

Université de Montréal

**Développement de méthodes analytiques par LC-MS/MS pour la
caractérisation de l'activité et de l'expression des CYP450s chez
l'humain**

Alexia Grangeon

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du
grade de Maîtrise en Sciences Pharmaceutiques
Option pharmacologie

Décembre 2016

Alexia Grangeon, 2016©

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Développement de méthodes analytiques par LC-MS/MS pour la caractérisation
de l'activité et de l'expression des CYP450s chez l'humain

Présenté par :

Alexia Grangeon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Suzanne Giasson, président-rapporteur

Dre. Véronique Michaud, directrice de recherche

Dr. Jacques Turgeon, co-directeur de recherche

Dr. Grégoire Leclair, membre du jury

Résumé en français

Ce projet de recherche comporte deux parties principales qui possèdent comme lien unificateur l'amélioration des méthodes et techniques utilisées actuellement pour évaluer aussi bien l'activité que l'expression des cytochromes P450 (CYP450s) et menant par la suite à leur application en clinique.

Le premier volet de ce projet de recherche porte sur le développement de méthodes LC-MS/MS pour un cocktail de 7 substrats marqueurs des CYP450s. Notre objectif est de développer et valider une méthode LC-MS/MS spécifique et sensible permettant l'évaluation des activités des CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4/5 et 2E1 suivant l'administration orale et à faible dose d'un cocktail de substrats marqueurs chez des patients et sujets sains. Les méthodes développées peuvent être utilisées pour évaluer les mécanismes de variabilité interindividuelle comme l'impact de polymorphismes génétiques, de facteurs environnementaux et de maladies dans le processus de métabolisme et d'élimination des médicaments, mais également pour investiguer les interactions médicamenteuses. Ce cocktail a été appliqué avec succès, dans un projet clinique portant sur l'évaluation des effets du diabète sur la capacité métabolique par les CYP450s.

Le deuxième volet de ce projet de recherche vise à développer des méthodes analytiques par LC-HRMS afin de caractériser et quantifier les CYP1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5, 3A7 et 4F2 dans l'intestin grêle humain. Notre hypothèse suggère que les CYP450s retrouvés le long de l'intestin grêle peuvent affecter significativement l'effet de premier passage de certains médicaments administrés par voie orale et influencer leurs concentrations plasmatiques et conséquemment, leurs effets pharmacologiques et/ou toxiques. Ma participation à ce projet a permis d'identifier des peptides protéotypiques par digestion *in silico* et *in vitro* et de développer des méthodes de quantification absolue par LC-HRMS. Ce projet est une première étape dans la caractérisation des CYP450s majeurs le long de l'intestin grêle. Il permettra de mieux comprendre les mécanismes de variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments associés au processus d'absorption intestinal et de mieux prédire la variabilité dans la biodisponibilité des médicaments et de développer des modèles pharmacocinétiques plus complexes.

Mots clés : LC-MS/MS; CYP450s; cocktail de substrats marqueurs; métabolisme des médicaments; protéomique, phénotypage.

Résumé en anglais

This research project is divided into two sections, both aiming at the development of sensitive and specific LC-MS methods to evaluate activity and expression of CYP450 and finally, looking at their clinical application.

The first section of this research project focuses on the development of analytical methods by LC-MS/MS for a seven CYP450 probe-drug cocktail. Although these cocktails have shown value they also suffer from many limitations. Our objective was to develop and validate highly sensitive and selective LC-MS/MS assays allowing the determination of CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4/5 and 2E1 activities following administration of low oral doses of a modified CYP450 probe-drug cocktail in patients. These methods can be used to phenotype CYP450 activities, evaluate inter-individual variabilities, study the impact of pathological conditions on drug metabolism and elimination, and evaluate drug-drug interactions. Our CYP450 cocktail assays have been successfully applied to phenotype CYP450 activities in type 2 diabetic patients.

The second section of this project aims at the development of a LC-HRMS method for the characterization and absolute quantification of CYP1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5, 3A7 and 4F2 in the human small intestine. Our hypothesis suggests that CYP450 isoenzymes found along the small intestine can significantly affect the first-pass effect of certain drugs administered orally and thus influence their pharmacological and/or toxic effects. My participation in this project allowed to identify proteotypic peptides by *in silico* and *in vitro* digestion and to develop LC-HRMS methods allowing the absolute quantification of CYP450. This project is a first step in the characterization of the main CYP450 along the small intestine. This project will allow a better understanding of inter-individual variability in drug response associated with intestinal absorption of drugs, a better prediction of variability in drug bioavailability and to develop more complex pharmacokinetic models.

Keywords: LC-MS/MS; CYP450 probe-drug cocktail; drug metabolism; proteomic; phenotyping.

Table des matières

Résumé en français	ii
Résumé en anglais	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements	xii
SECTION 1 : INTRODUCTION	13
1.1. Les cytochromes P450	13
1.1.1. Découverte des cytochromes P450	13
1.1.2. Propriétés	16
1.1.2.1. Structure.....	16
1.1.2.2. Localisation.....	16
1.1.2.3. Mécanismes d'action	17
1.1.3. Nomenclature et isoenzymes	19
1.1.3.1. CYP1.....	22
1.1.3.2. CYP2.....	24
1.1.3.3. CYP3.....	30
1.1.3.4. CYP4.....	34
1.2. Substrats marqueurs et méthodes de quantification	35
1.2.1. Les substrats marqueurs	35
1.2.2. Quantification des substrats marqueurs dans le plasma ou l'urine	36
1.2.2.1. Cocktail de substrats marqueurs	36
1.2.2.2. Préparation des échantillons	37
1.2.2.3. Étalonnage interne pour quantifier les analytes	38
1.2.2.4. Validation de méthodes analytiques	39
1.2.2.5. Analyse des échantillons.....	42
1.3. Technologie LC-MS/MS	42
1.3.1. La chromatographie en phase liquide	42
1.3.2. La spectrométrie de masse	44

1.3.2.1.	Généralités	44
1.3.2.2.	Source et mode d'ionisation.....	45
1.3.2.3.	Analyseurs et détecteurs de masse	46
1.4.	Quantification des protéines	49
1.4.1.	Techniques de dosage des protéines	50
1.4.1.1.	Méthode d'Omura et Sato	50
1.4.1.2.	ELISA	50
1.4.1.3.	Gel d'électrophorèse bidimensionnelle.....	51
1.4.1.4.	Western blot.....	51
1.4.1.5.	Colorimétrie	51
1.4.1.6.	Méthodes indirectes	52
1.4.2.	Dosage de protéines par spectrométrie de masse.....	52
1.4.2.1.	Digestion trypsique	53
1.4.2.2.	Sélection des peptides protéotypiques	53
1.4.2.3.	Méthodes de quantification.....	54
1.4.2.4.	Principe du dosage absolu de protéines par spectrométrie de masse	55
1.4.2.5.	Fragmentation des peptides en MS/MS	56
SECTION 2;	TRAVAUX DE RECHERCHE	57
2.1.	Développement d'une méthode LC-MS/MS hautement sélective pour la détermination de l'activité de 7 CYP450s humains en utilisant de faibles doses orales de substrats marqueurs..	57
2.1.1.	Objectifs de l'étude	57
2.1.2.	Introduction.....	57
2.1.3.	Article	60
2.1.4.	Discussion et conclusion.....	102
2.2.	Développement d'une méthode LC-HRMS hautement spécifique pour la détermination de l'expression de 14 CYP450s humains.....	105
2.2.1.	Objectif de l'étude	105
2.2.2.	Introduction.....	105
2.2.3.	Matériels et méthodes	106
2.2.3.1.	Produits chimiques et réactifs	106
2.2.3.2.	Identification des peptides protéotypiques.....	107
2.2.3.3.	Solution stock et courbe de calibration	108
2.2.3.4.	Conditions chromatographiques et spectromètre de masse	108

2.2.4. Résultats.....	109
2.2.4.1. Sélection des peptides protéotypiques par digestion enzymatique <i>in silico</i>	109
2.2.4.2. Optimisation de la méthode de digestion <i>in vitro</i>	111
2.2.4.3. Sélection des peptides protéotypiques par digestion enzymatique <i>in vitro</i> et <i>in silico</i>	118
2.2.4.4. Analyse LC-HRMS et MS/MS	119
2.2.4.5. Données préliminaires	123
2.2.5. Discussion et conclusion.....	124
SECTION 3 : CONCLUSION GÉNÉRALE.....	129
ANNEXES	131
ANNEXE 1 : Liste des publications et abstracts	131
REFERENCES.....	133

Liste des figures

Figure 1 : Spectre d'absorption du CYP450 (Figure adaptée de Klingenberg, 1958).....	15
Figure 2 : Cycle catalytique des CYP450s (Figure adaptée de Guengerich, 2001).....	18
Figure 3 : Nomenclature des familles, sous familles et isoenzymes des CYP450s.....	19
Figure 4 : Les 57 gènes associés aux CYP450s (Figure adaptée de Lewis, 2004).....	20
Figure 5 : Les CYP450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et des composés endogènes (Figure adaptée de Tralau et Luch, 2013).....	21
Figure 6 : Les composantes du système HPLC.....	44
Figure 7 : Principe général de la LC-MS.....	44
Figure 8 : Fragmentation des ions précurseurs avec un analyseur de type triple quadripôle (Figure adaptée de Huttenhain <i>et al.</i> , 2009).....	47
Figure 9 : Schéma du MS (A) et MS/MS (B) de type quadripôle-Orbitrap (Figure adaptée de Gallien <i>et al.</i> , 2012).....	48
Figure 10 : Schéma représentant les différentes sciences « omiques » (Figure adaptée de Gerszten et Wang, 2008).....	49
Figure 11 : Principe de la quantification de protéines par spectrométrie de masse.....	55
Figure 12 : Nomenclature des ions formés en MS/MS.....	56
Figure 13 : Méthode détaillée pour sélectionner <i>in silico</i> les peptides spécifiques à l'isoenzyme CYP2C9.....	110
Figure 14 : Optimisation des tampons de dilution des isoenzymes recombinantes CYP1B1, 2C9 et 2J2 (N=2).....	112
Figure 15 : Optimisation des conditions d'incubation du DTT avec les isoenzymes recombinantes CYP1B1, et 2J2 (N=2).....	113
Figure 16 : Optimisation des quantités de DTT et d'IAA avec les isoenzymes recombinantes CYP2C8 et 2C19 (N=2).....	114
Figure 17 : Optimisation des quantités de trypsine avec les isoenzymes recombinantes CYP2C8 et 2C19 (N=2).....	115
Figure 18 : Optimisation du temps de digestion trypsique avec les isoenzymes recombinantes CYP1B1, 2C8, 2C9, 2C19 et 2J2 (N=2).....	117

Figure 19 : Chromatogramme de tous les peptides injectés à une concentration de 200 nM selon la méthode chromatographique développée.....	121
Figure 20 : Chromatogrammes et spectres MS et MS/MS du peptide protéotypique au CYP3A4 dans des protéines recombinantes, des HLM et des HIM.....	122

Liste des tableaux

Table 1 : Substrats marqueurs couramment utilisés pour déterminer les activités spécifiques des isoenzymes des CYP450s et leurs marqueurs phénotypiques associés	36
Table 2 : Nombre de peptides protéotypiques obtenus par digestion <i>in silico</i> pour 14 isoenzymes des CYP450s.....	111
Table 3 : Nombre de peptides protéotypiques obtenus par digestion <i>in vitro</i> pour 14 isoenzymes des CYP450s.....	118
Table 4 : Séquences d'acides aminés des peptides protéotypiques pour 14 isoenzymes des CYP450s.....	119
Table 5 : Masse M, état de charge z et ion précurseur $[M+zH]^{z+}$ des peptides protéotypiques et standards internes de 14 isoenzymes des CYP450s.....	120
Table 6 : Quantités de protéines de chaque isoenzyme obtenues dans deux pools de HLM et HIM commerciaux.....	124

Liste des abréviations

ABC : Ammonium bicarbonate
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique
AQUA : Quantification absolue
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
BCA : Acide bicinchonique
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BSA : Albumine Sérique Bovine
CO : Monoxyde de carbone
CYP : Cytochrome
CYP450s : Cytochromes P450
CV : Coefficient de variation
DTT: Dithiothréitol
ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
HESI : Ionisation par électronébuliseur chauffé
HIM : Microsomes Intestinaux Humain
HLM : Microsomes de Foies Humain
HPLC: Chromatographie liquide à haute performance
HRMS : Spectromètre de masse à haute résolution
HRAM : Masse exacte à haute résolution
HSA : Albumine Sérique Humaine
IAA: Iodoacétamide
IS: Standard Interne
LLOQ: La plus basse limite de quantification
LC : Chromatographie Liquide
MALDI : Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MPT : Modification Post Traductionnelle
MS : Spectromètre de masse
MS/MS : Spectromètre de masse en tandem
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

QC : Contrôle qualité

QConCat : Quantification de peptide concaténés

QqQ : Triple quadripôle

RSD : Déviation standard relative

RF : Radio-fréquence

RT-qPCR : Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérase en chaine quantitative

SDS: Dodécylsulfate de sodium

SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide

TFA : Acide trifluoroacétique

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à ma directrice, Dr Véronique Michaud, et à mon co-directeur, Dr Jacques Turgeon, pour le temps que vous avez pu me consacrer, et pour vos encouragements et vos discussions aussi bien scientifiques que personnelles.

Je souhaite également remercier Fleur Gaudette pour m'avoir énormément appris sur les LC-MS/MS et sur la validation de méthodes analytiques et François Bélanger pour nos longues nuits d'attente à l'hôpital et nos interminables lavages intestinaux.

Merci à tous les étudiants du laboratoire, Sophie Gravel, Jennifer Lu, Henry Leung, Valérie Clermont, Roxane Pelletier et aux autres étudiants du CRCHUM avec qui j'ai pu partager de très bons moments, aussi bien au CRCHUM qu'à l'extérieur.

Merci à ma famille, et tout particulièrement à mes parents, à mon frère, à mes grands-parents et à Benoît pour tout l'amour et le soutien moral que vous avez pu m'apporter tout au long de mon parcours académique.

Merci également aux membres du jury, d'avoir pris le temps de lire attentivement mon mémoire.

SECTION 1 : INTRODUCTION

1.1. Les cytochromes P450

1.1.1. Découverte des cytochromes P450

L'organisme est composé de nombreux systèmes et membranes biologiques qui agissent simultanément comme barrière afin d'empêcher l'intrusion de substances exogènes potentiellement toxiques dans l'organisme. Ces substances toxiques peuvent provenir de différentes origines comme des substances présentes dans les aliments ou des substances retrouvées dans l'air que l'on respire. De plus, les médicaments peuvent également être perçus par l'organisme comme des substances toxiques nécessitant d'être neutralisées. Pour nous protéger et empêcher l'entrée des médicaments dans la circulation sanguine, les mécanismes biologiques naturels de l'organisme participent à l'élimination de ces toxines. Cette élimination peut être effectuée directement par excrétion du médicament, indirectement par biotransformation du médicament ou alors par une combinaison de ces deux procédés d'élimination. Cette phase de biotransformation des médicaments, également appelée métabolisme des xénobiotiques, a été définie pour la première fois dans les années 1840 dans une publication par Ure qui indiquait qu'un composé exogène, l'acide benzoïque, était transformé en un autre composé, appelé métabolite, l'acide hippurique [1, 2].

Entre les années 1860 et 1900, de nombreux scientifiques ont participé à la découverte des réactions majeures impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques telles que les réactions d'oxydation, de réduction, de sulfatation, de conjugaison à l'acide glucuronique, synthèse de l'acide mercapturique, de méthylation et d'acétylation [3].

Au début des années 1900, les recherches de Garrod sur une maladie familiale rare, l'alcaptonurie, lui ont permis de découvrir que les patients atteints de cette maladie avaient une mutation sur le gène d'une enzyme impliquée dans le métabolisme d'une classe de composés exogènes. Il fut ainsi le premier à postuler que des enzymes seraient à l'origine du métabolisme de composés exogènes [2, 4, 5]. Vers les années 1940, les recherches de RT Williams faites sur les animaux ont montré que de nombreux composés subissaient plusieurs réactions métaboliques. Il décrivit ainsi qu'un même composé pouvait être métabolisé en plusieurs

métabolites et que plusieurs voies de biotransformation et d'élimination régissaient le devenir du médicament dans l'organisme [2, 6].

A la fin des années 1940, trois groupes de chercheurs ont réalisé de nombreuses études menant à la découverte des CYP450s quelques années plus tard [7].

a) Le groupe des Miller se doit l'une des plus importantes découvertes, soit que les enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques seraient localisées dans une fraction « particulière » des cellules de foie. Quelques années plus tard, ils mirent en évidence le rôle du NADPH et de l'oxygène pour la métabolisation de certains composés aminoazo dans des fractions de cellules de foie de rats [8, 9].

b) Brodie, et particulièrement Axelrod, se sont intéressés aux méthodes permettant de mesurer le métabolisme des médicaments. Ils appliquèrent leurs méthodes aux médicaments psychoactifs et démontrèrent que : 1) les métabolites se trouvaient dans le surnageant obtenu après centrifugation dans des microsomes de foies de lapins et que 2) la présence d'un nucléotide triphosphate réduit (TPNH), aujourd'hui nommé NADPH, et de l'oxygène étaient nécessaires au métabolisme [10, 11]. Leurs études confirmèrent ainsi les conclusions apportées par le groupe de Miller. Jim Gillette, qui a également fait ses débuts dans le laboratoire de Brodie, a quant à lui apporté la première évidence de l'implication du système enzymatique TPNH (NADPH) oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du TPNH (NADPH) par l'oxygène menant au TPN (NADP) et du peroxyde d'oxygène. Également, il démontra que ce système enzymatique serait impliqué dans la dealkylation oxydative d'alkylamine dans les microsomes de foie [10, 12].

c) Le laboratoire de Engel et Ryan, a participé à la découverte des CYP450s par l'intermédiaire de l'étude du métabolisme des hormones stéroïdiennes [7]. Ils ont démontré la nécessité du NADPH et de l'oxygène atmosphérique pour catalyser la réaction d'hydroxylation de la progestérone, dans des fractions microsomales du cortex surrénalien. Cependant, ils ne purent relier leurs études au rôle clé des CYP450s comme catalyseur de ces réactions, étant donné que les CYP450s n'avaient pas encore été observés avec les spectrophotomètres [13].

