-old rats the ketamine exposure (AUC_{0-t}) increased by a factor of 1.98, 2.94 and 4.15 whereas for xylazine the increased by 1.33, 1.85 and 2.78 for the 6-, 12- and 18-month-old rats. The terminal elimination rate constant (K_{el}) decreased and the terminal elimination half-lives ($T_{1/2}$) increased for both ketamine and xylazine with increasing age. These parameters were not calculated for 18-month-old rats since the correlation of the data measured from the last three data points was less than 90%. The relative clearance of both drug decreased with aging. When compared to 3-month-old rats, relative clearance was decrease by 58, 74 and 77 % for ketamine and by 30, 52 and 67 % for xylazine for the 6-, 12- and 18-month-old rats respectively.

Histopathology

No lesions were observed in selected tissues from animals independently of the age group.

Blood biochemistry

Mean biochemical parameters (\pm SD) are presented in Table 2. All parameters are within normal except for an increase with age above the higher limit value for the BUN and ALT. ALT falls within normal limits if we consider post-anesthesia concentrations [50]. Glucose concentrations increased with aging being slightly above normal in 12-month-old rats and very high in 18-month-old rats. Creatinine concentrations also increased with aging but stayed within normal limits. Total proteins were within normal limits for all groups however albumin decreased with aging. In another study, it has been reported that a decrease in total proteins occurred with aging and post-KX administration [50].

Drug metabolism in liver S9 fractions

Results are coherent with kinetics following a Michaelis-Menten enzymatic reaction for all rat liver S9 fractions from all age groups (Fig. 8), and data were compatible with commercial rat liver S9 fractions (data not shown). The derived data are presented in **Table 3**. Midazolam is a well-characterized substrate of CYP3A and the primary biotransformation product is α -hydroxymidazolam. The observed K_m values were not significantly different when comparing age groups (**Table 3**). This suggests that enzyme-substrate complex structure was not significantly different between midazolam and CYP3A with age. However, the derived V_{max} suggest a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites in liver S9 fractions of 18-month-old rats, thus affecting significantly the intrinsic clearance ($CL_{u, int}$) of the drug. Interestingly for ketamine, the derived K_m value significantly changed in 18-month-old rats. This observation is very distinctive compared to rat liver CYP3A mediated metabolism of midazolam.

Discussion

In this study, ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) caused a short duration anesthesia in all 3- and 6-month-old rats however it was increased in the 12-month-old rats, and even more so in 18-month-old rats. The withdrawal reflex and the first voluntary movement following KX administrations occurred progressively later with aging. These results suggest a clear effect on anesthesia depth and duration with aging and **the related factors**. For the physiological changes seen with KX anesthesia, cardiac frequency significantly decreased for the 6-, 12- and 18-month-old animals when compared to the 3-month-old rats. Cardiac frequency remained depressed in older rats at the end of anesthesia. Respiratory frequency significantly decreased in all groups but returned to near normal values during recovery from anesthesia. The decreased blood oxygen saturation is most probably associated the decreased cardiac and respiratory frequency. These results suggest a strong effect of KX administration that was not importantly affected with aging except for cardiac frequency. Apart for the 18-month-old rats, rectal temperature did not show significant difference with aging following KX administration. Our previous results [11, 51] showed an increase in the depth and duration of KX anesthesia with increasing age although much higher doses (125 mg/kg) were administered to the animals; however cardiac and respiratory frequency as well as blood oxygen saturation were similarly affected at both 80 and 125 mg/kg with increasing age.

KX injectable anesthesia is mostly used in laboratory animals [10, 33]. Ketamine produces short unconsciousness and has analgesic properties. Xylazine is an analgesic medication used to minimize side effects of the use of ketamine such as muscle stiffness [21, 37, 46]. The analgesic and sedative properties of this drug combination leads to an increased depth of anesthesia associated with respiratory depression, bradycardia, hypercapnia and acidosis [35, 39, 48]. Our results confirm these cardiac and respiratory effects but show that the cardiac depression is more pronounced with aging, including a long recovery of respiratory frequency for the animals over 3 months of age. However blood oxygen saturation is significantly decreased in younger animals in the first 5 min following KX administration.

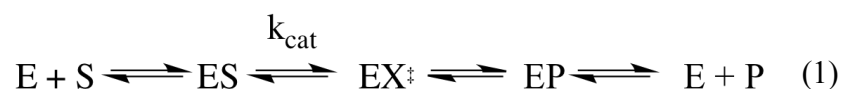
The pharmacokinetics results confirm results obtained from the withdrawal and corneal reflexes, reflective of longer anesthesia duration correlated with greater drug exposure. For both ketamine and xylazine, the drug exposure (AUC) increases, and the clearance decreases, with aging. The significant increase of the AUC for both ketamine and xylazine suggests that toxicity occurs in aged animals if higher drug concentrations are used [11]. Ketamine and xylazine half-lives are respectively 2 and 1 h in 8-12 week-old rats [50]. In our previous study, we found that the half-life of ketamine and xylazine were respectively 8.5 and 13 h in aged rats (> 2 years old) [51]. Therefore, the pharmacokinetics are affected as rats age, and this could be due to many factors. A decrease in albumin plasmatic concentrations with aging would increase the free fraction of drugs in plasma, and therefore increase anesthesia depth. Many other factors can affect the pharmacokinetics of drugs such as sex, nutrition, environmental conditions

and diseases [17, 42, 46, 51]. Many changes associated with aging could affect the metabolism of drugs such as chronic subclinical inflammation, obesity (ex. storage of the lipid soluble drugs in fat tissues) and diminished exercise [25]. We evaluated the S9 liver metabolism as it is one of the important organs responsible for drug metabolism, other being the kidney and the brain.