Ce n'est que vers les années 1960 que Klingenberg, très intéressé par l'application du spectrophotomètre développé par Chance, voulu appliquer ses méthodes pour mesurer les

cinétiques rapides des réactions de transfert d'électrons [7, 14]. Il entreprit également de continuer les recherches de Chance et Williams qui ont découvert en 1954, à partir du supernageant obtenu par l'ultracentrifugeuse contenant des particules de réticulum endoplasmique et du spectrophotomètre, la présence d'une hemoprotéine; le cytochrome *b₅* [7, 15]. Durant ses études, Klingenberg observa la présence d'un pigment liant le monoxyde de carbone et ayant une absorbance maximale d'environ 450 nm, en présence d'un agent réducteur et du monoxyde de carbone dans des microsomes de foie de rats [16].

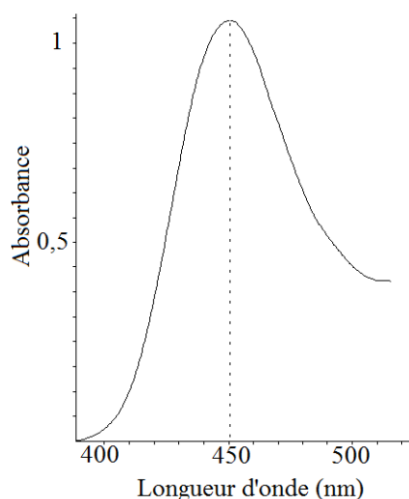


Figure 1 : Spectre d'absorption du CYP450. (Figure adaptée de Klingenberg, 1958 [16])

Les CYP450s furent nommés en lien avec le "P" de pigment et le 450 correspondant à leur pic d'absorbance maximale à 450 nm. Il trouva également que l'hème était fortement présent dans les microsomes de foie, sans pouvoir faire un lien direct avec les CYP450s [16]. Garfinkel fit les mêmes conclusions que Klingenberg mais en observant ce pigment dans des microsomes de foie de cochons [17].

En 1962, Omura et Sato démontrèrent que le pigment trouvé par Klingenberg était effectivement une hemoprotéine qu'ils nommèrent cytochrome [18]. C'est ensuite en 1963, qu'Estabrook, Cooper et Rosenthal établirent clairement le rôle et la fonction biochimique des CYP450s en démontrant leur implication dans des études de biotransformation de composés endogènes (réaction d'hydroxylation de la 17-hydroxyprogestérone), de biotransformation de xénobiotiques (codéine, aminopyrine et acétanilide) et de biotransformation de stéroïdes [19-22].

C'est ainsi que les nombreuses observations et avancées scientifiques citées ci-dessus ont permis la découverte de cette enzyme, appelée cytochrome P450 ou CYP450s, dans les années 1960.

1.1.2. Propriétés

Vers la fin des années 60, les chercheurs Sladek et Mannering ont mis en évidence, dans des microsomes de foie de rats, que les CYP450s existaient sous différentes formes [23]. Depuis ces premiers résultats, les recherches sur l'implication des CYP450s dans le métabolisme de composés endogènes et exogènes n'ont cessé d'augmenter et ont permis de définir les CYP450s comme étant une superfamille d'enzymes.

1.1.2.1. Structure

Le cytochrome P450 est une hémoprotéine, qui contient une molécule d'hème et une apoprotéine, ayant un poids moléculaire variant de 45 à 60 kDa.

L'hème est une molécule qui contient un atome de métal et elle représente la partie commune à toute hémoprotéine et donc à tous CYP450s. L'hème, ou partie proporphyrine ferrique dans le cas des CYP450s, contient un atome de fer lié à la partie C-terminale de l'apoprotéine par un atome de soufre d'un résidu cystéine [24]. Ce cation est coordonné avec 4 groupements pyrrole et donc 4 atomes d'azote (N) et deux ligands porphyrines dont l'un d'entre eux est le ligand thiolate qui provient du résidu cystéine de l'apoprotéine [25].

L'apoprotéine est une chaîne polypeptidique correspondant à la partie spécifique à chaque cytochrome et sa composition permet de distinguer les différentes isoformes. Cette différence en composition et en taille de la protéine est à l'origine de la différence de spécificité des substrats envers une enzyme et de leur capacité à former différents métabolites. Lors de la liaison du substrat à la protéine, le substrat se fixera au niveau du site catalytique hydrophobe de l'apoprotéine [24].

1.1.2.2. Localisation

Au niveau cellulaire, la majorité des CYP450s sont des protéines membranaires périphériques. Ils sont présents dans tous organismes vivants mais ils se retrouvent à différent niveau cellulaire.

Les microsomes sont des vésicules issues de la fragmentation du réticulum endoplasmique et la majorité des CYP450s sont localisés dans le réticulum endoplasmique [26]. C'est pourquoi on les nomme plus précisément CYP450s microsomaux. Il existe également des CYP450s mitochondriaux ou encore bactériens, mais on ne s'intéressera qu'aux CYP450s microsomaux dans ce projet de recherche. Les CYP450s sont ancrés à la bicouche lipidique membranaire du réticulum endoplasmique lisse par le segment N-terminal. Le restant de la protéine jusqu'au segment C-terminal, soit le site catalytique, est libre et se situe dans le compartiment cytosolique de la cellule.

Au niveau du corps humain, les CYP450s sont exprimés dans la plupart des organes mais l'expression des différentes isoformes est organe-dépendante. Il est maintenant bien reconnu que le foie est l'organe où l'expression des CYP450s est la plus importante. Une importante expression des CYP450s dans l'intestin grêle a également été démontrée récemment. Certaines isoenzymes sont également retrouvées dans d'autres organes et tissus comme les reins, les poumons, le cœur, le cerveau et la peau [27].

1.1.2.3. Mécanismes d'action

L'élimination des médicaments de l'organisme s'effectue principalement par biotransformation, également appelée métabolisme des xénobiotiques. On différencie deux classes majeures de réactions métaboliques, les réactions de phase I et les réactions de phase II. Un métabolite résultant d'une réaction métabolique de phase I peut devenir un substrat d'une réaction métabolique de phase II. Les réactions de phase I visent à introduire un groupement polaire afin de rendre le médicament plus hydrosoluble afin de faciliter son élimination. Les réactions de métabolisme de phase I sont principalement dues aux isoenzymes des CYP450s. Les réactions de phase II ne seront pas discutées dans ce mémoire.

Les CYP450s ont été décrits comme appartenant à la famille des enzymes mono-oxygénase à fonction multiple. En effet, l'oxygène est essentiel aux réactions catalytiques via les CYP450s ainsi que la flavoprotéine NADPH-CYP450 réductase. Pour que la réaction catalytique puisse se faire, les CYP450s microsomaux vont accepter des électrons de la flavoprotéine, un donneur

d'électrons. Le fonctionnement de ce système enzymatique est régi par un cycle catalytique, qui sera décrit succinctement.

Différentes étapes, résumées dans la Figure 2, régissent le cycle catalytique de ces CYP450s :

- 1) Lors de la liaison du substrat à l'enzyme, il peut y avoir un changement dans le *spin* de l'atome de fer de l'hémoprotéine, qui passe d'un *spin* faible à un *spin* élevé, nécessaire pour entreprendre la réaction catalytique.
- 2) Un électron va être transféré de la NADPH-CYP450 réductase aux CYP450s microsomaux. Cela résulte en un complexe CYP450-substrat réduit à l'état ferreux.
- 3) Les CYP450s peuvent ainsi se lier à une molécule d'oxygène, résultant en un complexe CYP450-O₂-substrat.
- 4) Un deuxième électron est transféré au complexe par la NADPH-CYP450 réductase ou le cytochrome b5.
- 5) Un proton H⁺ est ensuite ajouté et une molécule d'eau est libérée. Il y a ainsi formation du complexe (Fe-O)⁺³ réactif.
- 6) Il y a ensuite transposition de l'hydrogène formant un hydroxyle et un substrat radicalaire.
- 7) Le complexe enzyme-produit est formé.
- 8) Il y a dissociation du produit ROH de l'enzyme, et donc du Fe⁺³.

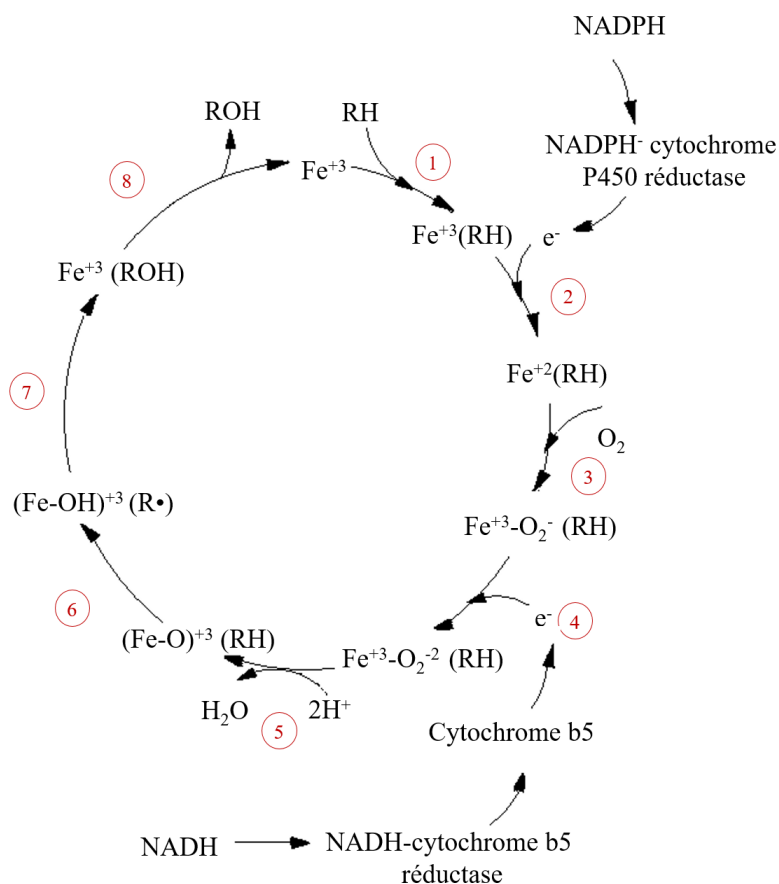


Figure 2 : Cycle catalytique des CYP450s (Figure adaptée de Guengerich, 2001 [28]).

1.1.3. Nomenclature et isoenzymes

Le Cytochrome P450 est une superfamille d'enzymes, composée de plusieurs familles, sous-familles et isoenzymes. La nomenclature aujourd'hui utilisée pour distinguer ces différentes isoenzymes a été développée par Nebert en 1987 [29-31]. Considérant que ce système enzymatique est présent dans la plupart des eucaryotes et dans quelques procaryotes, Nebert considéra que cette superfamille d'enzymes doit exister depuis plus d'1,5 milliards d'années. Il est également important de souligner que Nelson, à la fin des années 2000, a émis l'hypothèse d'un gène ancestral commun à tous les organismes qui existerait depuis 3.5 milliards d'années et qu'une famille de CYP450s serait présente dans tous les organismes, soit le CYP51. Il basa ainsi sa nomenclature sur cette théorie de l'évolution d'un gène commun et d'un système enzymatique qui n'a cessé d'évoluer depuis. Ses recherches visaient à comparer les séquences d'acides aminés de nombreux CYP450s, et il remarqua qu'elles comportaient de nombreuses homologies. Il détermina ainsi un pourcentage de similitude qui classerait les CYP450s dans différentes familles et/ou sous-familles spécifiques. Il considéra que les protéines ayant plus de 40% d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés seraient regroupées au sein d'une même famille, tandis que celles ayant plus de 55% d'homologie seraient regroupées au sein d'une même sous-famille. Cette nomenclature, basée sur le principe de similarité dans les séquences d'acides aminés des différents CYP450s, permet d'identifier et de regrouper les isoenzymes des CYP450s dans les différentes familles et sous-familles. Pour classer les familles et sous-familles, il utilisa l'acronyme CYP pour les cytochromes humains et Cyp pour les cytochromes chez la souris puis il indiqua par un chiffre les membres d'une même famille puis par une lettre ceux d'une même sous-famille puis il rajouta à nouveau un chiffre pour différencier les isoenzymes d'une même sous-famille.

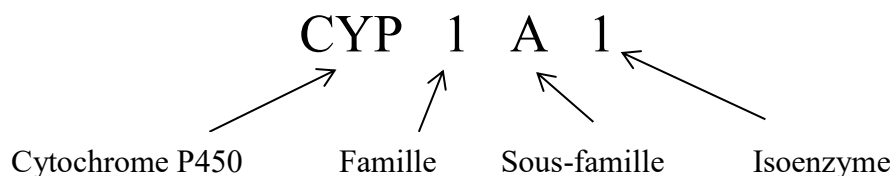


Figure 3 : Nomenclature des familles, sous-familles et isoenzymes des CYP450s.

A ce jour, 57 gènes des CYP450s regroupés en 18 familles et 41 sous-familles, ont été découverts chez l'humain [32, 33]. De plus, si de très fortes similitudes sont observées dans les séquences d'acides aminés de deux gènes, on considéra l'un d'entre eux comme étant un pseudo gène. On compte aujourd'hui 58 pseudos gènes des CYP450s chez l'humain. Pour comparaison, la souris a un nombre plus élevé de gènes des CYP450s par rapport aux humains, soit 102 gènes [34].

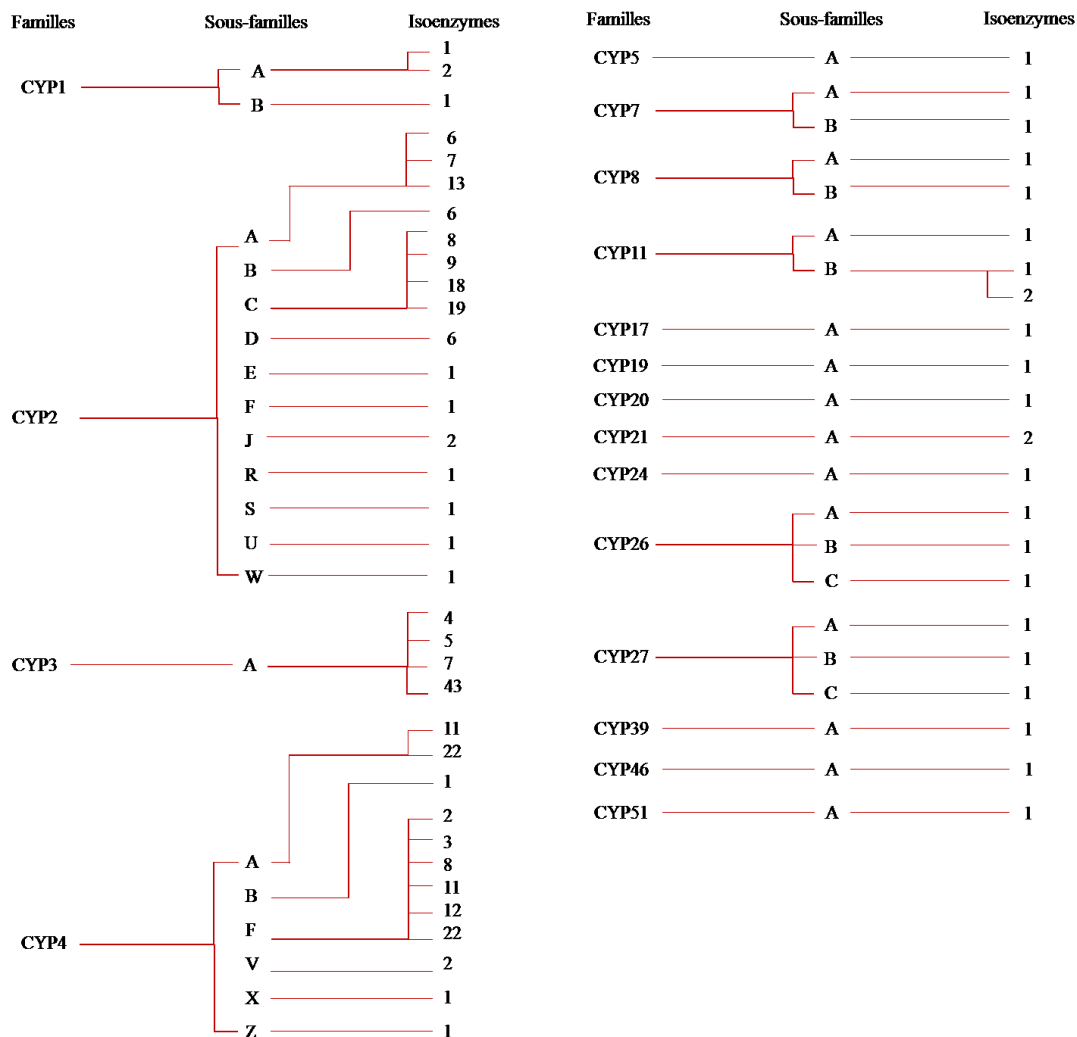


Figure 4 : Les 57 gènes associés aux CYP450s (Figure adaptée de Lewis, 2004 [33]).

Tel que mentionné précédemment, les CYP450s peuvent être impliqués dans le métabolisme de xénobiotiques mais également dans le métabolisme de composés endogènes [35]. La figure ci-

dessous classe les CYP450s en fonction de leur capacité à métaboliser les xénobiotiques ou les composés endogènes.

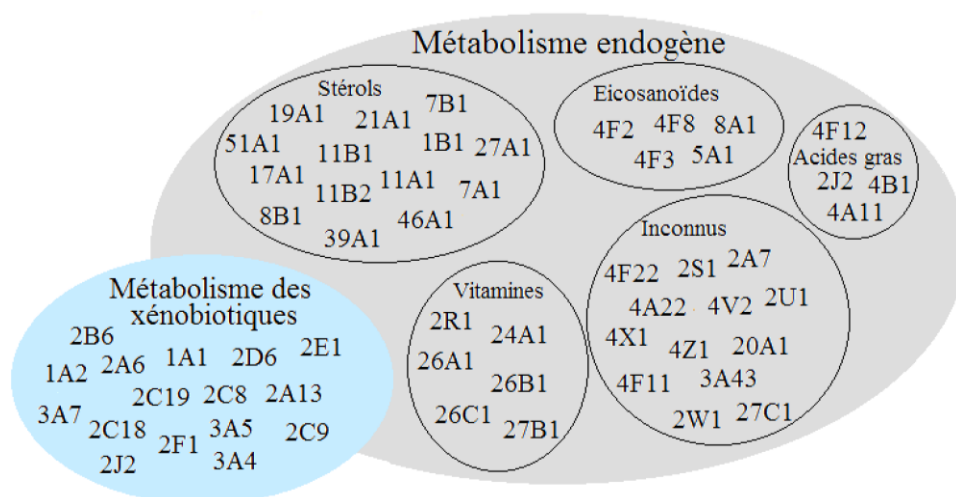


Figure 5 : Les CYP450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et des composés endogènes (Figure adaptée de Tralau et Luch, 2013 [35]).

Les principaux CYP450s impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, soit les CYP d'intérêts pour ce projet, sont regroupés en 3 familles, soit les familles : CYP1, CYP2 et CYP3. Les isoenzymes présentes dans ces trois familles de CYP450s ont des niveaux d'expression plus importants dans les organes du corps humain principalement impliqués dans l'excrétion, que les autres familles des CYP450s. Ils sont également les CYP450s les plus importants cliniquement concernant l'élimination des xénobiotiques. On considère que les CYP450s les plus impliqués dans le métabolisme des médicaments utilisés en clinique sont les CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C8, CYP2A6, CYP2J2, CYP2E1 et qu'ils contribuent pour environ 30,2%, 20%, 12,8%, 8,9%, 7,2%, 6,8%, 4,7%, 3,4%, 3% et 3% au métabolisme des xénobiotiques, respectivement [36]. Nous nous intéresserons également à la famille des CYP4s et particulièrement aux isoenzymes de la sous-famille CYP4F qui selon de récentes études seraient fortement exprimées dans le foie et l'intestin [37, 38]. Seules les isoenzymes des CYP450s d'intérêts pour les sections du projet de recherche de ce mémoire seront détaillées ci-dessous.

1.1.3.1. CYP1

La famille des CYP1s est composée de 2 sous-familles et 3 isoenzymes soit les CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1.

a) CYP1A1

Des niveaux d'acide ribonucléique messager (ARNm) du gène CYP1A1 ont été détectés dans les foies fœtaux [39]. A l'inverse, chez les humains adultes, l'isoenzyme CYP1A1 est principalement exprimée dans des tissus extra-hépatiques [40]. Des niveaux modérés d'ARNm ont été observés dans des organes extra-hépatiques tels que les poumons [41, 42] et le placenta [43-45] mais également dans les lymphocytes [46]. Des niveaux d'expression plus faibles d'ARNm du CYP1A1 ont été observés dans le pancréas, la prostate, l'intestin grêle, le colon, le thymus, la peau et les glandes mammaires [24, 47-49].

Cette isoenzyme est principalement impliquée dans le métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des amines aromatiques tels que le naphthalène et l'anthracène, mais également dans la bioactivation de médicaments pro-carcinogènes [50-53]. De nombreuses études se sont intéressées au caractère fortement inductible de ce cytochrome. En effet, plusieurs composés semblent fortement l'induire et particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques retrouvés dans la fumée de cigarette, et dans les aliments grillés sur charbon de bois, mais également les amines hétérocycliques [50, 54]. Ainsi, des niveaux plus importants d'ARNm sont observés. De par sa localisation au niveau pulmonaire, Kim *et al.* ont démontré, en comparant des patients fumeurs et non-fumeurs, le caractère inductible du CYP1A1 par la fumée de cigarette [55]. Les patients fumeurs auraient en effet une expression plus élevée de protéines CYP1A1 comparativement à des patients non-fumeurs.

b) CYP1A2

Le CYP1A2, second membre de cette sous-famille, a une homologie d'environ 70% avec le CYP1A1. Contrairement à celui-ci, le CYP1A2 est très fortement exprimé au niveau hépatique et représente environ 10% des CYP450s hépatiques totaux [56-58]. Ce cytochrome est également très important cliniquement car il métabolise environ 9% des médicaments utilisés en clinique [36] et a une variabilité interindividuelle très importante, d'environ 40-fois [57].

Le CYP1A2 peut être induit par les mêmes composés qui induisent le CYP1A1, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cependant, même après induction, le CYP1A2 n'est pas présent au niveau extra-hépatique, à l'exception de faibles niveaux d'expression mesurés dans les poumons [27, 58, 59]. Son importance clinique peut être démontrée par les substrats cliniquement pertinents qu'il métabolise comme des analgésiques (acétaminophène, phenacétine), stimulant (caféine), neuroleptiques (clozapine, olanzapine), bronchodilatateur (théophylline), anti-arythmique (mexilétine) ou encore un anticoagulant ((R)-warfarine) [57, 58, 60-63]. Il active également des amines aromatiques carcinogéniques, d'où son importance dans l'apparition de certains cancers [64]. Plusieurs composés peuvent également inhiber l'activité du CYP1A2, mais pas celle du CYP1A1, tels que l'antidépresseur fluvoxamine, l'antibiotique quinolinique ciprofloxacine ou encore le bronchodilatateur furafylline [65-67]. Certains polymorphismes génétiques ont été observés, mais le CYP1A2 est un gène relativement bien conservé [68].

c) CYP1B1

Le CYP1B1, seul membre de la sous-famille 1B, est faiblement exprimé au niveau du foie. Il représente moins de 1% des CYP450s hépatiques totaux, et comme le CYP1A1, il est exprimé principalement dans les organes extra-hépatiques [57]. Le CYP1B1 est exprimé dans différents organes et tissus du corps humain, tels que la peau, les reins, le SNC, le tissu fœtal, les glandes mammaires, la prostate, le thymus, l'intestin grêle, les poumons, les ovaires et l'utérus [27, 57, 69].

Tout comme les isoenzymes CYP1A1 et CYP1A2, ce cytochrome est impliqué dans la bioactivation des hydrocarbures aromatiques polycycliques [52]. Il est également impliqué dans certains processus de carcinogénicité et a été détecté dans diverses tumeurs [70]. En effet, certains substrats de ce cytochrome seraient métabolisés en composés favorisant la formation de tumeurs. De par la localisation du CYP1B1 dans les glandes mammaires, l'utérus et les ovaires, ce cytochrome peut être impliqué dans le contrôle métabolique des œstrogènes. Par exemple, le CYP1B1 est impliqué dans la bioactivation de la voie métabolique du 17 β -œstradiol, un œstrogène [57, 71, 72]. Cette voie métabolique entraîne une diminution de l'activité

oestrogénique et la formation d'un métabolite toxique, le 4-hydroxyestradiol, qui est associé à un développement accru de tumeurs et donc à de la carcinogénicité [73, 74].

1.1.3.2. CYP2

La famille des CYP2s est composée de 11 sous-familles différentes, comprenant au total 16 isoenzymes. Comme on le remarque sur la figure 4, la famille CYP2 est la famille plus importante au niveau du nombre d'isoenzymes présentes chez l'humain. Les isoenzymes les plus importantes cliniquement sont les isoenzymes CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, et CYP2J2, et ce sont ces isoenzymes qui seront décrites ci-dessous. Les CYP2A6 et le CYP2C18 ne seront pas étudiés dans le cadre de mon projet de recherche.

a) CYP2B6

Jusqu'à récemment, le CYP2B6 était considéré comme un cytochrome peu exprimé au niveau hépatique et de moindre importance pour le métabolisme de médicaments utilisés en clinique. Cependant, depuis quelques années, des études comme celles de Turpeinen *et al.* ont montré que ce cytochrome était très important, d'autant par le nombre élevé de substrats qu'il métabolise que de par son niveau élevé d'expression hépatique [75]. Son expression dans le foie est d'environ de 1 à 10% et il métabolise environ 7% des médicaments utilisés cliniquement, ce qui supporte son importance [36, 58, 76]. Il est également présent au niveau du cerveau et de faibles niveaux d'expression ont été retrouvés dans les poumons, le tractus gastro-intestinal, les reins, la trachée, le cœur et la muqueuse nasale [27, 76, 77].

Il est impliqué dans le métabolisme de nombreuses substances médicamenteuses comme des anticancéreux (cyclophosphamide, ifosfamide), des antidépresseurs (bupropion), des analgésiques (méthadone), des anesthésiques (kétamine), et le médicament antirétroviral contre le VIH, l'efavirenz [58, 75, 78]. Kreth *et al.* ont montré que le CYP2B6 jouait également un rôle très important dans le métabolisme de l'ecstasy, en formant des métabolites neurotoxiques [79]. Le CYP2B6 peut également être induit par plusieurs médicaments comme la rifampicine ou la phénytoïne [58]. Une très grande variabilité interindividuelle dans l'expression du CYP2B6 allant jusqu'à 100 fois, pourrait être expliquée par les nombreux polymorphismes, soit plus de

100 polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs) référencés, qui ont été découverts dans son gène [76, 80].

b) CYP2C

Quatre isoenzymes appartenant à la sous-famille des CYP2Cs ont été identifiées chez l'humain : CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 et CYP2C19. On considère que ces isoenzymes ont une homologie de plus de 80% dans leurs séquences d'acides aminés [81]. La famille des CYP2Cs compte pour environ 20 à 25% des CYP450s hépatiques totaux et métabolisent environ 25% des médicaments utilisés en clinique [36, 56, 58]. Des quatre isoenzymes, l'isoenzyme CYP2C9 est la plus abondante au niveau hépatique [58]. Le CYP2C10 a également été découvert mais sa séquence d'acides aminés possédant trop d'homologie avec le CYP2C9, il n'est pas considéré comme un gène spécifique, mais comme un pseudo-gène du CYP2C9 [81, 82]. D'un point de vue clinique, les CYP2C8, CYP2C9 et CYP2C19 sont les plus importantes, et ce sont ces trois isoenzymes qui seront décrites ci-dessous.

Différentes études ont montré que le CYP2C18 est très peu exprimé au niveau hépatique mais que son expression est plus importante au niveau des poumons et de la peau [24, 27, 48]. Également, il ne métabolise qu'un nombre très faible de médicaments et son expression ne peut être induite contrairement aux CYP2C8, CYP2C9 et CYP2C19 lesquels peuvent être induits par la rifampicine [58]. Jusqu'à présent, le rôle clinique du CYP2C8 est considéré limité. Les isoenzymes de la sous-famille CYP2C, et principalement les CYP2C9 et CYP2C19, ont de nombreux polymorphismes génétiques, ainsi une variabilité interindividuelle très importante, pouvant aller jusqu'à 100 fois en fonction de l'isoenzyme, est observée [57, 83]. Ces polymorphismes génétiques influent considérablement sur les effets bénéfiques et/ou toxiques des substrats de ces isoenzymes.

CYP2C8

L'intérêt du CYP2C8 dans la métabolisation des médicaments n'a été démontré que récemment. En comparant les trois isoenzymes cliniquement importantes de la sous-famille CYP2C, le CYP2C8 est celui qui métabolise le moins de médicaments, soit environ 5% des médicaments utilisés en clinique [36]. Il est cependant autant exprimé dans le foie que le CYP2C19, soit environ 5% des CYP450s hépatiques totaux [58]. Des niveaux d'expression du CYP2C8 ont

également été retrouvés dans d'autres organes comme le rein, le cerveau, les poumons, l'utérus, les glandes mammaires, les ovaires, le duodénum et les glandes surrénales [84].

Le CYP2C8 métabolise différents médicaments comme l'anticancéreux paclitaxel, des antidiabétiques (répaglinide, rosiglitazone, pioglitazone) ou des statines (cerivastatine) et plusieurs de ses substrats sont également substrats du CYP2C9 et du CYP3A4, d'où un chevauchement important dans leur spécificité [58, 84]. Le gemfibrozil est un inhibiteur connu et très puissant du CYP2C8. Par exemple, Lau *et al.* ont démontré, à l'aide d'un cas clinique, la présence d'interactions médicamenteuses significatives suivant la prise du gemfibrozil et d'une statine, la cerivastatine [85]. Des cas de rhabdomyolyses sévères ont été associés à cette interaction médicamenteuse, ce qui a entraîné le retrait de la cerivastatine sur le marché en 2001. Également, tout comme les CYP2C9 et CYP2C19, la rifampicine et les barbituriques peuvent induire l'expression du CYP2C8 [58].

CYP2C9

Dans la sous-famille CYP2C, le CYP2C9 est le cytochrome le plus abondant au niveau hépatique, soit environ 15% des CYP450s hépatiques totaux, et il représente ainsi la deuxième isoenzyme la plus exprimée dans le foie [58]. Il est également le cytochrome de la sous famille CYP2C le plus impliqué dans le métabolisme des médicaments en métabolisant environ 13% des médicaments utilisés en clinique [36]. Des niveaux d'expression du CYP2C9 ont également été observés au niveau du petit intestin [27]. Au vu de son expression hépatique et de son importance clinique, le CYP2C9 est un cytochrome majeur dans le devenir des xénobiotiques dans l'organisme.

De nombreuses classes de médicaments sont métabolisées par le CYP2C9 telles que des antidiabétiques (tolbutamide), anticoagulant (S-Warfarine), antiépileptique (phénytoïne), antihypertenseur (losartan) et certains anti-inflammatoires non stéroïdiens (naproxène, ibuprofène) [86]. Des inhibiteurs importants du métabolisme des substrats de CYP2C9 ont été reportés, comme le sulfaphénazole et le fluconazole. En plus de la rifampicine, le phénobarbital peut également induire l'expression du CYP2C9. Les polymorphismes génétiques les plus importants, observés dans la population, résultent en une activité diminuée du cytochrome [83].

Cependant, la fréquence des métaboliseurs lents est relativement faible soit 1 à 2% de la population.

CYP2C19

Le CYP2C19 représente environ 5% des CYP450s hépatiques totaux et métabolise environ 7% des médicaments utilisés en clinique [36, 58]. Il est donc, après le CYP2C9, l'isoenzyme la plus importante de la sous-famille CYP2C. Comme le CYP2C9, des niveaux d'expression du CYP2C19 ont été observés dans le petit intestin [27].

Ce cytochrome métabolise différentes classes de substrats comme la S-méphénytoïne, l'antiplaquettaire clopidogrel, l'anticoagulant R-warfarine, des inhibiteurs de la pompe à proton comme l'oméprazole, des antidépresseurs tricycliques et l'antimalarique proguanil [58, 60, 87, 88]. Comme pour le CYP2C9, la rifampicine et le phénobarbital peuvent induire l'expression de ce cytochrome. En comparaison au CYP2C9, une plus grande variabilité inter-individuelle dans l'expression du CYP2C19 a été reportée dû à de nombreux polymorphismes génétiques [83]. La majorité de ces polymorphismes entraineraient une diminution de l'activité du CYP2C19. Des études ont montré que cette variabilité serait également dépendante des ethnies, avec environ 2 à 5% de métaboliseurs lents chez les caucasiens et 18 à 23% chez les japonais [89, 90].

c) CYP2D6

Trois isoenzymes ont été découvertes dans la sous-famille des CYP2Ds : CYP2D6, CYP2D7 et CYP2D8 [91]. Les CYP2D7 et CYP2D8 sont cependant des pseudo-gènes non fonctionnels du CYP2D6, et on considère ainsi que le CYP2D6 est le seul membre de cette sous famille. Même si, au niveau hépatique, le CYP2D6 ne compte pour qu'environ 5% des CYP450s hépatiques totaux, il a un rôle clinique majeur en métabolisant environ 20% des médicaments utilisés en clinique [36, 58]. Ce cytochrome représente la deuxième isoenzyme la plus impliquée dans le devenir des médicaments dans l'organisme. En plus du foie, le CYP2D6 est également exprimé dans le petit intestin, les poumons, le cœur et le cerveau [27, 92].

D'un point de vue structural, des études ont montré que de nombreux substrats du CYP2D6 contenaient un atome d'azote basique à environ 0,5 à 0,7 nm du site d'oxydation et qu'il jouait

ainsi un rôle important dans la biotransformation de nombreuses classes de médicaments avec une fonction aminée comme des antidépresseurs (désipramine), des antihypertenseurs (débrisoquine), des analgésiques (codéine, oxycodone, hydrocodone), des β -bloqueurs (bufuralol, metoprolol), le dextrométhrophane, des antiarythmiques (propafénone) et des antipsychotiques (thioridazine, chlorpromazine) [57, 92]. L'antiarythmique, quinidine, est un inhibiteur très puissant du CYP2D6 mais il n'est pas un substrat de ce cytochrome [93]. La quinidine entraîne des interactions médicamenteuses majeures pouvant résulter en une absence totale de biotransformation des substrats du CYP2D6 et ainsi en une toxicité ou inefficacité du médicament (en présence de pro-drogue).

Le CYP2D6 est l'un des cytochromes ayant le plus de polymorphismes génétiques dans la population [68]. Il est caractérisé par une variabilité interindividuelle et une variabilité inter-ethnique très importante qui ont des impacts majeurs en clinique. On considère que les polymorphismes du CYP2D6 ont une influence sur le métabolisme d'environ 50% des médicaments qu'il métabolise [94]. L'exemple le plus probant, ayant permis de découvrir les impacts cliniques majeurs des polymorphismes du CYP2D6, est celui de la débrisoquine, un agent antihypertenseur [95]. L'utilisation de cet antihypertenseur fut associée à des réactions adverses d'hypotension orthostatique et ces patients présentaient des concentrations élevées de la débrisoquine et des concentrations faibles du métabolite dans leurs urines. Deux groupes de patients furent ainsi identifiés, des métaboliseurs lents et des métaboliseurs rapides du CYP2D6. A partir des années 1979, de nombreux polymorphismes furent découverts dans ce gène [94]. On considère que l'étendue de la variabilité interindividuelle dans l'expression du CYP2D6 est de plus de 1000 fois [57].

d) CYP2E1

L'isoenzyme CYP2E1 est la seule isoenzyme de la sous-famille CYP2E qui a été caractérisée jusqu'à présent. Bien que ce cytochrome ne métabolise que 3% des médicaments utilisés en clinique, il est fortement exprimé au niveau hépatique, soit environ 15% des CYP450s hépatiques totaux [36, 58]. Des niveaux d'expression ont également été mesurés dans des tissus extra-hépatiques comme les poumons, le placenta, le cœur, le cerveau, l'œsophage et le petit intestin [27, 57].

Le CYP2E1 joue un rôle dans le métabolisme de peu de composés mais de classes très différentes. Il est majoritairement impliqué dans les processus de toxicité liés à la biotransformation de nombreux composés chimiques tels que le benzène, le styrène, les composés polyhalogénés, l'aniline, des anesthésiques halogénés [96]. L'isoenzyme CYP2E1 est également impliquée dans le métabolisme des anesthésiques halogénés comme l'halothane, l'enflurane ou l'uréthane [97]. Quelques xénobiotiques comme la chlorzoxazone et l'acétaminophène sont également métabolisés par le CYP2E1 [57, 98].