Ketamine is metabolized by the liver [24] into active metabolites, mainly norketamine, an NMDA receptor antagonist [16], and hydroxynorketamine, a nicotinic acetylcholine receptor antagonist [43]. Norketamine induces anesthesia whereas hydroxynorketamine is not an anesthetic [22] but possess antidepressive properties [42]. From our findings we see that formation of norketamine undergoes a very rapid saturation in the liver S9 fractions of 18-month-old rats suggesting that following a commonly administered anesthetic dose of ketamine (80 mg/kg), drug metabolism is impaired leading to a significant increase of drug exposure (AUC) and a decreased elimination. These results are in accordance with our recent *in vivo* investigation [9, 51]. Our results suggest that norketamine is mainly produced in animals of 3-6-12 months of age and would contribute much less to the anesthesia with aging. Further studies should measure the plasma concentration of norketamine to confirm this hypothesis. Xylazine is metabolized into multiple metabolites and up to 70% is eliminated in the urine [30]. Rat cytochrome P450 enzymes, mainly CYP3A, are involved in the metabolism of ketamine and xylazine [47] and qualitative changes in liver metabolism with aging could explain the high blood concentration of both drugs as the rat ages [34]. CYP2B6 plays a non-negligible role in the metabolism of ketamine however when looking at the concentration of individual CYPs, CYP 3A is predominant for the metabolism of these anesthetic drugs [32, 55]. A previous study demonstrated alterations of hepatic clearance of a CYP3A substrate, rate of absorption, and hepatic blood flow following anesthesia [52] and altogether liver metabolism appears to be one of the mechanisms to explain alterations in anesthetic drug effects. Although the liver is often assumed to be the main organ for drugs metabolism, Edwards *et al.* have shown that ketamine metabolism may also occur in the kidney and to a lesser extent in the lung and gut [8]. Also, ketamine is a racemate of equal concentrations of (R)- and (S)-enantiomers, and the (R)-enantiomer is much more potent than the (S)-enantiomer. This also holds true for the enantiomers of norketamine [7]. These findings were obtained when norketamine was evaluated as NMDA receptor antagonists in cortical and spinal cord preparation [7]. Our findings do not suggest a clear correlation between anesthesia depth and duration with liver metabolism, and this may be due in part to the metabolism in other organs, the distribution of different enantiomers in different organs, and the differences in permeability of the blood brain barrier that occurs with aging and associated factors.

K_m is an indicator of the affinity that an enzyme has for a particular substrate, hence the thermodynamic stability of the enzyme-substrate complex. The stability of the enzyme-substrate complex is closely related with the enzyme structure. It plays a central role in defining the energetically favored binding

cluster of the substrate into the active enzyme site [44]. As shown *in silico*, the structure of the binding cluster may lead to different metabolites or affect the rate of formation [47]. **Fig. 8** shows results coherent with a kinetics following a Michaelis-Menten enzymatic reaction for all rat liver S9 fractions from all age groups and data were compatible with commercial rat liver S9 fractions (data not shown). The derived data are presented in Table 3. Midazolam is a well-characterized substrate of CYP3A and the primary biotransformation product is α -hydroxymidazolam. As illustrated in Table 3 and Fig. 8, the observed K_m values were not significantly different when comparing age groups. This is interesting because it suggests that enzyme-substrate complex structure was not significantly different between midazolam and CYP3A (i.e. CYP3A1 and CYP3A2) with age. However, the derived V_{max} suggest a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites in liver S9 fractions of 18-month old rats, thus affecting significantly the intrinsic clearance ($CL_{U_{int}}$) of the drug. Interestingly for ketamine, the derived K_m value significantly changed in geriatric rats. This observation is very distinctive compared to rat liver CYP3A mediated metabolism of midazolam. The K_m value is directly related to the thermodynamic stability of the binding cluster of ketamine in the active site of CYP3A. The data indicates a significant decrease of K_m in liver S9 fractions of 18-month old rats and suggest that ketamine may have stronger interactions with CYP3A active site residues leading to a more thermodynamically stable enzyme-substrate complex. However it may also suggest that the enzyme binds the substrate more tightly and consequently necessitates more energy to form the activated transition state complex (EX^\ddagger), a necessary intermediate to form the enzyme-product complex (EP) as shown in Equation 1.



Free energy difference associated with the formation of the enzyme-substrate complex ($G_{binding}$) can have a significant impact on the observed K_m but an increase of the G^\ddagger (difference of free energy between EX^\ddagger and ES) can also significantly decrease the rate constant k_{cat} (i.e. turnover number) which represents the number of substrate molecules each enzyme site can convert to a metabolite per unit of time. The rate constant k_{cat} can be related to V_{max} using the Equation 2.

$$V_{max} = k_{cat} \times [E_{total}] \quad (2)$$

As illustrated in Fig. 8 and in Table 3, derived V_{max} values shows significant differences with age specifically when comparing with results obtain from liver S9 fractions of 18-month old rats. A decreased V_{max} suggests a rapid saturation of the CYP3A enzyme active sites similar to what has been observed with the reference CYP3A substrate midazolam. These results are therefore compatible with the formation of a more stable enzyme-substrate complex (ES) but a less favorable transition state complex (EX^\ddagger) leading to

an increase of G^\ddagger , thus a decrease of k_{cat} and V_{max} . Conformational change of the CYP3A active site with age can potentially explain these results and protein misfolding is characteristic of several age-related problems. The interaction of the active site residues is substrate dependent and the results appear to suggest that an energetically favored binding cluster of ketamine in the active site of CYP3A is observed with age but interestingly this effect was not observed for midazolam. The formation of a more stable enzyme-substrate complex (ES) may have severe consequences on drug-drug interactions, a major issue in geriatric populations. The observed $CL_{\text{u,int}}$ diminishes with aging, associated to the midazolam CYP3A catalyzed reaction, but increases for ketamine (Table 3). The calculation of $CL_{\text{u,int}}$ assumes that the concentration of the enzyme catalytic sites remain constant. This assumption cannot be made if conformational changes of the CYP3A active site occurs with aging. Consequently, the $CL_{\text{u,int}}$ cannot be compared between age groups for the ketamine CYP3A mediated reaction.

No gross pathologies were found and blood biochemistry parameters were near normal considering the effects of the KX anesthesia. With high BUN and normal creatinine concentrations, results may suggest a beginning of a subclinical renal disease however no histopathological findings were noted in older animals. High ALT and ALP may indicate the side effect of a long-term high fat diet [23, 53] however these parameters are also increased with KX anesthesia. The increasing glycemia could be caused by xylazine which is known to induce hyperglycemia [26]. Ketamine and xylazine are molecules that bind to albumin. A lower albumin plasmatic concentration seen with aging will increase the unbound fraction of ketamine and xylazine in the blood and could explain in part the longer recovery from anesthesia awakening in older rats [5]. KX anesthesia associated with hypoalbuminemia could also reflect the drug effect on hepatic metabolism even without lesions [14, 24]. In the present study, blood biochemistry and histopathology offered little explanation to physiological changes seen during KX anesthesia.

Ketamine and xylazine have a high volume of tissue distribution since they are lipophilic drugs [43]. Since rats increase their fat deposits in the organs with aging and giving that they do less exercise, this could act a storage and slow release of ketamine and xylazine. These drugs should also penetrate readily well perfused organs such as the brain however both ketamine and xylazine are known to decrease brain perfusion [21]. With aging, there is a disruption of the blood brain barrier [28, 49] making it less permeable to molecules which is caused by activation of drug efflux pumps [19]. All these characteristics explain the decrease in anesthesia depth and duration as well as longer time to recovery seen in aging animals [51]. Further studies evaluating the availability of ketamine and xylazine in brain tissue should be conducted to verify this hypothesis. However increasing the xylazine concentrations will be detrimental in aging animals since it causes pulmonary edema and effusion at high blood concentrations [1, 2, 11]. Reversing this effect with an α_2 -antagonist (ex. yohimbine) following recovery would be option that needs to be evaluated.

Conclusion

Physiological differences between experimental groups suggest that KX injectable anesthesia is a poor anesthetic choice for aging rats. Age and the related factors have a substantial effect on ketamine and xylazine availability by changing the pharmacokinetics of these drugs, which translated into shorter and less effective anesthesia in aging rats.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Guy Beauchamp, a statistician in the Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, for the statistical analyses. This study was funded by the CALAM/CALAS 2014 research fund (Pascal Vachon) as well as the Fond du Centenaire de la Faculté de Médecine Vétérinaire (Marie-Chantal Giroux and Raphaël Santamaria) and the Fond de Recherche pour la Médecine des Animaux de Laboratoire (Pascal Vachon). This project was also funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Francis .Beaudry; discovery grant no. 386637-2010). The HPLC-MS/MS analyses were performed on instruments funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (Francis Beaudry; Research Tools and Instruments Grants no. 439748-2013).

References

1. Amouzadeh, H.R., Sanqiah S., and Qualls C.W. Jr. 1989. Effects of some hepatic microsomal enzyme inducers and inhibitors on xylazine-ketamine anesthesia. *Vet. Hum. Toxicol.* 31: 532-534.
2. Amouzadeh, H.R., Qualls, C.W.Jr., Wyckoff, J.H., Dzata, G.K., Sangiah, S., Mauromoustakos, A., and Stein, L.E. 1993. Biochemical and morphological alterations in xylazine-induced pulmonary edema. *Tox. Path.* 21: 562-571.
3. Canadian Council on Animal Care. 1993. Guide to the care and use of experimental animals, Vol. 1, 2nd ed. Ottawa (Canada): Canadian Council on Animal Care.
4. Charles River [Internet] : Clinical Laboratory parameters for CRL: CD(SD) rats. 2006, Available at http://www.criver.com/files/pdfs/rm/cd/rm_rm_rc_clinical_parameters_cd_rat_06.aspx
5. Dayton, P.G., RL Stiller, R.L., Cook, D.R., and Perel, J.M. 1983. The binding of ketamine to plasma proteins: emphasis on human plasma. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24: 825-831.
6. Dittmar, M.S, Fehm, N.P., Vatankhah, B, and Markus, H. 2004. Ketamine/xylazine anesthesia for radiologic imaging of neurologically impaired rats: dose response, respiratory depression, and management of complications. *Comp. Med.* 54: 642-655.
7. Ebert, B., Mikkelsen, S., Thorkildsen, C., and Borgbjerg, F.M. 1997. Norketamine, the main metabolite of ketamine, is a non-competitive NMDA receptor antagonist in the rat cortex and spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 333: 99-104.
8. Edwards, S.R. and Mather, L.E. 2001. Tissue uptake of ketamine and norketamine enantiomers in the rat: indirect evidence for extrahepatic metabolic inversion. *Life Sci.* 69: 2051-2066.
9. Fitzgibbon, E.J., Hall, P., Schroder, C., Seely J, and Viola, R. 2002. Low dose ketamine as an analgesic adjuvant in difficult pain syndromes: a strategy for conversion from parenteral to oral ketamine. *J. Pain. Symptom Manage.* 23: 165-170.
10. Flecknell, P.A. 1996. Laboratory animal anesthesia. Academic Press, London.

11. Giroux, M.C., Hélie P., Burns, P., and Vachon, P. 2015. Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. *Exp. Anim.* 64:253-260.
12. Greene, S.A. and Thurmon, J.C. 1988. Xylazine--a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 11: 295-313.
13. Hajighahramani, S. and Vesa, N. 2007. Evaluation of several drug combinations for intraperitoneal anaesthesia in adult male rats. *Iranian J. Vet. Res.* (University of Shiraz), 8 Ser. No. 19.
14. Hijazi, Y. and Boulieu, R. 2002. Contribution of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2B6 in N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 30: 853–858.
15. Halama, B., Hohmann, N., Burhenne, J., Weiss, J., Mikus, G., and Haefeli, W.E. 2013. A nanogram dose of the CYP3A probe substrate midazolam to evaluate drug interactions. *Clin. Pharmacol. Therap.* 93: 564-571.
16. Holtman, J.R. Jr., Crooks, P.A., Johnson-Hardy, J.K., Hojomat, M., Kleven, M., and Wala. E.P. 2008. Effects of norketamine enantiomers in rodent models of persistent pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90: 676-85.
17. Jenkins, A.J. 2007. Toxicokinetics and factors affecting pharmacokinetic parameters, p. 21-24, In: Karch SB, editor. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*. CRC Press, London.
18. Knobloch, M., Portier C.J., Levionnois, O.L., Theurillat, R., Thormann, W., Spadavecchia, C., and Mevissen, M. 2006. Antinociceptive effects, metabolism and disposition of ketamine in ponies under target-controlled drug infusion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216: 373–386.
19. Krinke, G.J. and Eisenbrandt D.L. 1994. Non-neoplastic changes in the brain, p. 3-19, In: Mohr U, Dungworth DL, Capen CC, editors. *Pathobiology of the Aging Rat*, Vol. 2., ILSI Press, Washington D.C..
20. Lavoie, D.S., Pailleux, F., Vachon, P., and Beaudry, F. 2013. Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 27: 882-888.