Le rôle du CYP2E1 a également été fortement étudié pour son implication dans l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et des études suggèrent que le CYP2E1 jouerait un rôle dans la tératogénicité provenant de l'éthanol [99]. Il est maintenant bien reconnu que l'enzyme alcool déshydrogénase est la plus impliquée dans la métabolisation de l'alcool mais le CYP2E1 contribue également à cette biotransformation [100]. Certains substrats du CYP2E1, comme l'éthanol ou le benzène, peuvent induire l'activité du cytochrome [99]. Différentes études ont montré que certaines conditions pathologiques pouvaient également induire l'activité du CYP2E1 comme le diabète, l'obésité ou certaines maladies hépatiques et que le CYP2E1 pourrait également contribuer au processus pathologique de ces maladies [99, 101]. Ce cytochrome est l'un des CYP450s avec le moins de polymorphismes génétiques et est donc un gène très bien conservé [88].

e) CYP2J2

L'isoenzyme CYP2J2 n'est principalement exprimée que dans des organes et tissus extra-hépatiques comme le cœur, les poumons, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, le colon, les reins, la muqueuse nasale et le pancréas [27, 102, 103]. Cette isoenzyme est faiblement impliquée dans le métabolisme des médicaments utilisés en clinique, soit environ 3% des médicaments [36]. Peu d'études ont évalué le rôle du CYP2J2 dans le métabolisme des xénobiotiques, ainsi peu de substrats sont aujourd'hui connus pour être biotransformés par ce cytochrome. Les antihistaminiques de deuxième génération comme l'ébastine ou l'astémizole et les immunosuppresseurs comme la cyclosporine sont des substrats du CYP2J2 [104-106]. Il est important de noter qu'il existe un chevauchement important dans la spécificité des substrats entre le CYP2J2 et le CYP3A4 [106]. Le rôle de cette isoenzyme dans la prédisposition à

certaines cancers a été beaucoup étudié et des études ont montré des niveaux d'expression élevés du CYP2J2 dans divers tissus tumoraux [107].

1.1.3.3. CYP3

La famille des CYP3s est composée d'une seule sous-famille, la sous-famille des CYP3As, qui est la plus importante des sous-familles des CYP450s d'une part parce que les isoenzymes de cette sous-famille sont les plus abondantes dans le foie humain, soit plus de 35% des CYP450s hépatiques totaux, et d'autre part parce que ces isoenzymes métabolisent de nombreux médicaments utilisés en clinique, soit plus de 30% [36, 58]. Cette sous-famille est également exprimée dans des organes et tissus extra-hépatiques comme l'intestin grêle, le colon, la peau, le placenta, les reins, les poumons, l'utérus, l'œsophage, la muqueuse nasale, le fœtus mais les niveaux d'expression les plus élevés ont été mesurés dans le foie et le petit intestin [27, 57].

Cette sous-famille comprend 4 isoenzymes soit les CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 et CYP3A43 [108]. Ces quatre isoenzymes ont un chevauchement important dans la spécificité de leurs substrats et principalement les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5. Ces deux isoenzymes présentent également un profil d'homologie dans la séquence de leurs acides aminés d'environ 85%, mais leurs profils d'expression tissulaire est très différent. En effet, l'isoenzyme CYP3A4 est l'isoenzyme la plus exprimée au niveau hépatique et intestinal tandis que même si des niveaux d'expression du CYP3A5 sont également mesurés dans le foie et les intestins, son expression dans les organes extra-hépatiques comme l'estomac, le colon, le cerveau, les reins et les poumons est beaucoup plus importante. Schuetz *et al.* ont montré que le CYP3A7 est exprimé principalement dans le foie fœtal [109]. Domanski *et al.* et Westlind *et al.* ont montré que le CYP3A43 est quant à lui principalement exprimé dans des organes extra-hépatiques comme la prostate et les testicules et très faiblement dans le pancréas, les muscles squelettiques, le foie adulte, le foie fœtal et les reins [110, 111]. Le CYP3A43 est le moins abondant et le moins important des CYP450s de la sous-famille CYP3A et ne sera pas étudié dans ce projet de recherche. Bien que les isoenzymes de la sous-famille CYP3A ne soient pas aussi polymorphiques que l'isoenzyme CYP2D6, le contenu en CYP3A dans le foie et les intestins est très variable selon les individus [108].

a) CYP3A4

D'un point de vue clinique, l'isoenzyme CYP3A4 est l'isoenzyme la plus importante de la famille des CYP3As mais également de toutes les sous-familles des CYP450s, car elle métabolise plus de 30-50% des médicaments utilisés en clinique et qu'elle est majoritairement exprimée dans les organes d'élimination des médicaments [36]. Le CYP3A4 n'est pas exprimé dans le foie fœtal mais devient l'isoenzyme la plus exprimée dans les foies de nouveau nés et dans les foies adultes [109, 112]. Des données suggèrent qu'elle soit également l'isoenzyme la plus abondante au niveau de l'intestin grêle et représenterait environ 80% du contenu en CYP450s intestinaux totaux [113, 114]. Les niveaux d'expression très élevés dans les hépatocytes et les entérocytes confirment que le CYP3A4 joue un rôle crucial dans le devenir des médicaments dans l'organisme et principalement dans les effets de premier passage entérique et hépatique des médicaments administrés par voie orale. On retrouve également des faibles niveaux d'expression dans d'autres organes extra-hépatiques comme les poumons, l'estomac, l'œsophage et le colon [27].

Ce cytochrome biotransforme de nombreux médicaments de classes pharmaceutiques très variées comme des bloqueurs des canaux calciques (diltazem, verapamil, félodipine, nifédipine), des statines (simvastatine, atorvastatine), des anesthésiques (lidocaïne), des immunosuppresseurs (cyclosporine, tacrolimus), des benzodiazépines (midazolam, triazolam), des antirétroviraux (indinavir, ritonavir), des antidépresseurs (sertraline) mais également des composés endogènes comme la testostérone, la progestérone, l'androstenedione et l'acide biliaire [57, 58]. Ce cytochrome a également un nombre élevé d'inhibiteurs, comme des agents antifongiques (kétoconazole, fluconazole), des antibactériens (clarithromycine, érythromycine) et des composants de l'alimentation (jus de pamplemousse) [58]. L'activité du CYP3A4 peut également être induite par de nombreux composés comme des barbituriques, la phénytoïne, la carbamazépine ou la rifampicine qui agissent en augmentant les niveaux d'expression du CYP3A4. D'un point de vue structural, le site actif du CYP3A4 est très large et flexible ce qui permet à des composés de structures très différentes de se lier au site actif mais également à plusieurs molécules de petites tailles simultanément. Cela pourrait expliquer que le CYP3A4 est un cytochrome ayant une grande variété de substrats de structures différentes, une faible

spécificité envers ses substrats et cela expliquerait également le chevauchement dans la sélectivité des substrats entre les isoenzymes CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7.

L'expression du CYP3A4 est très variable selon les individus. On considère que les variations interindividuelles dans des foies adultes peuvent être de l'ordre de 10 à 100 fois et que le CYP3A4 peut représenter jusqu'à 60% du contenu en CYP450s hépatiques totaux [115]. Les mécanismes pouvant expliquer cette variabilité interindividuelle ne sont pas encore totalement compris mais les facteurs génétiques (polymorphismes génétiques) et les facteurs non génétiques (facteurs environnementaux, maladies, diètes) pourraient en être à l'origine [116]. Cependant, il est important de préciser que seulement une vingtaine de polymorphismes génétiques ont été décrits dans le gène du CYP3A4 [68]. Des études ont montré que ces polymorphismes étaient peu fréquents dans la population et/ou qu'ils n'influençaient pas de façon reproductible et significative l'activité du CYP3A4.

L'isoenzyme CYP3A4 est considérée comme étant celle ayant le plus d'impact en clinique. En effet, l'inhibition et l'induction de l'activité du CYP3A4 par de nombreux composés exogènes ainsi que sa large variété de substrats confirment le rôle cliniquement important de ce cytochrome ainsi que son implication dans de potentielles interactions médicamenteuses. De nos jours, beaucoup de patients sont âgés, ont plusieurs maladies et le recours à une polypharmacie est souvent requis pour traiter les différentes comorbidités. L'administration concomitante de plusieurs médicaments résulte en une probabilité augmentée d'interactions médicamenteuses. C'est pourquoi les interactions médicamenteuses dues à des inhibitions ou des inductions de l'activité du CYP3A4 pourront avoir un impact majeur sur la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale et ainsi, sur la réponse observée en clinique. On peut prendre l'exemple de l'utilisation en clinique de la cyclosporine avec la rifampicine ou le millepertuis, des inducteurs du CYP3A4, qui a été associée avec des rejets de greffon du a une immunosuppression inadéquate avec la cyclosporine (expliquée par son élimination augmentée entraînant des concentrations plasmatiques inefficaces) [117]. Un autre cas clinique de patients prenant du terféndine et du kétoconazole, un inhibiteur du CYP3A4, a montré une augmentation des concentrations de terféndine associée à des torsades de pointes et des décès chez ces patients [118]. Les interactions médicamenteuses peuvent aussi bien influencer le profil

d'efficacité que le profil de toxicité du médicament. C'est pourquoi l'inhibition et l'induction de l'activité du CYP3A4 en clinique sont très contrôlées et étudiées.

b) CYP3A5

L'isoenzyme CYP3A5 est la deuxième isoenzyme la plus importante de la sous-famille des CYP3As. Le CYP3A5, tout comme le CYP3A4, est exprimé au niveau du foie et de l'intestin grêle mais son expression est très faible comparativement à celle du CYP3A4 [108]. A l'inverse, Koch *et al.* démontrent que dans les organes extra-hépatiques l'expression du CYP3A5 est supérieure à celle du CYP3A4 [119]. On retrouve des niveaux d'expression du CYP3A5 dans l'estomac, l'œsophage, le colon, les reins, les poumons, le foie fœtal, la prostate et les glandes surrénales [27, 119-121].

Les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 ont une homologie dans leurs séquences d'acides aminés de plus de 85% et présentent une très forte homologie dans la spécificité de leurs substrats et de leurs inhibiteurs [58, 108]. Il est ainsi difficile de différencier, lors des études de métabolisme *in vivo*, la proportion de métabolites formés par le CYP3A4 de ceux formés par le CYP3A5. A ce jour, aucun composé n'a été proposé comme étant seulement métabolisé par l'une ou l'autre des isoenzymes. Bien que certains médicaments soient préférentiellement métabolisés par le CYP3A5 comme le tacrolimus ou par le CYP3A4 comme l'érythromycine, la cyclosporine, la progestérone et l'androstenedione, les études de métabolisme *in vivo* s'intéresseront majoritairement à l'activité des CYP3A4/5 simultanément [109, 122, 123]. De plus, les inducteurs du CYP3A4 induiraient plus faiblement l'activité du CYP3A5 [24].

Contrairement au CYP3A4, le CYP3A5 est une enzyme très polymorphique. En effet, même si le CYP3A5 n'est qu'exprimé que dans un nombre restreint de foies adultes, lorsqu'elle est exprimée, les niveaux d'expression du CYP3A5 sont souvent comparables ou supérieurs à ceux du CYP3A4. L'étude de Kuehl *et al.* démontre que le CYP3A5 peut représenter jusqu'à 50% des CYP3As hépatiques chez des individus avec polymorphismes génétiques [124]. De plus, les polymorphismes génétiques seraient ethniques-dépendant avec une majorité des foies adultes exprimant le CYP3A5 chez les afro-américains. L'activité du CYP3A5 est ainsi essentielle dans le devenir des médicaments de ces individus. Sachant que la sous-famille des CYP3As est la sous-famille la plus impliquée dans la biotransformation des médicaments, le CYP3A5 pourrait

être le cytochrome polymorphe le plus important de par la variabilité interindividuelle et interethnique dans son expression protéique.

c) CYP3A7

Le CYP3A7 présente une homologie de plus de 80% dans sa séquence d'acides aminés avec les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5. Ce cytochrome est de moindre importance pour les études de métabolisme *in vivo* et est cliniquement moins important que le CYP3A4 ou le CYP3A5 [109]. Le CYP3A7 est principalement exprimé dans les foies fœtaux mais il est également important de souligner que de faibles niveaux d'expression du CYP3A5 sont également observés dans les foies fœtaux mais qu'aucun niveau d'expression du CYP3A4 n'a été détecté. Le CYP3A7 est également exprimé dans le placenta et dans l'endomètre, et Scheutz *et al.* ont observé que la quantité de CYP3A7 augmentait au deuxième trimestre de grossesse dans ces deux tissus [125]. L'étude de Tateishi *et al.* démontre que le CYP3A7 est exprimé dans quelques foies de patients périnatales et chez des enfants, mais que les niveaux d'expression diminuent avec les années, pour ne plus être exprimé après l'enfance [126]. D'autres tissus fœtaux comme les reins, les poumons et les glandes surrénales expriment de faibles niveaux du CYP3A7.

1.1.3.4. CYP4

Depuis quelques années, plusieurs groupes se sont intéressés à la famille CYP4 et principalement à la sous-famille CYP4F [37, 38]. Cette sous famille compte 6 membres : les CYP4F2, 4F3, 4F8, 4F11, 4F12 et 4F22 [35]. Une récente étude de Michaels et Wang a montré, en quantifiant certaines isoenzymes des CYP450s par spectrométrie de masse, que la sous-famille CYP4F serait la troisième sous-famille la plus exprimée dans des microsomes de foies humain après les sous-familles CYP3A et CYP2C, et elle pourrait représenter jusqu'à 15% des CYP450s totaux dans le foie [38]. Leurs résultats montrent également que les CYP4F2 et 4F3 seraient les isoenzymes les plus abondantes de la sous-famille CYP4F dans le foie. Ces deux isoenzymes sont présentement peu connues pour leurs rôles dans le métabolisme des médicaments. L'isoenzyme CYP4F2 serait davantage impliquée dans le métabolisme de nombreux composés endogènes comme l'agent pro-inflammatoire LTB₄, l'acide arachidonique, la vitamine E ou encore la vitamine K₁ comparativement au CYP4F3 [127-130]. Une étude de métabolisme avec des microsomes intestinaux réalisée par Wang *et al.* a montré

que la sous-famille CYP4F était présente dans l'intestin et qu'elle était impliquée dans l'effet de premier passage du pafuramidine (DB289), un antiparasitaire non commercialisé [131]. Jusqu'à maintenant, aucune autre étude de métabolisme ou de quantification absolue des CYP4Fs dans des microsomes hépatiques ou intestinaux n'a été publiée pour confirmer ces résultats.

1.2. Substrats marqueurs et méthodes de quantification

1.2.1. Les substrats marqueurs

L'activité des CYP450s peut être modulée par de nombreux facteurs. Des variabilités interindividuelles dans l'expression ou l'activité des CYP450s contribuent aux importantes variations dans l'absorption, les concentrations plasmatiques, la biodisponibilité, la clairance des médicaments et ainsi dans leurs profils d'efficacité et de toxicités. Une mesure phénotypique de chacune des différentes isoenzymes des CYP450s permet l'évaluation de leur capacité à métaboliser les médicaments. L'évaluation de l'activité des CYP450s va être dépendante de plusieurs facteurs comme les polymorphismes génétiques, les interactions médicamenteuses, les facteurs environnementaux, des facteurs endogènes et la présence de maladies.

Lors des études *in vivo*, le phénotype de chaque isoenzyme est mesuré avec le ratio métabolique plasmatique et/ou urinaire de médicaments spécifique à l'activité d'une isoenzyme des CYP450s suivant une administration orale des médicaments. Ces médicaments, appelés substrats marqueurs, sont choisis comme étant majoritairement métabolisés par une voie métabolique et ils sont donc spécifiques à l'activité d'une isoenzyme particulière. Pour les CYP3A4 et CYP3A5, la très grande spécificité de leurs substrats et leur co-expression dans le foie et l'intestin grêle impliquent qu'on ne peut que difficilement les distinguer lors des études de métabolisme *in vivo*. On considérera alors que le substrat marqueur choisi permet une mesure de l'activité globale du CYP3A4/5.

Pour le premier projet de recherche, les isoenzymes les plus couramment impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques chez l'humain seront évaluées soit les CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4/5. Plusieurs substrats marqueurs, comme

ceux indiqués dans la Table 1, sont souvent utilisés dans des cocktails de médicaments pour évaluer l'activité des CYP450s mais certains d'entre eux ont soit des profils d'effets secondaires importants ou ils ont été retirés du marché dans plusieurs pays.

Table 1 : Substrats marqueurs couramment utilisés pour déterminer les activités spécifiques des isoenzymes des CYP450s et leurs marqueurs phénotypiques associés [57].

CYP450s	Substrats marqueurs	Ratios métaboliques
CYP1A2	Caféine, phénacétine	Ratio plasmatique
CYP2B6	Bupropion, efavirenz	Ratio urinaire
CYP2C9	Tolbutamide, warfarine, losartan	Ratio urinaire
CYP2C19	Oméprazole, méphénytoïne	Ratio plasmatique
CYP2D6	Dextrométhrophane, débrisoquine	Ratio urinaire
CYP2E1	Chlorzoxazone	Ratio urinaire
CYP3A4/5	Midazolam, dompéridone	Ratio plasmatique

1.2.2. Quantification des substrats marqueurs dans le plasma ou l'urine

1.2.2.1. Cocktail de substrats marqueurs

Dans les études de métabolisme *in vivo*, les ratios métaboliques plasmatiques ou urinaires des substrats marqueurs permettent de déterminer les activités spécifiques des isoenzymes. Les méthodes pour caractériser les différents phénotypes sont soit l'administration d'un seul et unique substrat marqueur à la fois pour l'analyse séparée de plusieurs isoenzymes ou l'utilisation d'un cocktail de médicaments combinés administré simultanément. Le principal avantage à l'utilisation d'un cocktail de médicaments est d'obtenir des informations sur la capacité métabolique de plusieurs isoenzymes en une seule expérience. D'un point de vue clinique, cela permet de diminuer la durée des études cliniques et principalement de diminuer la quantité et le nombre d'échantillons de sang et d'urine prélevés chez les patients, ce qui est un facteur très limitant lors des études *in vivo*. L'utilisation d'un cocktail comparé à

l'administration d'un seul composé doit prendre en compte plusieurs paramètres et particulièrement, les substrats marqueurs doivent être spécifiques à une isoenzyme et ils ne doivent pas interférer avec les autres substrats du cocktail.