21. Lei, H., Grinberg, O, Nwaigwe, C., Hou, H.G., Williams, C., Swartz, H.M., and Dunn, J.F. 2001. The effect of ketamine-xylazine anesthesia on cerebral blood flow oxygenation observed during nuclear magnetic resonance perfusion imaging and electron paramagnetic resonance oximetry. *Brain Res.* 913: 174-179.
22. Leung, L.Y and Baillie, T.A. (1986). Comparative pharmacology in the rat of ketamine and its two principal metabolites, norketamine and (Z)-6-hydroxynorketamine. *J. Med. Chem.* 29: 2396-2399.
23. Madsen, N.B. and Tuba, J. 1952. On the source of the alkaline phosphatase in rat serum. *J. Biol. Chem.* 195, 741-750.
24. Meyer, R.E. and Fish, R.E. 2008. Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers, p. 27-82, In: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ, editors. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. Academic Press, San Diego.
25. Mézière, A., Paillaud, E., and Plaud, B. 2013. Anesthesia in the elderly. *Presse Med* 42: 197-201.
26. Michaelis, L. and Menten, M.L. 1913. *Die Kinetik der Invertinwirkung*. *Biochemische Zeitschrift* 49: 334-336.
27. Mooiman, K.D., Maas-Bakker, R.F., Rosing, H., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., and Meijerman, I. 2013. Development and validation of a LC-MS/MS method for the in vitro analysis of 1-hydroxymidazolam in human liver microsomes: application for determining CYP3A4 inhibition in complex matrix mixtures. *Biomed. Chromatogr.* 27: 1107-1116.
28. Mooradian, A.D. 1988. Effect of aging on the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging* 9: 31-39.
29. Mössner, L.D., Schmitz, A., Theurillat, R., Thormann, W., Mevissen, M. 2011. Inhibition of cytochrome P450 enzymes involved in ketamine metabolism by use of liver microsomes and specific cytochrome P450 enzymes from horses, dogs, and humans. *Am. J. Vet. Res.* 72: 1505-1513.
30. Park Choo, H.-Y. and Choi, S.-O. 1991. The metabolism of xylazine in rats. *Arch. Pharm. Res.* 14: 346-351.

31. Plumb, D.C. 2008. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*, p. 935-938, Wiley-Blackwell, Hoboken.
32. Portmann, S., Kwana, H.Y., Theurillata, R., Schmitzb, A., Mevissenb, M., and Thormann, W. 2010. Enantioselective capillary electrophoresis for identification and characterization of human cytochrome P450 enzymes which metabolize ketamine and norketamine in vitro. *J. Chromatogr. A* 1217: 7942–7948.
33. Richardson, C.A. and Flecknell, P.A. 2005. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: Are we making progress? *Altern. Lab. Anim.* 33: 119-127.
34. Rikans, L.E. and Notley, B.A. 1982. Age-related changes in rat hepatic microsomal drug metabolism are substrate selective. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220: 574-578.
35. Rodrigues, S.F., de Oliveira, M.A., Martins, J.O., Sannomiya, P., de Cássia Tostes, R., Nigro, D., Carvalho, M.H., and Fortes, Z.B. 2006. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci.* 79: 1630-1637.
36. Rowland, M. and Towzer, T.N. 1995. *Clinical pharmacokinetics: concepts and application*, p. 367–389, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia.
37. Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K., and Jakubowski, J.A. 2005. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med.* 230: 777-784.
38. Santamaria, R., Pailleux, F., and Beaudry, F. 2014. In vitro ketamine CYP3A-mediated metabolism study using mammalian liver S9 fractions, cDNA expressed enzymes and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 28: 1660-1669
39. Sharp, P.E. and La Regina, M.C. 1998. Important biological features, p. 14-16, In: Suckow MA, editor. *The laboratory rat*, CRC Press, London.
40. Schwenke, D.O. and Cragg, P.A. 2004. Comparison of depressive effects of four anesthetic regimens on ventilator and cardiovascular variables in the guinea pig. *Comp. Med.* 54: 77-85.

41. Shimizu, M., Uno, T., Tamura, H.O., Kanazawa, H., Murakami, I., Sugawara, K., and Tateishi, T. 2007. A developed determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: application of human pharmacokinetic study for measurement of CYP3A activity. *J. Chromatogr. B.* 847: 275-281.
42. Singh, N.S., Zarate, C.A. Jr., Moaddel, R., Bernier, M., Wainer, I.W. 2014. What is hydroxynorketamine and what can it bring to neurotherapeutics? *Expert Rev. Neurother.* 14: 1239-42.
43. Song, G., Wu, H., Yoshino, K., and Zamboni, W.C. 2012. Factors affecting the pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal drugs. *J. Liposome Res.* 22: 177-92.
44. St-Germain Lavoie, D., Pailleux, F., Vachon P., and Beaudry, F. 2013. Characterization of xylazine metabolism in rat liver microsomes using liquid chromatography-hybrid triple quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Biomed. Chromatograph.* 27: 882-888.
45. Struck, M.B., Andrutis, K.A., Ramirez, H.E., and Battles, A.H. 2011. Effect of a short-term fast on ketamine-xylazine anesthesia in rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50: 344-8.
46. Sumitra, M., Manikandan P, Rao, KV, Nayeem, M., Manohar, B.M., and Puvanakrishnan, R. 2004. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats--a comparative analysis. *Life Sci.* 75: 1887-1896.
47. Sun, H. and Scott, D.O. 2010. Structure-based drug metabolism predictions for drug design. *Chem Biol Drug Des.* 75: 3-17
48. Swindle, M.M., Vogler, G.A., Fulton, L.K., Marini, R.P., and Popilskis, S. 2002. Preanesthesia, anesthesia, analgesia and euthanasia, p. 956-960, In: Franklin ML, Quimby FW, Fox JG, Anderson LC, editors. *Laboratory Animal Medicine*. Elsevier Science, Amsterdam.
49. Tucsek, Z., Toth, P., Sosnowska, D., Gautam, T., Mitschelen, M., Koller, A., Szalai, G., Sonntag, W.E., Ungvari, Z., and Csiszar, A. 2014. Obesity in aging exacerbates blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and oxidative stress in the mouse hippocampus: effects on expression of genes involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69: 1212-1226.

50. Veilleux-Lemieux, D., Beaudry, F., Hélie, P., and Vachon, P. 2012. Effects of endotoxemia on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of ketamine and xylazine anesthesia in Sprague-Dawley rats. *Vet. Med. Res. Reports* 3: 99-109.
51. Veilleux-Lemieux, D., Castel, A., Carrier, D., Beaudry, F., and Vachon, P. 2013. Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague Dawley rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52: 567-570.
52. Uhing, M.R., Beno, D.W. , Jiyamapa-Serna, V.A., Chen, Y., Galinsky, R.E., Hall, S.D., and Kimura, R.E. 2004. The effect of anesthesia and surgery on CYP3A activity in rats. *Drug Metab. Dispos.* 32: 1325–1330.
53. Uthandi, A. and Ramasamy, K. Hepatoprotective activity of sesame meal on high fat fed Wistar rats. *Int J. Pharma. Sci. Res.* 2: 205-211.
54. Waterman, A.E. and Livingston, A. 1978. Effects of age and sex on ketamine anaesthesia in the rat. *Br. J. Anaesth.* 50: 885-889.
55. Zanger, U.M. and Klein, K. 2013. Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance. *Front. Gen.* 4: 1-12.

Table 1. Mean (SD) plasmatic pharmacokinetic parameters following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) administered to male Sprague Dawley rats (n=3/group) of different ages.

Pharmacokinetic parameters (units)	Age (months)			
	3	6	12	18
Ketamine				
AUC _{0-t} (μg.h/ml)	2.02 (0.03)	4.01 (0.28) ⁴	5.88 (0.13) ^{4,3}	8.39 (0.44) ^{4,4}
AUC _{0-∞} (μg.h/ml)	3.24 (0.16)	7.77 (0.71) ¹	12.75 (2.25) ^{4,2}	13.94 (1.22) ^{4,2}
k _{el} (h ⁻¹)	0.14 (0.01)	0.08 (0.02) ²	0.07 (0.02) ^{2,ns}	ND
T _{1/2} (h)	5.61 (0.28)	8.41 (1.44) ^{ns}	10.29 (2.90) ^{2,ns}	ND
CL/F (ml·min ⁻¹)	24.76 (1.24)	10.35 (0.95) ⁴	6.41 (1.15) ^{4,1}	5.77 (0.50) ^{4,ns}
Xylazine				
AUC _{0-t} (μg.h/ml)	2.67 (0.19)	3.54 (0.17) ²	4.94 (0.35) ^{4,3}	7.42 (0.22) ^{4,3}
AUC _{0-∞} (μg.h/ml)	2.83 (0.26)	4.00 (0.11) ²	5.87 (0.01) ^{4,4}	8.56 (0.38) ^{4,4}
k _{el} (h ⁻¹)	0.34 (0.04)	0.26 (0.02) ¹	0.22 (0.05) ^{1,ns}	ND
T _{1/2} (h)	2.09 (0.29)	2.71 (0.26) ^{ns}	3.25 (0.73) ^{ns, ns}	ND
CL/F (ml·min ⁻¹)	3.55 (0.32)	2.50 (0.07) ³	1.70 (0.01) ^{4,2}	1.17 (0.05) ^{4,1}

AUC_{0-∞}, Area Under Curve extrapolated to infinity; AUC_{0-t}, Area Under Curve from time zero to the last measured concentration; k_{el}, terminal elimination rate constant; T_{1/2}, Terminal elimination half-life; CL/F, relative clearance rate; ND, Not Determined

Post Hoc Tuckey statistics reported for 6-, 12- and 18- month-old rats when compared to 3-month-old animals (first value) as well as for 6-12 and 12-18 groups (second value): ¹ p < 0.05, ² p < 0.01, ³ p < 0.001, ⁴ p < 0.0001, and ns non-significant

Table 2. Mean (SD) biochemistry parameters following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) male Sprague Dawley rats (n=3/group) of different ages.

Biochemistry parameters (units)	Normal values	Age (months)			
		3	6	12	18
Glucose (mmol/l)	4.4–16.7	9.3 (1.3)	12.9 (3.2)	17.6 (6.0)	28.8 (9.0)
BUN (mmol/l)	3.9–8.2	9.6 (1.1)	9.9 (1.7)	11.8 (1.8)	13.0 (2.3)
Creatinine (mmol/l)	35–123	40.0 (3.5)	45.3 (5.8)	58.7 (8.3)	65.7 (16.0)
ALT (U/l)	28–40	55.7 (9.2)	48.7 (9.0)	56.0 (15.9)	62.0 (7.2)
ALP (U/l)	150–220	215.3 (53.4)	138.0 (28.2)	142.3 (23.7)	164.7 (35.3)
Total proteins (g/l)	58–66	64.6 (0.6)	61.1 (1.0)	56.1 (6.1)	59.4 (7.2)
Albumin (g/l)	33–46	32.8 (0.3)	31.5 (1.8)	28.3 (2.6)	28.3 (3.9)
Globulins (g/l)	17–30	31.8 (0.6)	29.6 (1.8)	27.8 (3.6)	31.1 (1.3)

ALP, Alkaline Phosphatase; ALT, Alanine AminoTransferase; BUN, Blood Urea Nitrogen.

Table 3. Kinetic parameters associated with the formation -hydroxymidazolam and norketamine in liver S9 fractions from aging rats.

α -hydroxymidazolam	V_{\max} nmol min ⁻¹ mg ⁻¹	K_m μ M (nmol mL ⁻¹)	CL _{int} mL min ⁻¹
3 month liver S9 fractions	0.247 (\pm 0.017)	4.32 (\pm 0.26)	0.057
6 month liver S9 fractions	0.264 (\pm 0.021)	6.22 (\pm 0.99)	0.042
12 month liver S9 fractions	0.216 (\pm 0.020)	4.18 (\pm 0.05)	0.052
18 month liver S9 fractions	0.040 (\pm 0.003) ¹	3.76 (\pm 1.45) ³	0.011
norketamine			
3 month liver S9 fractions	2.39 (\pm 0.23)	15.99 (\pm 4.28)	0.150
6 month liver S9 fractions	2.61 (\pm 0.18)	18.38 (\pm 3.85)	0.142
12 month liver S9 fractions	2.07 (\pm 0.07)	19.04 (\pm 0.94)	0.109
18 month liver S9 fractions	0.68 (\pm 0.02) ²	2.65 (\pm 0.49) ⁴	0.256

^{1,2}, p < 0.001 ³ p > 0.05 ⁴ p < 0.05

Legend to figures

Fig. 1. Percent of Sprague Dawley rats ($n = 6/\text{group}$; 3, 6, 12 and 18 months old) showing a positive withdrawal reflex when evaluated at selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) following the intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine.

Fig. 2. Percent of Sprague Dawley rats ($n = 6/\text{age group}$; 3, 6, 12 and 18 months old) showing a positive corneal reflex evaluated at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive corneal reflex following the intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine.

Fig. 3. Mean (\pm SE) cardiac frequency (beat/min) in Sprague Dawley rats ($n = 6/\text{age group}$; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The heart rate was evaluated with a pulse oximeter tentatively at selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference between the 3 month-old group and the older groups was seen only at the 30 min time point. Post hoc Dunnett * $P < 0.01$

Fig. 4. Mean (\pm SE) respiratory frequency (breaths/min) in Sprague Dawley rats ($n = 6/\text{age group}$; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The respiratory frequency measured by direct observation at 5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min ended when all animals had a positive withdrawal reflex. No significant difference between groups.