1.2.2.2. Préparation des échantillons

Dans ce projet de recherche, on s'intéresse au développement d'une méthode pour quantifier simultanément un cocktail de substrats marqueurs dans le plasma et dans l'urine. Une fois les prélèvements des échantillons réalisés, les substrats marqueurs et les métabolites formés doivent être analysés par LC-MS/MS.

Pour pouvoir quantifier les analytes dans les fluides biologiques par LC-MS/MS, plusieurs étapes de traitement et de purification de l'échantillon sont indispensables avant de pouvoir analyser les composés [132]. Celles-ci seront succinctement expliquées :

a) Échantillon sanguin

- Centrifugation : L'analyse des composés dans le sang passe par une première étape de centrifugation, permettant de séparer les différents constituants du sang. Le plasma contenant entre autres les protéines plasmatiques et les composés d'intérêts, est isolé par centrifugation.
- Extraction des analytes et purification de l'échantillon plasmatique : Les protéines plasmatiques contenues dans le plasma doivent être éliminées avant l'analyse des échantillons plasmatiques. Les méthodes les plus couramment utilisées sont la précipitation des protéines, l'extraction liquide-liquide ou l'extraction en phase solide [132, 133]. Dans le cadre de mon projet, nous utilisons une simple précipitation des protéines. Les protéines peuvent être précipitées par des solvants organiques comme l'acétonitrile, le méthanol ou l'acétone. Une fois les protéines plasmatiques précipitées, la centrifugation permet de les séparer du reste de l'échantillon.

b) Échantillon urinaire

- Prétraitement de l'échantillon urinaire : Certains métabolites résultant d'une biotransformation de phase I deviennent substrats d'une réaction de phase II. La voie métabolique majeure de la biotransformation de phase II est la glucuronidation. Une étape de déconjugaison enzymatique des métabolites glucuronidés est nécessaire pour pouvoir

analyser le métabolite de phase I préalablement formé. L'enzyme β -glucuronidase est utilisée pour l'hydrolyse enzymatique des glucuronides formés et retrouvés dans l'urine; une incubation avec celle-ci à 37 °C pendant 16 h est effectuée. Avant l'analyse des composés par LC-MS/MS, une simple dilution des échantillons urinaires est réalisée.

Après purification et prétraitement, les échantillons plasmatiques et urinaires pourraient être directement analysés par LC-MS/MS. Cependant, la majorité des méthodes analytiques requiert davantage d'étapes, par exemple des étapes de reconstitution de l'échantillon, d'ajout de tampon pour modifier le pH, d'évaporation des échantillons et/ou une simple dilution.

1.2.2.3. Étalonnage interne pour quantifier les analytes

a) Principe de l'étalonnage interne

Pour pouvoir déterminer les concentrations des substrats marqueurs et des métabolites dans les échantillons, on utilise la méthode de l'étalonnage interne. Le principe de cette méthode est d'ajouter des composés de concentrations connues, appelés standards internes. Un standard interne doit avoir des propriétés physicochimiques (hydrophobicité, ionisation) identiques ou similaires au composé analysé afin de mimer au mieux sa réponse [132]. En effet, l'ajout de standard interne permet de réduire l'impact de manipulation, des variations de l'instrumentation, comme les variations lors de l'injection, et des propriétés propres au composé analysé comme de faibles seuils de détection des signaux ou de faibles recouvrements.

b) Standard interne stable marqué isotopiquement

Pour quantifier les analytes, on utilise dans ce projet, des standards internes stables marqués isotopiquement (^{15}N , ^{13}C ou ^2H) qui sont spécifiques à chaque substrat et à chaque métabolite et qui seront ajoutés dans les courbes de calibration et dans les échantillons biologiques cliniques. La différence de masse obtenue entre les atomes isotopiques et non isotopiques permet de distinguer les analytes des standards internes en spectrométrie de masse (MS). L'avantage de l'utilisation de standards stables marqués isotopiquement, contrairement à un composé chimiquement différent, est de diminuer toute source de variabilité puisqu'ils possèdent une réponse analytique très similaire à l'analyte (aire du pic chromatographique, temps de rétention, capacité d'ionisation). Il faut également préciser, que le standard interne doit avoir un degré de pureté très élevé car il ne doit pas contribuer à plus de 20% au pic de la plus

basse concentration quantifiable (LLOQ ou Lower Limit Of Quantification) de la courbe de calibration pour ne pas influencer significativement l'aire du pic chromatographique de l'analyte et ainsi ne pas augmenter la variabilité entre les échantillons (inter-échantillons).

c) Quantification par étalonnage interne

Le standard interne est ajouté à la même concentration dans les échantillons cliniques, où les concentrations des analytes sont inconnues ainsi que dans les échantillons de la courbe de calibration, où les concentrations des analytes sont connues [132]. Le standard interne est souvent préparé dans un solvant organique afin de réaliser l'étape de précipitation des protéines en même temps que l'ajout des standards internes.

La courbe de calibration permet de tracer une droite de calibration avec sur l'axe des x, les concentrations connues de l'analyte, et sur l'axe des y, la réponse analytique soit le ratio $\left(\frac{\text{Aire analyte}}{\text{Aire standard interne}}\right)$. L'équation de la droite de calibration et les ratios obtenus dans chaque échantillon permet, en extrapolant les concentrations inconnues des échantillons cliniques sur la courbe de calibration, de déterminer les concentrations des analytes dans les échantillons plasmatiques et urinaires. Cette courbe de calibration doit avoir une gamme de concentrations suffisamment large pour couvrir l'étendue des concentrations attendues en clinique.

1.2.2.4. Validation de méthodes analytiques

Les méthodes analytiques développées doivent être validées selon les critères des directives préétablies. Souvent les directives de la Food and Drug Administration américaine sont utilisés comme guide standard de référence [134]. Tous les analytes doivent être évalués pour plusieurs critères : linéarité, sélectivité, précision, justesse, sensibilité, recouvrement, effet de matrice et stabilité (cycles de congélation/décongélation, court terme, long terme, stock, échantillonneur). Les critères à respecter seront détaillés de façon succincte ci-dessous :

a) Linéarité

Une courbe de calibration est générée pour chaque analyte avec un nombre suffisant de standards, un échantillon zéro (matrice avec le standard interne) et un blanc de matrice. Idéalement, le modèle linéaire 1/X pour décrire la relation entre la concentration théorique et la

réponse du détecteur doit être utilisé. Un coefficient de corrélation des courbes de calibration le plus proche possible de 1,0 est visé.

b) Sélectivité

La méthode analytique doit être suffisamment sélective pour différencier et quantifier tous les analytes en présence des autres composés présents dans l'échantillon. Chaque analyte est testé pour s'assurer qu'il n'y ait aucune interférence avec les autres composés. Elle est également déterminée dans des blancs de matrices pour s'assurer qu'aucun analyte d'intérêt n'est présent.

c) Précision et justesse

La précision et la justesse sont déterminées à deux niveaux : intra-journée et inter-journée. La mesure de la variabilité intra-journée est évaluée en analysant trois contrôles qualités (QC) de concentrations différentes en 6 réplicas à l'intérieur d'une même journée. La mesure de la variabilité inter-journée est évaluée en analysant trois QC de concentrations différentes en 6 réplicas de trois journées différentes, pour un total de 18 mesures. Le critère de précision s'assure que la méthode est suffisamment précise pour être appliquée à six mesures répétées d'une même concentration tandis que la justesse permet de comparer les concentrations obtenues aux concentrations théoriques.

La précision est évaluée avec la déviation standard relative (RSD) et doit être meilleure que 15%. La justesse est évaluée avec l'erreur relative et elle doit être comprise entre 85-115%. Également, 50% des QC intra-journée et 66.6% des QC inter-journée doivent respecter les critères de validation.

d) Sensibilité

La sensibilité est la mesure de la précision et de la justesse de la LLOQ de chaque analyte. La précision doit être meilleure que 20% et la justesse doit être comprise entre 80-120%.

e) Recouvrement

Le recouvrement évalue l'efficacité de l'extraction des analytes. Pour cela, il faut comparer le ratio (Aire analyte/Aire IS) obtenu d'une concentration connue d'analyte ajoutée dans une matrice biologique puis extrait, à une concentration connue d'analyte ajoutée après l'extraction.

L'échantillon comprenant l'analyte ajouté après extraction correspond à la concentration théorique et ainsi à 100% d'extraction de l'analyte.

f) Effet de matrice

Les effets de matrice sont testés à deux concentrations en 6 répliques dans au moins 6 matrices biologiques différentes. La précision et la justesse seront calculées pour les deux concentrations et les mêmes critères que détaillés plus haut sont utilisés.

g) Stabilité

La stabilité des analytes est évaluée sous plusieurs conditions :

- Stabilité des cycles de congélation/décongélation

Au moins trois cycles de congélation/décongélation doivent être réalisés à deux niveaux de QC en triplicata. La congélation doit se faire durant au moins 12 h et la décongélation est réalisée de manière non assistée.

- Stabilité à court terme

Elle vise à évaluer la stabilité des analytes, à deux niveaux de QC en triplicata, dans les matrices biologiques à température ambiante (ou température utilisée pour valider les méthodes analytiques) pendant une période de 4 à 24 h. La période de temps est basée sur la durée attendue où les échantillons cliniques resteront à température ambiante (ou température préétablie selon le protocole) avant d'être congelés.

- Stabilité à long terme

Des triplicatas de deux niveaux de QC doivent être congelés pendant une durée plus longue que la durée attendue entre la congélation d'un échantillon et son analyse. Une durée d'un mois de stabilité à long terme est souvent conseillée.

- Stabilité des stocks

Les solutions stocks de chaque analyte et standard interne doivent être stables pendant au moins 6 h à température ambiante.

Les résultats de stabilité sont déterminés à l'aide d'une courbe « fraîche » et les précisions doivent être meilleures que 15% et les justesses doivent être entre 85 et 115%.

1.2.2.5. Analyse des échantillons

La méthode la plus utilisée pour la détection et la quantification de substrats marqueurs et de leurs métabolites est la chromatographie en phase liquide (LC). Plusieurs cocktails de substrats marqueurs ont déjà été validés dans la littérature en utilisant la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Toutefois, cette méthode manque de sensibilité nécessitant l'administration de doses élevées de substrats marqueurs. D'ailleurs, c'est l'une des raisons pour laquelle depuis plusieurs années, la chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS) est largement utilisée. Cette technique démontre une meilleure sensibilité et sélectivité ce qui permet la mesure de nombreux composés et l'utilisation de plus petits volumes de sang.

1.3. Technologie LC-MS/MS

1.3.1. La chromatographie en phase liquide

La Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) est une méthode qui permet de séparer les différents composants d'un mélange. Cet appareil implique l'utilisation d'une phase stationnaire ou colonne stationnaire et d'une phase mobile liquide. De façon générale, la phase mobile circule à travers la phase stationnaire en entraînant avec elle les différents composants de l'échantillon. Les composés, selon leurs propriétés physicochimiques et leurs affinités avec la phase mobile et la phase stationnaire, vont éluer à différents temps de rétention ce qui permet de séparer les composés d'un même échantillon. Plus les interactions entre les composés et la phase stationnaire sont importantes et plus le composé éluera tardivement. À l'inverse, plus les interactions sont faibles et plus le composé éluera rapidement.

On distingue deux types de HPLC :

- Les HPLC en phase normale : La phase stationnaire est une phase polaire et la phase mobile est apolaire. Les phases stationnaires polaires sont souvent des colonnes de silice et les phases mobiles des solvants comme l'hexane ou le diéthyléther. Les composés polaires sont davantage retenus sur la colonne polaire que les composés moins polaires ou apolaires.

- Les HPLC en phase inverse : La phase stationnaire est une phase apolaire et la phase mobile est polaire. Les phases stationnaires apolaires utilisées sont souvent des colonnes de type C-18 ou pentafluorophenylpropyl (PFP) alors que les phases mobiles sont des solvants comme l'acétonitrile ou le méthanol. La phase stationnaire étant apolaire, les composés apolaires ont des interactions hydrophobes plus importantes et sont ainsi retenus plus longtemps que les composés plus polaires.

Une HPLC a 5 composants majeurs : un système de pompes pour les phases mobiles, une colonne, un échantillonneur automatique, un détecteur et un système de traitement des données :

- Le système de pompes permet de faire circuler les phases mobiles à l'intérieur de la HPLC et permet de réguler la vitesse du flux (mL/min) des phases mobiles. La pompe permet également de faire circuler à travers le système une phase mobile de composition constante, appelé isocratique, ou encore un gradient de phase mobile variable.
- La colonne ou phase stationnaire permet de séparer les composants d'un mélange en fonction de la polarité de la colonne et des composés et des interactions colonne-composés qui se forment suivant l'injection de l'échantillon. Il est également possible de chauffer la colonne chromatographique afin de diminuer les temps de rétention ou d'améliorer le profil des pics chromatographiques de certains composés.
- L'échantillonneur automatique permet l'injection automatique des échantillons à travers le système.
- Différents types de détecteurs existent tels que des détecteurs ultraviolet (UV), fluorescence ou avec un spectromètre de masse (MS).
- L'analyse des données se fait à partir d'un logiciel sur un ordinateur qui donne des informations sur les temps de rétention des différents composés et également, permettra l'extrapolation des quantités mesurées de chacun des composés.

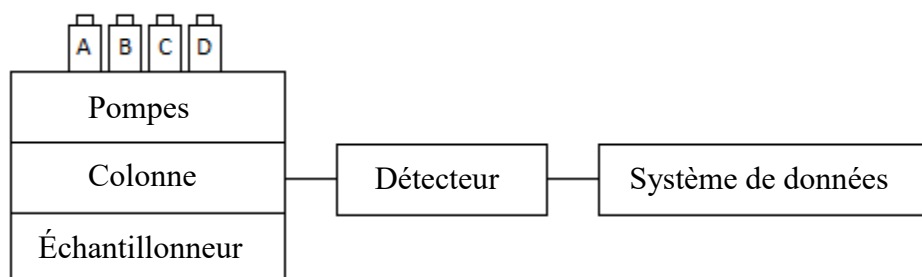


Figure 6 : Les composantes du système HPLC.

1.3.2. La spectrométrie de masse

1.3.2.1. Généralités

Après injection des échantillons par HPLC, les composants du mélange doivent être détectés pour être analysés. Le couplage GC (Chromatographie en phase gazeuse) avec MS a été inventé dans les années 1950 tandis que le couplage LC-MS a rencontré des limitations dû à une incompatibilité entre les sources d'ionisation du MS déjà existante et le flot en phase liquide. Il a fallu attendre les années 1980 pour qu'un couplage LC-MS puisse être utilisé grâce au développement de nouveaux modes d'ionisation par Fenn *et al.* [135].

Le spectromètre de masse est un appareil qui va permettre la détection et l'analyse des composés d'un mélange [136]. De façon générale, le spectromètre de masse va convertir les molécules d'analytes en molécules chargées positivement ou négativement. L'analyse des ions formés ainsi que des fragments des ions produits lors du processus d'ionisation vont permettre de séparer tous les ions présents en fonction de leur rapport masse sur charge. Un spectromètre de masse est composé de trois éléments majeurs : une source d'ionisation, qui va générer des molécules chargées, d'un analyseur qui détermine le rapport masse sur charge des ions qui ont été formés et d'un détecteur qui transforme les ions en un signal électrique.

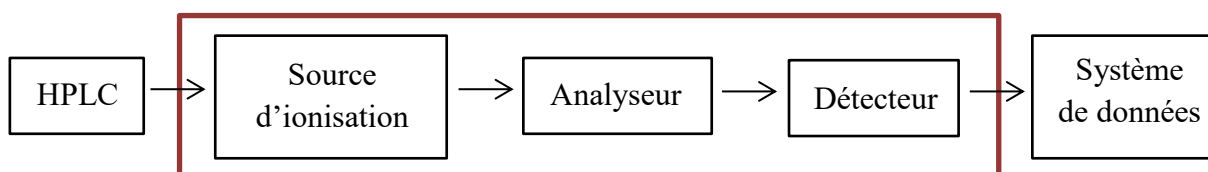


Figure 7 : Principe général de la LC-MS.

1.3.2.2. Source et mode d'ionisation

Trois modes majeurs d'ionisation ont été développés : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI), Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) et Heated Electrospray Ionisation Source (HESI). Les trois modes seront détaillés succinctement :

- MALDI : Ce mode d'ionisation permet la vaporisation et l'ionisation non destructive de petites et grosses biomolécules [137]. L'analyte est tout d'abord co-cristallisé avec une matrice qui va permettre de protéger les molécules de leur destruction par le laser. Un laser, souvent d'azote, pointant vers l'analyte-matrice permet l'évaporation de la matrice qui est liée à l'analyte. La matrice permet ainsi la vaporisation de l'analyte mais sert également d'accepteur et de receveur de protons pour ioniser les molécules en ions positivement ou négativement chargés. Le MALDI, contrairement à l'HESI, produira seulement des molécules mono chargées.
- APCI : La source utilisée et le principe de ce mode d'ionisation sont les mêmes que pour le mode HESI. Cette technique est cependant plus adéquate pour des petits composés et des molécules qui s'ionisent difficilement en HESI. Contrairement à l'HESI, ce sont majoritairement des ions chargés simplement qui sont obtenus après ionisation des molécules.
- HESI : La source d'ionisation de la LC-MS/MS utilisée pour ce projet de recherche est une source API (Atmospheric Pressure Ionisation) qui peut opérer en mode APCI ou en HESI. Le mode d'ionisation HESI est le mode d'ionisation utilisé pour ce projet de recherche. Il a été appliqué à de nombreuses classes de molécules biologiques, et est particulièrement utilisé pour l'analyse de médicaments et de métabolites [136]. L'échantillon, après son passage dans la LC, est pulvérisé à travers le capillaire (Ion transfer tube) qui se trouve à pression atmosphérique. Ensuite, le gaz de nébulisation crée des gouttelettes chargées positivement ou négativement, à la pointe du capillaire. Un gaz de dé-solvatation chauffé est appliqué aux gouttelettes chargées afin d'évaporer le solvant. Il y a ensuite fission des gouttelettes qui conduit à la formation d'ions individuels en phase gazeuse des analytes présents dans l'échantillon. Ils sont ensuite dirigés vers l'analyseur de masse.