Fig. 5. Mean (\pm SE) blood oxygen saturation (%) in Sprague Dawley rats ($n = 6/\text{age group}$; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The SaO_2 was evaluated with a pulse oximeter at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference (Post hoc Dunnett*) between groups was seen only at 5 min between 3- ($P < 0.002$) and 6- ($P < 0.02$) month old animals compared to 12-month-old animals.

Fig. 6. Mean (\pm SE) rectal temperature ($^{\circ}\text{C}$) in Sprague Dawley rats ($n = 6/\text{age group}$; 3, 6, 12 and 18 months old) following an intraperitoneal administration of 80 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg xylazine. The rectal temperature was evaluated at tentatively selected time points (5, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min) ending evaluations when all animals had a positive withdrawal reflex. A significant difference between 6-month-old animals and other age groups was seen at 30 and 45 min (Post hoc Dunnett* $P < 0.01$ and * $P < 0.01$, respectively).

Fig. 7. Mean (\pm SD) concentration-time profiles of ketamine (top) and xylazine (bottom) in male Sprague Dawley rats ($n=3$ /group; 3, 6, 12 and 18 months old) following a single intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

Fig. 8. Determination of Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) using non-linear regression fitting in S9 liver fractions from 3-, 6-, 12- and 18-month-old rats. Each point represents the mean (\pm SD) of experiments in triplicate. Significant differences of the initial rate of formation (V_i) were observed starting at $5\mu\text{M}$ substrate concentration for liver S9 fractions of 18-month-old rats.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ **** $P < 0.0001$

Figure 1

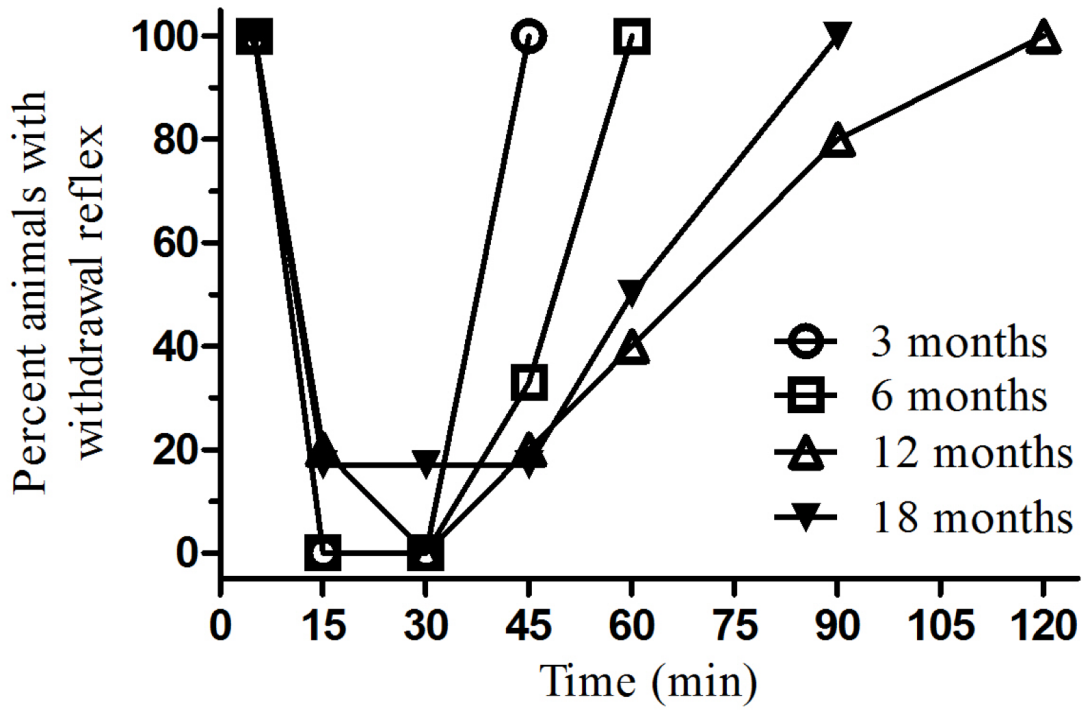


Figure 2

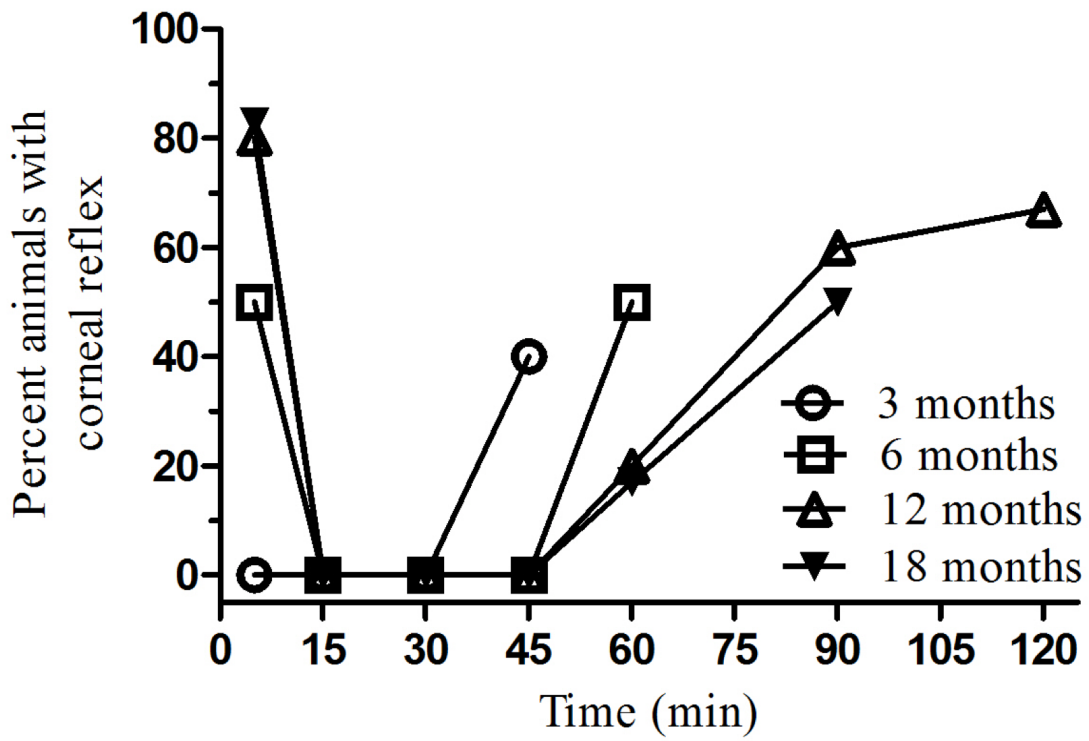


Figure 3

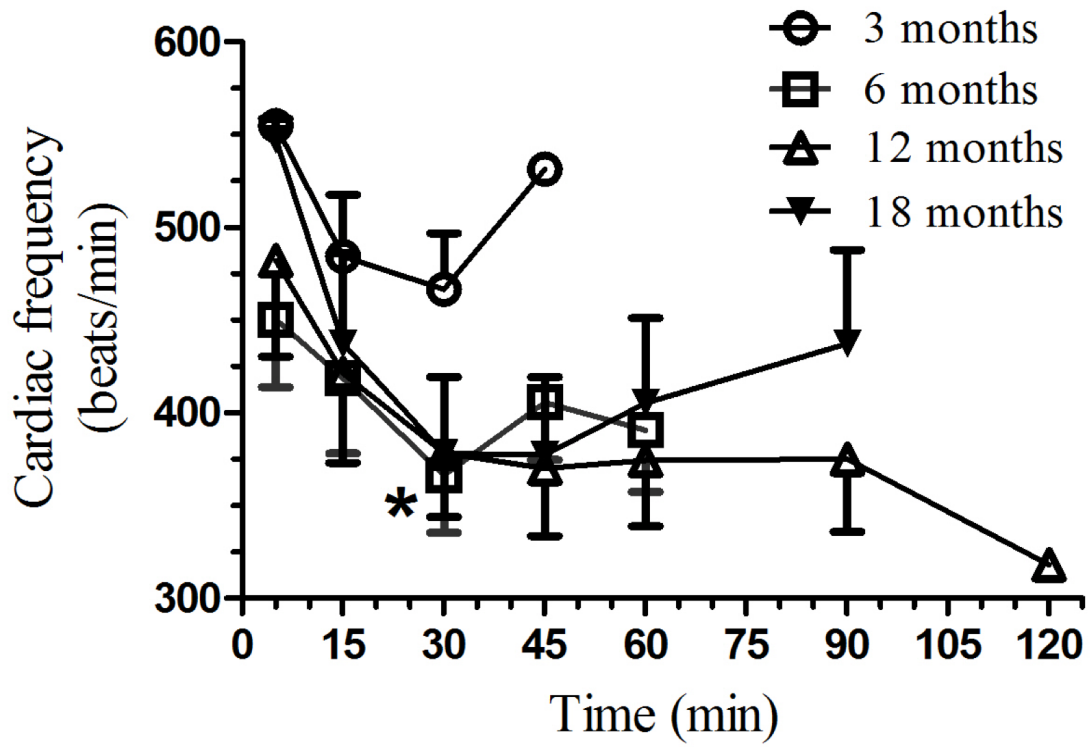


Figure 4

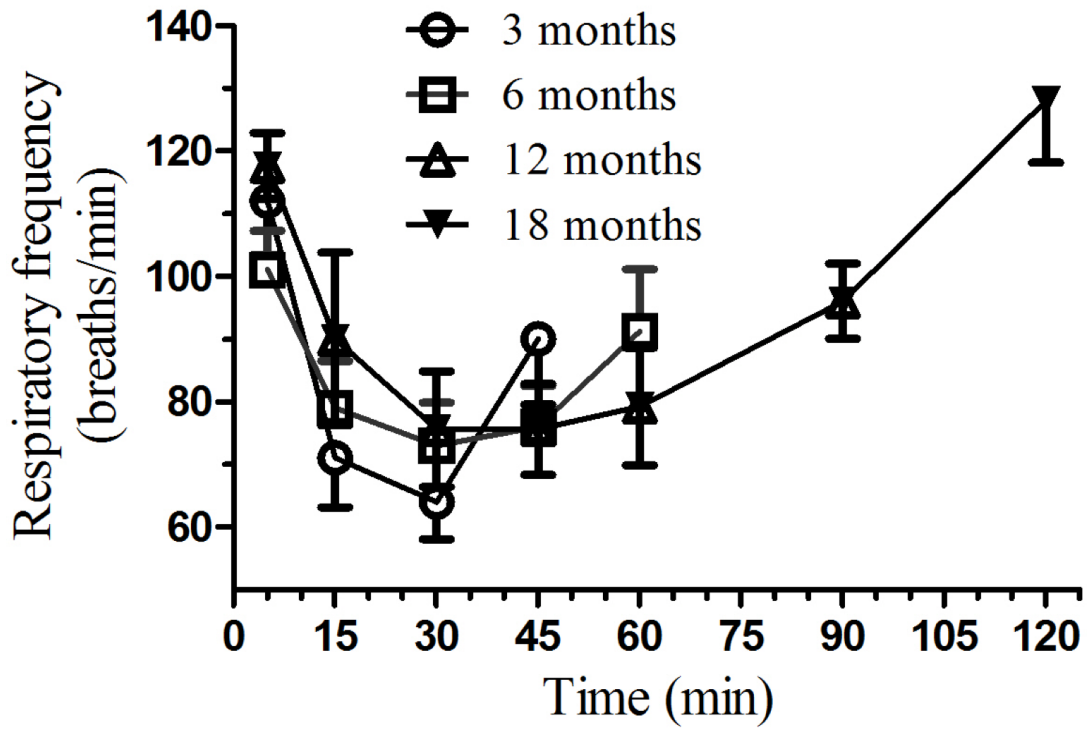