1.3.2.3. Analyseurs et détecteurs de masse

Plusieurs analyseurs de masse sont utilisés couramment tels que les analyseurs à temps d'envol (TOP ou Time Of Flight), piège ionique (Trap), résonance cyclotronique (Orbitrap) ou encore quadripôle ou triple quadripôle (QqQ). Tout d'abord, l'analyseur de masse est le composant du spectromètre de masse qui va analyser les rapports masse sur charge des ions qui ont été formés. De manière générale, la LC-MS comprend un spectromètre de masse et seul l'ion précurseur sera analysé tandis que la LC-MS/MS est constitué d'un spectromètre de masse en tandem qui permet l'analyse de l'ion précurseur et des ions fragments. La majeure différence entre une LC-MS et une LC-MS/MS se retrouve ainsi au niveau de l'analyseur des ions.

Deux spectromètres de masse sont utilisés dans ce projet de recherche, le spectromètre de masse TSQ Quantiva constitué d'un analyseur de type triple quadripôle et le spectromètre de masse Q Exactive constitué d'un analyseur hybride quadripôle-Orbitrap.

a) TSQ Quantiva et analyseur de type triple quadripôle

Un analyseur de masse de type triple quadripôle est constitué de trois quadripôles Q1, Q2 et Q3 [138]. Un quadripôle type est constitué de quatre barres parallèles disposées deux à deux, une en face de l'autre, qui sont soumises à un voltage comprenant un courant électrique et une radio fréquence (RF). Les quadripôles Q1 et Q3 sont des quadripôles types et agissent comme analyseur de masse tandis que le quadripôle Q2 est une cellule de collision qui est seulement soumise à une radio fréquence.

Après passage dans la source d'ionisation, l'ion précurseur va être sélectionné en fonction de son rapport masse sur charge dans le quadripôle Q1 soit le premier analyseur de masse [138]. Cet ion précurseur est ensuite accéléré vers le quadripôle Q2 qui correspond à la cellule de collision. L'ion précurseur entre en collision avec un gaz inerte (Argon) ce qui entraîne une fragmentation de l'ion précurseur. Ces fragments sont ensuite accélérés vers le quadripôle Q3. Les fragments qui arrivent au quadripôle Q3 vont être à nouveau analysés pour déterminer leur rapport masse sur charge et seront dirigés vers le détecteur pour former le spectre de masse.

Un analyseur simple quadripôle ne permet l'analyse que de l'ion précurseur en fonction de son rapport masse sur charge tandis que l'analyseur triple quadripôle est beaucoup plus spécifique car il permet en plus l'analyse de la transition ion précurseur → ion fragment qui est appelée transition SRM (Selected Transition Monitoring). On appelle également transition MRM (Multiple Reaction Monitoring) quand plusieurs transitions sont analysées pour un même composé ou encore lorsque plusieurs composés sont analysés chacun selon leur propre transition SRM.

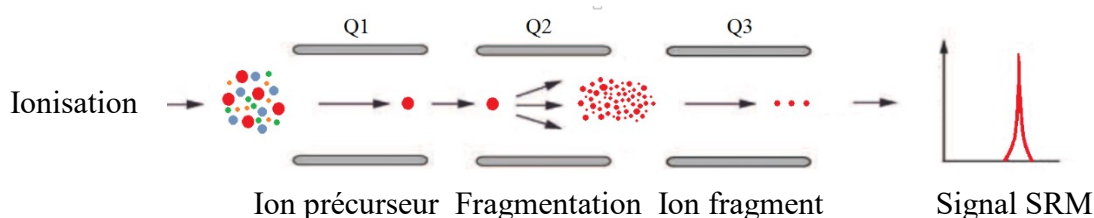


Figure 8 : Fragmentation des ions précurseurs avec un analyseur de type triple quadripôle (Figure adaptée de Huttenhain *et al.*, 2009 [138]).

b) Q Exactive et analyseur de type quadripôle-Orbitrap

Le deuxième spectromètre de masse utilisé dans ce projet de recherche est constitué d'un analyseur de type quadripôle-Orbitrap. Le principe général de l'analyseur quadripôle-Orbitrap du LC-MS est illustré dans la figure 9.A et celui du LC-MS/MS dans la figure 9.B. L'ion précurseur d'intérêt est tout d'abord isolé dans le quadripôle qui agit comme filtre de masse (A.1 et B.1) [139]. Il est ensuite soit transmis et accumulé dans le C-trap (A.2) puis transféré et analysé dans l'Orbitrap (A.3) ou il est transmis via le C-trap dans la cellule de collision où les ions fragments seront générés et accumulés (B.2), puis re-transférés à nouveau dans le C-trap (B.3) et analysés dans l'Orbitrap (B.4). Une fois dans l'Orbitrap, les ions formés oscillent axialement autour de l'électrode centrale et à une fréquence proportionnelle à $\left(\frac{z}{m}\right)^{1/2}$. Le courant image est mesuré entre les deux moitiés de l'électrode externe et le signal est ensuite converti pour pouvoir identifier et quantifier les ions formés en utilisant les spectres MS ou MS/MS.

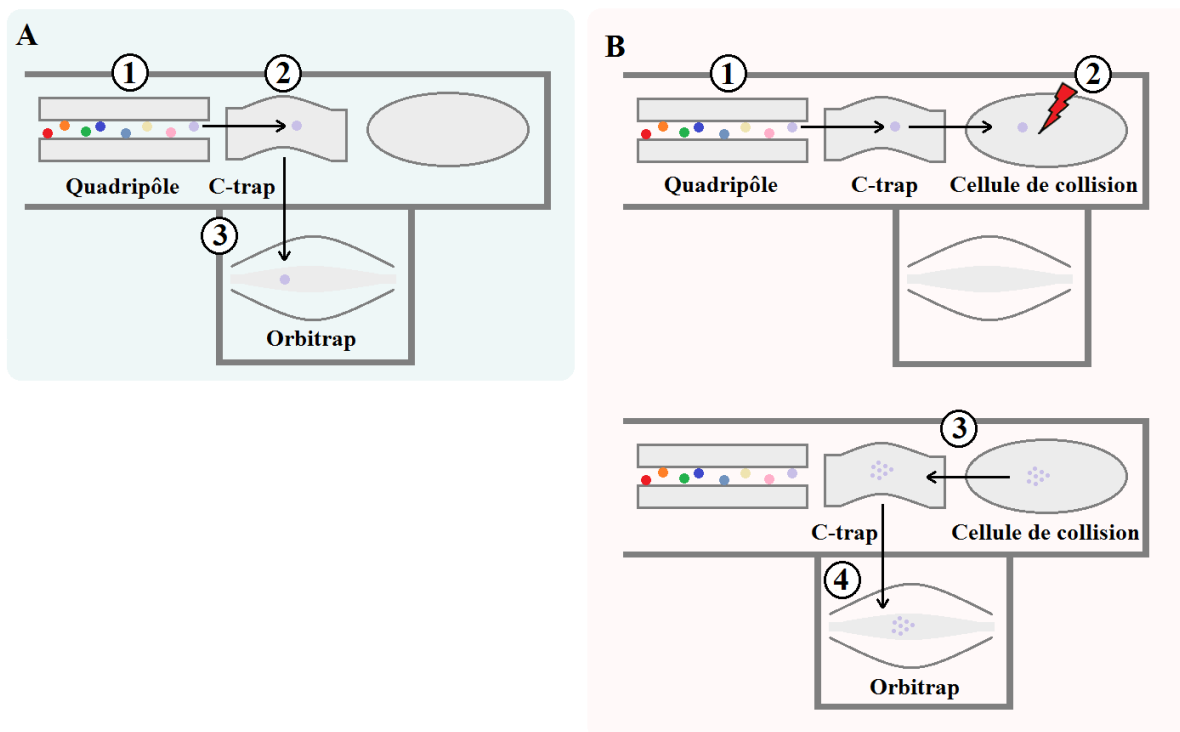


Figure 9 : Schéma du MS (A) et MS/MS (B) de type quadrupôle-Orbitrap (Figure adaptée de Gallien *et al.*, 2012 [139]).

Depuis de nombreuses années, la LC-MS/MS est grandement utilisée pour la quantification de petites molécules, médicaments et métabolites dû à la très bonne spécificité et sélectivité acquise par l'analyse d'une transition de masse spécifique à la molécule d'intérêt. Cependant, dans le cas de l'analyse de protéines intactes ou de peptides provenant d'échantillons biologiques complexes, la résolution de la LC-MS/MS pour sélectionner les ions d'intérêts et les séparer des interférents biologiques n'est pas suffisante ce qui en limite le niveau de détection [140].

L'utilisation de la LC-HR/AM («High Resolution/Accurate Mass») ou LC-HR/MS («High Resolution/Mass Spectrometry») avec certains spectromètres de masse, comme le Q Exactive, permet de mesurer les ions formés selon leurs masses exactes. La sensibilité, la sélectivité et la précision de l'analyse est grandement améliorée ce qui en favorise la séparation avec les interférents biologiques de rapport masse/charge très proche des ions à analyser ainsi que la certitude de l'analyse de l'ion d'intérêt [141]. Des peptides et interférents ayant des masses différentes de l'ordre de quelques dizaines de parties par million peuvent être séparés avec un tel spectromètre de masse.

1.4. Quantification des protéines

Toutes les cellules du corps humain sont constituées d'environ 50% de protéines. Le terme « protéome », regroupant l'ensemble des protéines de l'organisme a été employé pour la première fois en 1995 par Wilkins *et al.* par analogie au terme « génome » décrivant l'ensemble des gènes ou « transcriptome » décrivant les transcrits [142]. Le terme « protéomique » a quant à lui été employé pour la première fois en 1997 par James [143]. L'analyse protéomique a pour but de décrire le protéome dans son ensemble soit toutes les protéines qui sont exprimées par une cellule ou un organite.

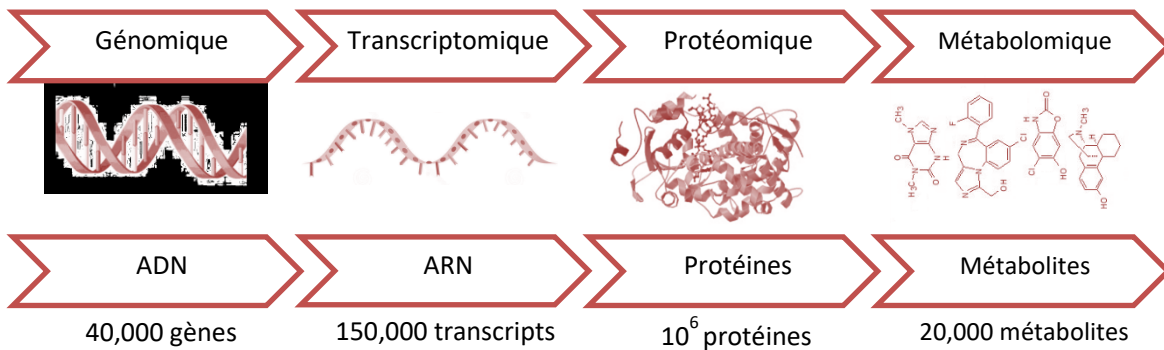


Figure 10 : Schéma représentant les différentes sciences « omiques » (Figure adaptée de Gerszten et Wang, 2008 [144]).

De nombreuses méthodes pour quantifier les protéines dans un échantillon, et particulièrement les CYP450s, ont été développées au cours des 50 dernières années comme des méthodes directes comme les méthodes d'Omura et Sato, la colorimétrie, les gels d'électrophorèse bidimensionnel, le test ELISA, le *Western blot* et des méthodes indirectes comme la RT-qPCR et les mesures d'activités enzymatiques. Cependant ces méthodes comportent de nombreux désavantages en termes de spécificité, de reproductibilité et de précision dans les mesures de quantité de protéines ou de substrats marqueurs. L'avancement des connaissances dans le domaine de la protéomique a permis d'appliquer la spectrométrie de masse à la quantification absolue de protéines dans différentes cellules et organes du corps humain.

1.4.1. Techniques de dosage des protéines

1.4.1.1. Méthode d'Omura et Sato

La méthode développée par Omura et Sato en 1964 porte sur le spectre différentiel de l'hème et du monoxyde de carbone [145]. Les CYP450s sous forme ferreuse, après réduction par du dithionite de sodium, réagissent avec le monoxyde de carbone (CO) pour former un complexe CYP450-CO qui présente une absorbance maximale à 450 nm. Ils ont ensuite mesuré la différence d'absorbance avant et après ajout de monoxyde de carbone entre des longueurs d'onde de 400 à 550 nm. Seule la forme réduite des CYP450s avec ajout de CO présentait un pic d'absorption à 450 nm. Cette méthode ne permet pas de différencier les isoenzymes et seule la quantité totale de CYP450s peut être mesurée.

1.4.1.2. ELISA

La méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est basée sur la reconnaissance antigène-anticorps [146]. De façon générale, cette méthode permet de détecter une réaction antigène-anticorps où l'anticorps sera lié à une enzyme qui, en présence d'un substrat, formera une coloration. Plus l'intensité de la couleur est importante plus la réaction antigène-anticorps est produite. Il est possible de quantifier l'antigène cible en réalisant des gammes de concentrations de cet antigène. Plusieurs types d'ELISA existent : indirect (quantification de l'antigène), direct (quantification de l'anticorps), sandwich (quantification de l'antigène se situant entre deux anticorps spécifiques) et de compétition (ajout d'une concentration connue d'antigène avec l'échantillon contenant une concentration inconnue d'antigène, et on mesure la quantité d'antigène de l'échantillon en mettant une concentration connue d'anticorps marqué). Le test ELISA a été amélioré et validé pour une application aux dosages des CYP450s humains par Snawder *et al.* en 2000 [147]. Le majeur désavantage des tests ELISA est l'utilisation d'anticorps qui ne sont pas toujours spécifiques ou disponibles pour chaque isoforme des CYP450s.

1.4.1.3. Gel d'électrophorèse bidimensionnelle

La méthode de gel d'électrophorèse bidimensionnelle ou 2D a été développée par O'Farrell *et al.* [148]. Dans cette méthode les protéines sont séparées en deux dimensions ; dans la première dimension elles sont séparées en fonction du point isoélectrique et dans la deuxième dimension, elles sont séparées en fonction du poids moléculaire par électrophorèse sur dodécyl sulfate de sodium (SDS). Les protéines sont ensuite détectées (par exemple par bleu de Coomassie). Cette technique est cependant longue, peu reproductible, et peu sensible en présence de faibles concentrations de protéines.

1.4.1.4. Western blot

Le *Western blot*, développé par Burnette *et al.*, est une méthode comprenant des aspects immunologiques et d'électrophorèses qui a été appliquée pour la première fois aux CYP450s par Guengerich *et al.* en 1982 [149, 150]. Cette méthode permet la migration et la séparation des protéines sur gel polyacrylamide (SDS-page) puis le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite incubée dans un tampon de saturation puis dans une solution d'anticorps primaire. Le complexe protéine-anticorps primaire est détecté grâce à un anticorps secondaire qui est couplé à une sonde fluorescente. Il est également possible d'utiliser le substrat de l'ECL (Enhanced Chemiluminescence) et de révéler la membrane en chambre noire. Comme pour la méthode de l'ELISA le majeur désavantage de cette méthode réside dans la difficulté de trouver des anticorps spécifiques ou disponibles pour chaque isoenzyme des CYP450s.

1.4.1.5. Colorimétrie

Différentes méthodes de colorimétrie ont été développées (Méthode de Lowry, méthode de Bradford) mais la méthode la plus utilisée pour le dosage de protéines est la méthode BCA (BiCinchoninic Acid) développée par Smith *et al.* en 1985 [151]. Le principe est la formation d'un complexe, entre le réactif et les protéines, qui colorie le mélange. Plus précisément, le réactif est constitué de BCA et d'ion Cu^{2+} et les protéines réduisent les ions Cu^{2+} en ions Cu^+ formant avec le BCA un complexe coloré qui est mesuré à une longueur d'onde de 562 nm. Une

courbe de calibration est réalisée avec du sérum contenant de l'albumine bovine (BSA) pour quantifier la concentration en protéines totales dans l'échantillon.

1.4.1.6. Méthodes indirectes

a) RT-qPCR

La RT-qPCR est une réaction de transcription inverse (RT) suivie d'une PCR quantitative (Polymerase Chain Transferase) en temps réel. Cette méthode, contrairement à celles décrites plus haut, ne quantifie pas la protéine mais elle permet de doser l'ARNm de chaque isoforme des CYP450s. Le principal désavantage de cette méthode est relié au fait que dû à de nombreux facteurs comme les modifications post-transcriptionnelles, traductionnelles ou post-traductionnelles, la corrélation entre les niveaux d'expression d'ARNm et la quantité de protéines est souvent faible.

b) Activité enzymatique

L'activité enzymatique des protéines des CYP450s est déterminée *in vitro* en utilisant un substrat marqueur spécifique à une isoenzyme des CYP450s, en incubant ce substrat marqueur dans des microsomes et en mesurant la quantité de substrats marqueurs restante (soit non-métabolisée) et de métabolites spécifiques formés. Cette méthode consiste ainsi à mesurer la variation des concentrations de substrats marqueurs et de métabolites dans le temps. Deux paramètres sont évalués, le V_{max} (Vitesse maximale de transformation du substrat) et K_m (concentration à laquelle 50% de la vitesse maximale de transformation est observée). Comme pour la méthode de RT-qPCR, cette méthode ne permet pas de mesurer directement la quantité de protéines. Cette méthode requiert que la voie de métabolisme du substrat sélectionné soit spécifique pour un isoforme donnée mais cette approche sera sensible aux modifications post-transcriptionnelles et traductionnelles.

1.4.2. Dosage de protéines par spectrométrie de masse

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour le dosage de protéines est un domaine qui n'a cessé et qui continue d'évoluer. Le dosage par LC-MS/MS ne peut pas être effectué sur la protéine entière et requiert la sélection de peptides « protéotypiques » qui sont spécifiques à une protéine et qui sont obtenus après digestion enzymatique de l'échantillon. Un peptide spécifique à chaque isoenzyme est sélectionné à partir de digestions enzymatique *in silico* et *in vitro*.

1.4.2.1. Digestion trypsique

Plusieurs enzymes peuvent être utilisées pour digérer les protéines telles que la pepsine, la chymotrypsine, la thermolysine ou la trypsine. La trypsine est l'enzyme de digestion la plus couramment utilisée pour digérer les protéines, due à sa haute spécificité. La trypsine est une protéine issue du pancréas de porc qui hydrolyse spécifiquement la partie C-terminale d'une protéine après l'acide aminé arginine (R) ou lysine (K). Le seul cas particulier où la trypsine ne coupera pas la protéine après une arginine ou une lysine est le cas où ces acides aminés sont précédés de l'acide aminé proline (P). Une protéine peut ainsi, après action d'une enzyme de digestion, générer plusieurs centaines de peptides. La trypsine a une activité maximale à 37 °C et à pH 8, et elle est complètement inactive à des valeurs de pH < 3.

1.4.2.2. Sélection des peptides protéotypiques

De nombreux programmes informatiques sont extrêmement utiles pour la sélection des peptides protéotypiques comme le CLC Sequence Viewer lequel permet d'aligner les séquences d'acides aminés des différentes protéines d'intérêts et de les comparer, mMass lequel permet de générer tous les peptides d'une protéine par l'action de l'enzyme de digestion choisie et BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui permet de vérifier si le peptide choisi est retrouvé spécifiquement dans la protéine d'intérêt.

La sélection des peptides protéotypiques se fait selon plusieurs critères. Le critère le plus important est de vérifier la spécificité du peptide pour la protéine que l'on souhaite quantifier afin de s'assurer que l'on mesure spécifiquement celle-ci. De nombreux peptides sont obtenus après digestion trypsique, et plusieurs d'entre eux peuvent se retrouver dans différentes isoenzymes des CYP450s mais également dans d'autres protéines exprimées dans le corps humain. Le génome humain a été séquencé ce qui facilite la vérification de la spécificité du peptide.

D'autres critères généraux sont également à prendre en compte, comme la taille du peptide protéotypique. Un peptide avec moins de 6 acides aminés sera peu spécifique et un peptide avec un nombre d'acides aminés supérieur à 20 limitera sa détection par le MS et pourra entraîner des problèmes d'ionisation et de sensibilité. Plusieurs polymorphismes des CYP450s ont été

décrits dans la littérature et les peptides contenant des polymorphismes présents à plus de 1% dans la population devront être évités. Également, certains acides aminés comme la cystéine (C), la méthionine (M) et le tryptophane (W) sont des acides aminés qui sont facilement modifiés chimiquement, par alkylation ou oxydation, et il est préférable d'éviter la sélection des peptides contenant ces acides aminés. Des peptides contenant des clivages manqués par la trypsine ou des peptides avec une succession d'acides aminés arginine ou lysine ne sont pas recommandés car une trop grande variabilité dans l'efficacité de la digestion trypsique pourrait être observée. Les peptides contenant une sérine, thréonine ou tyrosine sont également à éviter car ces acides aminés sont propices aux modifications post-traductionnelles (MPT), ce qui modifierait la masse du peptide observable en MS.

1.4.2.3. Méthodes de quantification

Deux approches protéomiques sont les plus courantes pour quantifier les protéines : la méthode de quantification de concatamère (QConCat, Quantification of ConCatenated peptides) et la méthode de quantification absolue (AQUA, Absolute QUAntification) [152].

- La méthode QConCat utilise une protéine recombinante constituée de plusieurs peptides protéotypiques concaténés qui sont exprimés dans des bactéries modifiées d'*Escherichia coli*. Cette protéine est ajoutée avant l'étape de digestion trypsique pour produire des peptides marqués. Cependant cette méthode n'est pas une méthode classique de quantification car on ne quantifie pas les protéines/peptides avec une courbe de calibration de ces mêmes protéines/peptides synthétisés.

- La méthode AQUA, utilisée dans ce projet de recherche, se base sur la quantification du peptide protéotypique à l'aide d'une courbe de calibration du peptide synthétisé et de son standard interne stable marqué isotopiquement qui est ajouté dans tous les échantillons. Le peptide protéotypique et le peptide marqué ont la même séquence d'acides aminés. Cependant, les peptides utilisés comme standard interne sont marqués par les isotopes stables ^{13}C et ^{15}N sur les acides aminés arginine et lysine. Cela confère aux peptides stables isotopiquement marqués une différence de masse de +10 pour l'arginine et de +8 pour la lysine, comparativement aux peptides protéotypiques.

1.4.2.4. Principe du dosage absolu de protéines par spectrométrie de masse

Les protéines natives ne peuvent être analysées par spectrométrie de masse et doivent être digérées par une enzyme de digestion, la trypsine, pour générer les peptides protéotypiques à chaque protéine.

La méthode de digestion contient plusieurs étapes détaillées ci-dessous et résumées dans la Figure 11 :

- La dilution des protéines natives dans un tampon
- La dénaturation des protéines par un agent réducteur et un agent alkylant permettant de désorganiser la structure spatiale des protéines et d'obtenir une chaîne polypeptidique dépliée :
 - o Le dithiothréitol (DTT) est utilisé comme agent réducteur pour réduire les ponts disulfures des protéines
 - o L'iodoacétamide (IAA) est utilisé comme agent alkylant. Il se lie avec le groupement thiol des cystéines pour bloquer les fonctions thiols qui ont été libérées et pour empêcher ainsi la formation de nouveaux ponts disulfures.
- La digestion des protéines par la trypsine se fait à 37 °C à pH 8 pendant une période pouvant aller de 4 à 24 h.
- L'ajout d'un agent chimique acide, comme une solution à 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau, pour diminuer le pH de la solution et pour inactiver la trypsine. On considère que la trypsine n'est plus active à un pH inférieur à 3.
- L'ajout d'une solution contenant tous les standards internes stables isotopiquement marqués des protéines d'intérêts.

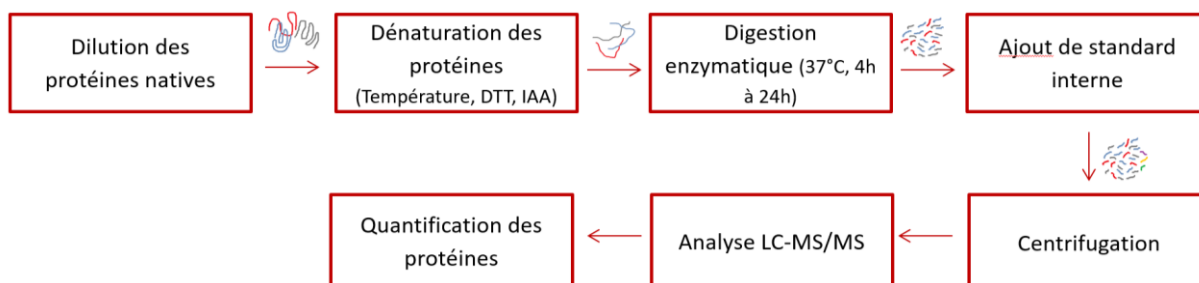


Figure 11 : Principe de la quantification de protéines par spectrométrie de masse.

1.4.2.5. Fragmentation des peptides en MS/MS

Une fois la protéine digérée, on obtient une multitude de peptides qui sont constitués d'une succession de plusieurs acides aminés. Dans le cas de notre projet de recherche, nous avons sélectionnés un peptide protéotypique à chaque isoenzyme des CYP450s d'intérêts. L'identification de ces peptides est réalisée à l'aide de standards internes stables isotopiquement marqués et de la masse exacte des ions formés en phase gazeuse.

La fragmentation par MS/MS dans la cellule de collision est un processus qui se fait à faible énergie, ainsi les liaisons qui sont les plus labiles soient les liaisons entre les acides aminés ou liaisons peptidiques, sont brisées lors de ce processus. La fragmentation par MS/MS va permettre de reconstituer les séquences d'acides aminés des peptides soit pour s'assurer que l'on quantifie le peptide d'intérêt dans le cas de peptide connu, comme dans ce projet de recherche, soit pour déterminer la séquence d'acides aminés d'un peptide inconnu. Comme illustré sur la Figure 12, les ions a, b, c et x, y, z peuvent être formés [153, 154]. Les ions y et b, correspondant à la perte d'un acide aminé, sont majoritairement formés lors du processus de fragmentation à basse énergie. La séquence du peptide peut ainsi être reformée, en calculant les différences des rapports m/z les plus abondants obtenus sur le spectre MS/MS.

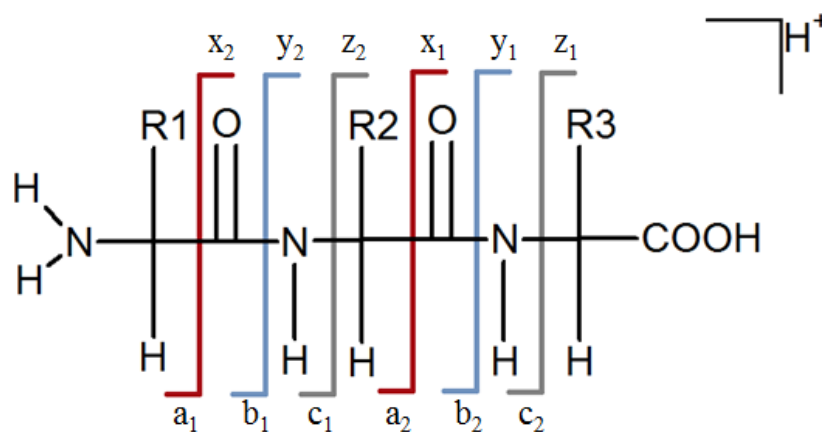


Figure 12 : Nomenclature des ions formés en MS/MS.

SECTION 2; TRAVAUX DE RECHERCHE

2.1. Développement d'une méthode LC-MS/MS hautement sélective pour la détermination de l'activité de 7 CYP450s humains en utilisant de faibles doses orales de substrats marqueurs

2.1.1. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude est de développer et valider une méthode analytique par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem pour déterminer le phénotype de 7 CYP450s, en utilisant un cocktail de 7 substrats marqueurs. Cette méthode permettra l'analyse précise et spécifique des substrats marqueurs et de leurs métabolites dans le plasma et dans l'urine.

2.1.2. Introduction

De nombreux cocktails de substrats marqueurs des CYP450s ont déjà été développés dans la littérature pour décrire de potentielles interactions médicamenteuses ou pour étudier l'impact de certaines maladies sur l'activité des cytochromes. Cependant, ces cocktails et leurs méthodes analytiques respectives présentent de nombreux désavantages et conséquemment, le développement d'une méthode d'analyse sensible et spécifique était requis. En effet, plusieurs de ces méthodes publiées ont été développées par HPLC présentant ainsi de nombreuses limitations. Ces méthodes sont souvent peu sensibles due à des limitations dans la détection des composés, ce qui se reflète dans des valeurs de LLOQ élevées et dans l'utilisation en clinique de doses de substrats marqueurs élevées pour s'assurer une détection précise des analytes. Cependant en clinique, l'utilisation de faibles doses est préférable et souvent nécessaire pour minimiser les risques d'effets secondaires chez les patients. Les méthodes HPLC sont également peu spécifiques car les composés sont séparés et analysés seulement en fonction de leurs temps de rétention et donc de leurs affinités avec la phase stationnaire. La séparation de composés ou d'interférents, éluant au même temps de rétention, peut alors devenir très complexe. Depuis les

années 1980, de nouveaux cocktails ont été développés par LC-MS ou LC-MS/MS ce qui permet d'obtenir une meilleure sensibilité et spécificité des analyses, car les analytes sont analysés également en fonction de leurs masses et de leurs transitions de masse spécifiques. Cependant, la majorité de ces cocktails ont de nombreuses limitations comme l'utilisation de substrats marqueurs qui ne sont plus disponibles sur le marché, des techniques de préparation d'échantillons plasmatiques plus complexes (extraction liquide liquide ou extraction en phase solide) et une mauvaise sensibilité qui est représentée par des valeurs de LLOQ trop élevées. Également, plusieurs cocktails n'analysent pas des substrats marqueurs spécifiques à l'activité de CYP450s très important cliniquement.

Les méthodes analytiques présentées ci-dessous ont été développées pour 7 CYP450s. Ces cytochromes ont été choisis en fonction de leur importance en termes d'expression hépatique mais également en fonction de leur importance clinique. Les CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2E1 et CYP1A2 sont les isoenzymes les plus exprimées au niveau hépatique et représentent environ 75% du contenu en CYP450s totaux dans le foie. Ils sont également très importants cliniquement et sont impliqués dans la biotransformation de plus de 55% des médicaments utilisés en clinique. Les CYP2B6, CYP2C19 et CYP2D6 sont moins exprimés au niveau hépatique et représentent environ 15% des CYP450s hépatiques totaux. Ils sont néanmoins très importants cliniquement et métabolisent environ 34% des médicaments utilisés en clinique.

Plusieurs substrats marqueurs ont déjà été utilisés pour mesurer l'activité de ces CYP450s comme l'oméprazole ou la méphénytoïne pour le CYP2C19, dextrométhrophane ou la débrisoquine pour le CYP2D6 et la caféine ou la phénacétine pour le CYP1A2. Cependant, la méphénytoïne et la débrisoquine ont été retiré du marché dû à un profil d'effets secondaires important. Également, la phénacétine n'est plus vendue dans plusieurs pays car elle augmentait les risques d'avoir certains cancers et induisait des dommages rénaux. L'oméprazole, le dextrométhrophane et la caféine ont un profil d'innocuité plus favorable et ont donc été sélectionnés pour déterminer les phénotypes des CYP2C19, CYP2D6 et CYP1A2, respectivement. Pour le CYP2B6, l'éfavirenz et le bupropion sont souvent utilisés mais le bupropion présente un meilleur profil d'effets secondaires et a été choisi comme substrat marqueur du CYP2B6. Pour le CYP2E1, la réaction de biotransformation de la chlorzoxazone est très spécifique au CYP2E1. Le CYP1A1 catalyse également cette réaction, mais il n'est que

faiblement exprimé au niveau hépatique. La warfarine et le losartan sont utilisés dans certains cocktails pour déterminer l'activité du CYP2C9. Cependant, ces médicaments sont également métabolisés par d'autres isoenzymes présentes dans le foie comme le CYP1A2 (warfarine) ou CYP3A4 (warfarine, losartan). L'utilisation du tolbutamide comme marqueur phénotypique du CYP2C9 a été préférée. L'activité de la sous-famille des CYP3As est souvent étudiée à l'aide du midazolam ou de l'érythromycine. L'utilisation d'une très faible dose orale de midazolam a été privilégiée pour notre projet de recherche.

Le but du développement de méthodes sensibles et spécifiques pour mesurer l'activité des CYP450s majeurs est de pouvoir les appliquer en clinique, aussi bien pour évaluer l'impact de pathologies sur la capacité des CYP450s à métaboliser les médicaments, que pour évaluer le potentiel d'interactions médicamenteuses ou encore évaluer l'impact de l'environnement et des polymorphismes sur l'activité des CYP450s. En effet, de nombreux patients ont aujourd'hui recours à une polymédication, une variabilité dans la capacité de métaboliser les médicaments due à la présence d'interactions médicamenteuses pourra affecter la réponse aux médicaments résultant en des toxicités ou encore des inefficacités thérapeutiques et ce, notamment pour des médicaments à faible index thérapeutique. Également, les conditions physiopathologiques, les polymorphismes génétiques et les facteurs environnementaux peuvent moduler l'expression et l'activité des CYP450s et ainsi, contribuer à la variabilité interindividuelle observée dans la réponse aux médicaments.

2.1.3. Article

Journal of Chromatography B, 1040 (2017) 144–158



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb



Highly sensitive LC–MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human



Alexia Grangeon^{a,b}, Sophie Gravel^{a,b}, Fleur Gaudette^b, Jacques Turgeon^{a,b},
Veronique Michaud^{a,b,*}

^a Faculty of Pharmacy, University of Montreal, 2940 Chemin de la Polytechnique, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

^b CRCHUM, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900 Saint Denis Street, Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada

Article publié dans journal of chromatography B : Grangeon, A., et al., *Highly sensitive LC-MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016. **1040**: p. 144-158 [155].

Participation des auteurs : Je suis première auteure de cet article. J'ai rédigé la majorité de cet article et j'ai réalisé toutes les expériences menant au développement et à la validation de la méthode chromatographique par LC-MS/MS (amélioration de la sensibilité de la méthode, études de stabilité des composés dans le plasma et l'urine, évaluation de la précision et de la justesse de la méthode,...). Sophie Gravel et Fleur Gaudette ont participé à la réalisation de certaines expériences dont principalement celles concernant l'application de la méthode en clinique. Véronique Michaud, Jacques Turgeon et Fleur Gaudette ont contribué à la rédaction et à la correction de l'article.

Title page information

Title: Highly sensitive LC-MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human.

Author names and affiliations:

Alexia Grangeon^{a,b}, Sophie Gravel^{a,b}, Fleur Gaudette^b, Jacques Turgeon^{a,b} and Veronique Michaud^{a,b}

^aFaculty of Pharmacy, University of Montreal, 2940 chemin de la Polytechnique, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada

^bCRCHUM, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 900 Saint Denis Street, Montreal, Quebec, H2X 0A9, Canada

E-mail addresses:

alexia.grangeon@umontreal.ca; sophie.gravel.3@umontreal.ca;
fleur.gaudette.chum@ssss.gouv.qc.ca; jacques.turgeon@umontreal.ca;
v.michaud@umontreal.ca

Corresponding Author:

Veronique Michaud, B.Pharm., Ph.D.
CRCHUM, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
900 St. Denis Street, room R08-480, Montreal, Quebec, H2X 0A9, Canada
+1 514-890-8000 ext.15812

Abstract

Cocktails composed of several Cytochrome P450 (CYP450)-selective probe drugs have been shown of value to characterize *in vivo* drug-metabolism activities. Our objective was to develop and validate highly sensitive and selective LC-MS/MS assays allowing the determination of seven major human CYP450 isoenzyme activities following administration of low oral doses of a modified CYP450 probe-drug cocktail in patients. The seven-drug cocktail was composed of caffeine, bupropion, tolbutamide, omeprazole, dextromethorphan, midazolam (all administered concomitantly) and chlorzoxazone (administered separately) to phenotype for CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4/5 and 2E1, respectively. Serial plasma and urine samples were collected over an 8 hour period. The probe-drugs and their respective metabolites were measured in both human plasma and urine, except for omeprazole (plasma only) and chlorzoxazone (urine only). Samples were analyzed by high performance liquid chromatography with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-HESI-MS/MS) using a Phenomenex Luna PFP (2) analytical column (3 μ m PFP(2) 150 x 3 mm) for chromatographic separation. Optimal detection was achieved based on 3 different analytical methods; 1) isocratic elution with a mobile phase consisting of acetonitrile and water both fortified with 0.01% formic acid for the analysis of bupropion, tolbutamide, chlorzoxazone and their respective metabolites; 2) isocratic elution with a mobile phase composed of acetonitrile and ammonium formate (pH 3; 10 mM) for omeprazole, dextromethorphan, midazolam and their metabolites; 3) for caffeine and paraxanthine, gradient elution using acetonitrile and 0.01% formic acid in water was used. All calibration functions were linear for all probe drugs and metabolites in both matrices over wide analytical ranges. The main advantages of our methods are the use of specific probe drugs available in most countries, the administration of small doses of probe drugs, small volume of plasma required for the analyses and simple and rapid extraction procedures. The methods met all requirements of specificity, sensitivity, linearity, precision and accuracy and stability generally accepted in bioanalytical chemistry. Determination of CYP450 phenotype in patients will permit characterization of their capacities to metabolize drugs through CYP450 under specific conditions at a definite time. This tool will be highly clinically relevant since wide intersubject variability observed in drug response is largely explained by variation in drug metabolism; it will be particularly useful in polymedicated patients with multiple comorbidities.