Figure 5

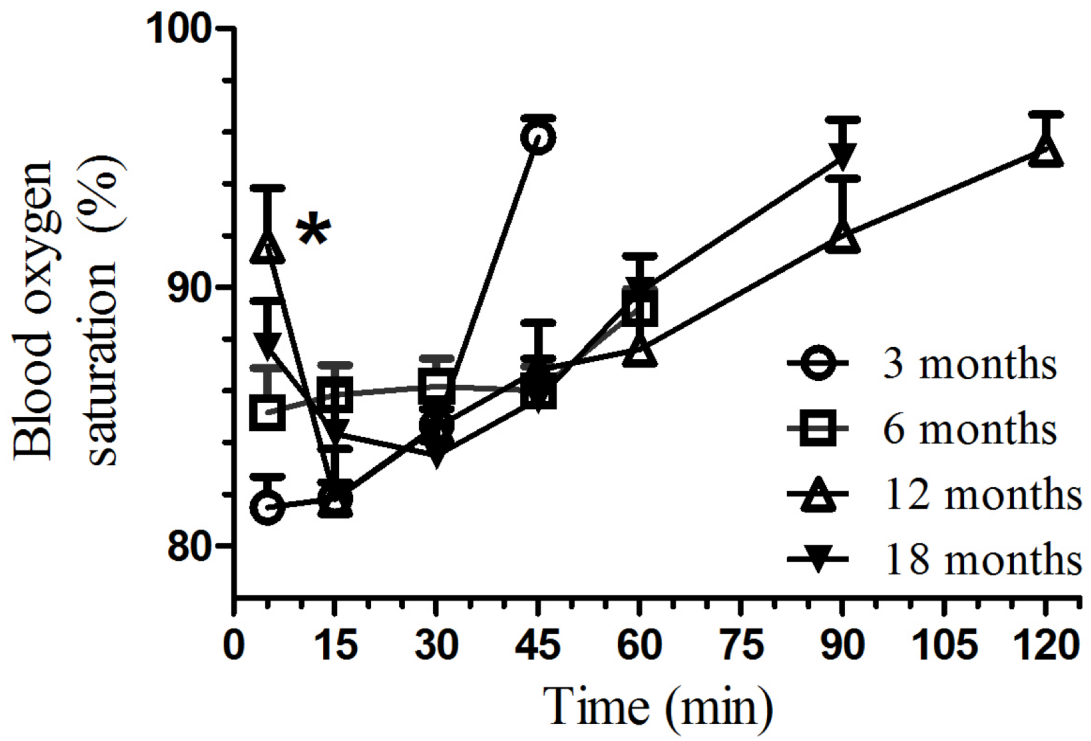


Figure 6

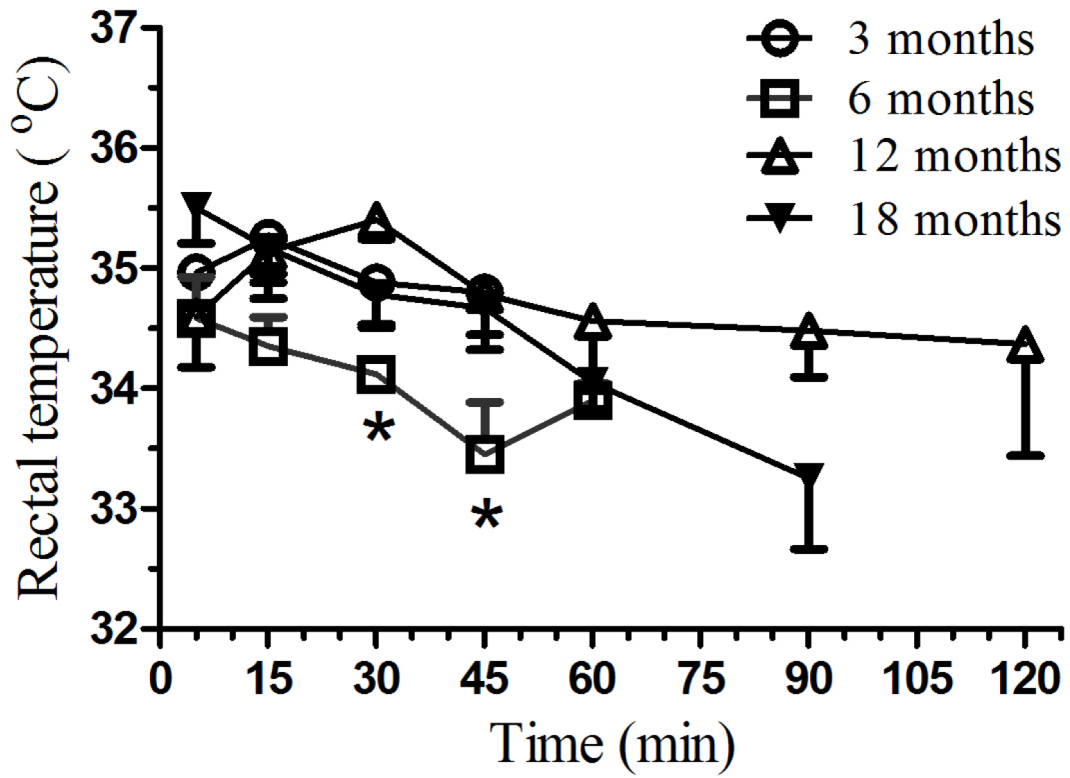


Figure 7

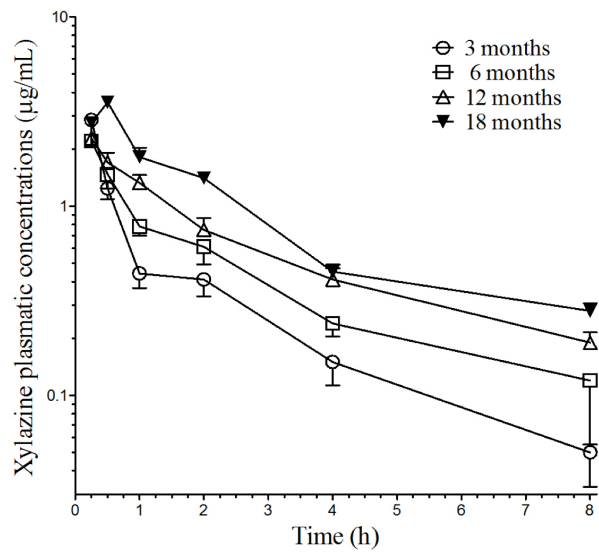
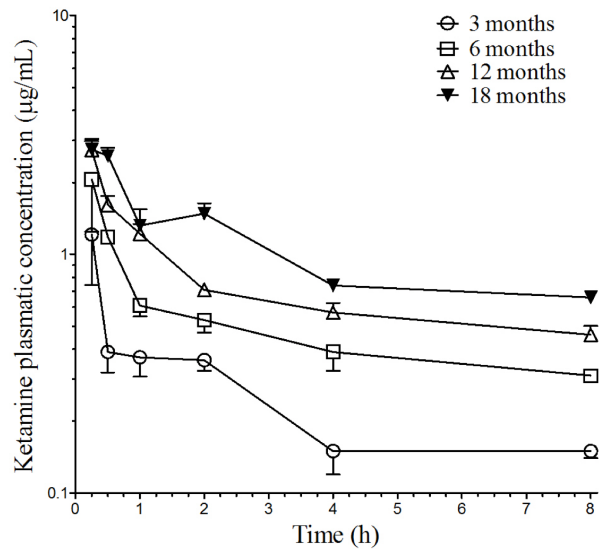


Figure 8