So far, our CYP450 cocktail assays have been successfully applied to phenotype CYP450 activities in patients.

Keywords

LC-MS/MS; CYP450 probe-drug cocktail; drug metabolism; drug-drug interactions; phenotyping.

Highlights

Development and validation of highly sensitive and specific LC-MS/MS assays.

Low oral doses of selective probe drugs used to phenotype major CYP450 activities.

Determination of inter-individual variabilities in major CYP450 activities.

Evaluation of drug metabolism CYP450 activities in vulnerable patients.

1) Introduction

The Cytochrome P450 (CYP450) enzymatic system constitutes the most important pathway for drug metabolism and elimination in humans. Nowadays, 57 different isoenzymes have been characterized in the human body and classified in different families and subfamilies [1, 2]. The most important families involved in drug metabolism are the CYP1, CYP2 and CYP3. The CYP3A and particularly the CYP3A4/5 are major isoenzymes implicated in the metabolism of about 50% of drugs (*e.g.* calcium channel blockers, statins, anesthetic, immunosuppressive, benzodiazepine) [3, 4]. The CYP2D, CYP2C, and CYP1A subfamilies are also implicated in the metabolism of many drugs, and particularly their major isoenzymes namely, CYP2D6 (*e.g.* dextromethorphan, β -blockers, antiarrhythmic agents) [3, 5], CYP2C9 (*e.g.* nonsteroidal anti-inflammatory drugs, S-warfarin, losartan) [3, 6] and CYP2C19 (*e.g.* tricyclic antidepressants, proton-pump inhibitors, R-warfarin, clopidogrel) [3, 5], and CYP1A2 (*e.g.* caffeine, theophylline, mexiletine) [7]. To a lesser extent, the CYP2E1 isoenzyme takes part in the metabolism of some drugs such as chlorzoxazone, acetaminophen or inhalation anesthetics [3, 8]. Finally, the interest in CYP2B6 metabolism has increased recently as its role in the metabolism of substrates (*e.g.* bupropion, cyclophosphamide, ifosfamide, methadone) has been demonstrated [9, 10].

Wide inter-individual differences in expression or activity of CYP450 contribute to variations in both clearance and efficacy/toxicity of several drugs. Phenotyping measures provide information on the real-time activities of CYP450 and provide clinically relevant information as they reflect the combination of factors such as genetic, drug-drug interactions, environmental and endogenous factors including diseases [11, 16]. Thus, a phenotyping measure using selective CYP450 probes is a valuable tool to determine *in vivo* CYP450 activities.

In vivo methods to characterize subject's phenotype may involve either the administration of single probe drugs, one at a time, on numerous occasions or a mixed phenotyping approach based on a cocktail method where multiple CYP450-probe drugs are administered simultaneously. The major advantage of the cocktail approach is to provide information on several CYP450 activities in a single experiment. However, drugs used in these

cocktails must be specific for individual CYP450 isoenzymes and should not interact with each other. Also, in order to use such cocktails in a clinical setting, *i.e.* in patients with several comorbidities, probe drugs should be given at low oral doses to minimize drug exposure and ensure patient's safety.

Numerous cocktails composed of several CYP450-selective probe drugs have already been described in the literature to study *in vivo* drug-metabolism activities [17-31]. Although previous published cocktails such as Inje, Karolinska, Cooperstown 5+1 or Pittsburg cocktail have shown value they also suffer from many limitations [24, 26-29, 31]. For instance, they often comprise probe drugs which are not or no longer available in several countries. Furthermore, they have been validated using high performance liquid chromatography methods with limited detection sensitivity. This led to the utilization of high doses of probe substrates.

In recent years, the use of liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become a preferred approach to measure drugs and metabolites in biological fluids due to its very high selectivity and sensitivity [17-23, 25, 30]. The great sensitivity of LC-MS/MS permits the use of small blood volumes in patients while its specificity allows measurement of metabolites that often co-elute.

We describe herein the development and validation of three sensitive and specific LC-MS/MS assays allowing the determination of major human CYP450 isoenzyme activities following administration of a drug cocktail in healthy volunteers and patients. This seven-drug cocktail is composed of caffeine (CAF), bupropion (BUP), tolbutamide (TOL), omeprazole (OME), dextromethorphan (DM), midazolam (MDZ) and chlorzoxazone (CZX) (which is administered separately) to phenotype for CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4/5 and 2E1, respectively (Figure 1). Our objective was to develop highly sensitive, robust and fast assays to determine CYP450 phenotypes in a real clinical setting using small blood volumes and low oral doses of mixed probe drugs in order to minimize risk of side effects.

2) Materials and Methods

2.1) Chemicals and reagents

Caffeine (CAF), chlorzoxazone (CZX), dextromethorphan (DM) hydrobromide monohydrate, dexrorphan (DX) tartrate and tolbutamide (TOL) were obtained from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Midazolam (MDZ), α -hydroxymidazolam (α -OH-MDZ), $^2\text{H}_4$ -MDZ maleate and $^2\text{H}_4$ - α -OH-MDZ were bought from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Bupropion (BUP) hydrochloride, hydroxybupropion (OH-BUP), paraxanthine (PXT), 6-hydroxychlorzoxazone (OH-CZX), 4-hydroxymidazolam (4-OH-MDZ), omeprazole (OME), 5-hydroxyomeprazole (OH-OME) sodium salt, 5-O-desmethyl omeprazole (DES-OME), omeprazole sulfone (OME-SULF), hydroxytolbutamide (OH-TOL), 4-carboxytolbutamide (COOH-TOL), $^2\text{H}_9$ -BUP hydrochloride, $^2\text{H}_6$ -OH-BUP, $^2\text{H}_9$ -CAF, $^2\text{H}_3$ -PXT, $^2\text{H}_3$ -CZX-4,6,7, $^2\text{H}_3$ -DM, $^2\text{H}_3$ -DX tartrate salt, $^2\text{H}_3$ -OME, $^2\text{H}_3$ -5-OH-OME sodium salt, $^2\text{H}_3$ -5-O-DES-OME, $^2\text{H}_3$ -OME-SULF, $^2\text{H}_9$ -TOL, $^2\text{H}_9$ -OH-TOL, $^2\text{H}_9$ -4-COOH-TOL, and $^2\text{H}_5$ -4-OH-MDZ methanoate were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, CA). ^{15}N - $^2\text{H}_2$ -6-OH-CZX was bought from TLC Pharmaceutical Standards (Vaughant, ON, Canada). LC-MS grade water was purchased from EMD Millipore (Billerica, MA, USA) and LC-MS grade acetonitrile, methanol and ammonium formate Optima® LC/MS were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Formic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO) and β -glucuronidase/sulfatase from *Helix pomatia* type HP-2 were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Sodium hydroxide was obtained from RICCA chemical (Arlington, TX, USA). Blank male human plasma with potassium EDTA as anticoagulant was obtained from BioreclamationIVT (Westbury, NY, USA). Human plasma and urine were stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ and $-20\text{ }^\circ\text{C}$, respectively.

2.2) Stock solutions

Stock solutions for calibration standards in plasma were prepared by accurately weighing and dissolving the compounds at 5 mg/mL for CAF and 1 mg/mL for PXT, DM and DX in water; at 2.5 mg/mL for TOL in 0.1 N sodium hydroxide and at 1 mg/ml for DES-OME in DMSO. BUP, OH-BUP, OH-TOL, COOH-TOL, OME, OH-OME, OME-SULF and 4-OH-MDZ were prepared in methanol at 1 mg/ml and certified solutions at 1 mg/ml were used for

MDZ and α -OH-MDZ. Similar stock solutions were used for calibration standards in urine except for BUP and OH-BUP which were both prepared at 2 mg/mL and for DX which was prepared at 10 mg/mL. All internal standard stock solutions were prepared at 1 mg/mL in methanol except for $^2\text{H}_9$ -CAF, $^2\text{H}_3$ -PXT and $^2\text{H}_3$ -DES-OME which were prepared in DMSO. An internal standard mix solution, containing all isotopically labeled internal standards, was prepared in methanol by diluting each stock solution to obtain relevant concentrations of each compound. All stock solutions were stored at 4 °C except for OME, its metabolites and their respective internal standards which were stored at -80 °C due to instability. All stock solutions were stable at least eight months at 4 °C or -80 °C (OME, OME metabolites and internal standards).

2.3) Chromatographic conditions

Chromatographic separation was achieved on a Phenomenex Luna 3 μm PFP (2) 150 x 3 mm column with a Phenomenex Security Guard Cartridge PFP 4 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). For the analysis of OME, MDZ and DM in plasma and urine, elution was made possible using an isocratic mobile phase consisting of acetonitrile and ammonium formate in water (pH 3; 10 mM) (40:60; v/v). The flow rate was fixed at 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ and column temperature was set at 40 °C. Five microliters (5 μL) of the extracted sample was injected and the total run time was set at 8 min.

For the analysis of TOL, BUP and CZX, elution was achieved by an isocratic mobile phases consisting of acetonitrile and water both fortified with 0.01% (v/v) formic acid (40:60, v/v). The flow rate was 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the column temperature was set at 50 °C. Injection volume was 2 μL (plasma) or 5 μL (urine) and the total run time was 11 min for TOL and BUP, and 5 min for CZX.

For the analysis of CAF, separation was achieved under a gradient program. The initial mobile phase conditions consisted of acetonitrile and 0.01% formic acid in water (20:80, v/v), and this ratio was maintained for a period of 0.5 min. From 0.5 to 3 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 80:20 and this ratio was maintained for 2 min. At 5.1 min, the mobile phase composition was reverted to 20:80 and the column was allowed to equilibrate for 2 min for a total run time of 7 min. The flow rate was 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, the column temperature was set at 50 °C and the injection volume was 5 μL .

2.4) Mass spectrometer's conditions

A Thermo Scientific TSQ Quantiva triple quadrupole mass spectrometer (San Jose, CA, USA) was interfaced with the Thermo Scientific Ultimate 3000 XRS UHPLC system (San Jose, CA, USA) using pneumatic assisted heated electrospray ion source (HESI). In order to optimize ionization conditions and MS/MS parameters, standard solutions of all compounds were infused into the mass spectrometer. The following parameters were obtained: nitrogen was used for sheath, auxiliary and sweep gases and was set at 50, 15 and 5 arbitrary units; the HESI electrode was set at -3000 V in negative mode and 3500 V in positive mode; vaporizer and capillary temperatures were set at 400 °C and 350 °C, respectively; argon was used as collision gas at a pressure of 2.5 mTorr. The protonated molecular precursor ion $[M+H]^+$ for CAF, PXT, BUP, OH-BUP, DM, DX, MDZ, α -OH-MDZ, 4-OH-MDZ, OME, OH-OME, DES-OME and OME-SULF were at m/z 195.1, 181.1, 240.1, 238.1, 272.2, 258.2, 326.1, 342.1, 342.1, 346.1, 362.1, 332.1 and 362.1, respectively. The deprotonated molecular precursor ion $[M-H]^-$ for TOL, OH-TOL, COOH-TOL, CZX and OH-CZX were at m/z 269.1, 285.1, 299.1, 167.7 and 183.7, respectively. The SRM transitions, collisions energies and RF voltages and product ion spectrums of probe drugs are reported in Table 1 and Supplemental Figure 1, respectively.

2.5) Calibration standards and quality control samples

Three series of working solutions were prepared by diluting the stock solutions in different solvents: a) BUP, OH-BUP, MDZ, α -OH-MDZ, 4-OH-MDZ, OH-TOL, COOH-TOL, OME, OH-OME, OME-SULF, DES-OME, CZX and OH-CZX were diluted in methanol; b) CAF, PXT, DM and DX were diluted in water and c) TOL was diluted alone in water, since its alkaline content caused drug precipitation upon aqueous dilution with other working solutions. Calibration standards and quality control samples were prepared by fortifying blank (drug-free) human plasma or human urine with the working solutions to enable concentrations spanning relevant analytical ranges (Table 2).

2.6) Plasma samples

Plasma standard and quality control preparations were performed with two different sources of plasma: a) human drug-free plasma with EDTA (purchased from BioreclamationIVT)

was used for BUP, DM, TOL, MDZ and OME; b) for CAF, due to variability in baseline levels of both CAF and PXT, multiple donors were tested and CAF analyte free plasma was obtained from a male donor who withheld consumption of any caffeine, tea or chocolate products for a period of at least 10 days. LC-MS/MS analyses were performed to confirm the absence of CAF/PXT in plasma and urine matrices (data not shown).

Using a protein precipitation as sample preparation technique, BUP, DM, TOL, MDZ, OME and their respective metabolites were isolated from human plasma. The sample preparation was performed at 4 °C. Internal standard solution (750 µL: 250 ng/mL of $^2\text{H}_9$ -TOL; 25 ng/mL of $^2\text{H}_9$ -OH-TOL and $^2\text{H}_9$ -COOH-TOL; 20 ng/ml of $^2\text{H}_3$ -OME, $^2\text{H}_3$ -OH-OME, $^2\text{H}_3$ -DES-OME and $^2\text{H}_3$ -OME-SULF; 10 ng/mL of $^2\text{H}_9$ -BUP and $^2\text{H}_9$ -OH-BUP; 5 ng/mL of $^2\text{H}_4$ -MDZ, $^2\text{H}_4$ - α -OH-MDZ and $^2\text{H}_5$ -4-OH-MDZ; 1.5 ng/ml of $^2\text{H}_3$ -DM and $^2\text{H}_3$ -DX in methanol) was added to a 200 µL aliquot of plasma sample. The sample was vortexed for approximately 5 seconds and let stand for a period of 10 min at 4 °C, then centrifuged at 16000g for 10 min. For BUP, TOL and their metabolites, 100 µL was immediately transferred to injection vial for analysis. The remainder of the supernatant, approximately 750 µL, was transferred into a clean 16 x 100 mm borosilicate tube and evaporated to dryness at 40 °C under a gentle stream of nitrogen. The dried extract was re-suspended with 100 µL of methanol-water (25:75, v/v) solution and transferred to an injection vial for analysis of DM, MDZ, OME and their metabolites.

For the analysis of CAF, a protein precipitation technique was also used to isolate the analyte and metabolite from human plasma. Internal standard solution (500 µL: 150 ng/mL of $^2\text{H}_9$ -CAF and $^2\text{H}_3$ -PXT in methanol) was added to a 50 µL aliquot of plasma sample. The sample was vortexed for approximately 5 seconds and let stand for a period of 10 min, then centrifuged at 16000g for 10 min. The supernatant was transferred to an injection vial for analysis. Sample preparation procedures are shown in Supplemental Figure 2 (plasma).

2.7) Urine samples

OME and its metabolites rapidly degrade (less than 4 h) in an acidic urine milieu (pH 4.5-7.5) [32, 33] and thus, were not measured in human urine (data not shown). Furthermore, since CZX was given separately, three different urine preparations were performed: a) CAF,

DM, MDZ and TOL, after enzymatic deconjugation of urinary-excreted metabolite glucuronides, b) BUP without exposure to enzymatic deconjugation, and c) CZX after enzymatic deconjugation of urinary-excreted metabolite glucuronides.

Pretreatment of samples for the analysis of DM, TOL, MDZ and CAF samples was performed as follows: 25 μ L of ammonium acetate (pH 5; 100 mM) buffer and 125 units of β -glucuronidase/sulfatase were added to a 25 μ L aliquot of urine samples. The samples were incubated at 37 °C overnight. The internal standard mix solution (500 μ L: 50 ng/mL of 2 H9-TOL, 2 H9-OH-TOL, 2 H9-COOH-TOL, 2 H4-MDZ, 2 H4- α -OH-MDZ, 2 H5-4-OH-MDZ, 2 H3-DM and 2 H3-DX; 30 ng/mL of 2 H9-CAF and 2 H3-PXT in methanol-water (25:75, v/v)) was added to an aliquot of 25 μ L of the pretreated sample. Samples were vortexed approximately 5 seconds and transferred to injection vials for LC-MS/MS analyses.

Determination of BUP levels was performed without exposure to β -glucuronidase/sulfatase enzymes due to its instability at room temperature [34, 35]. Samples were diluted 1:1 with ammonium acetate (pH 5; 100mM) buffer. Five hundred (500 μ L) microliters of the same internal standard mix solution (10 ng/mL of 2 H9-BUP and 2 H9-OH-BUP in methanol-water (25:75, v/v)) was added to an aliquot of 25 μ L of diluted sample. Samples were vortexed, centrifuged and transferred to injection vials for analysis.

For CZX, samples were pretreated by adding 50 μ L of ammonium acetate buffer (pH 5; 100 mM) and 500 units of β -glucuronidase/sulfatase to a 100 μ L aliquot of urine samples. Samples were incubated at 37 °C overnight. A simple dilution was used to isolate CZX and its metabolite from urine. Two hundred and fifty (250 μ L) microliters of internal standard mix containing 20 ng/mL of 2 H₃-CZX and 600 ng/mL of 15 N²H₂-6-OH-CZX in methanol was added to pretreated urine samples. Samples were vortexed approximately 5 seconds and centrifuged at 16000g for 2 min. The supernatant was transferred to injection vials for analysis. Sample preparation procedures are shown in Supplemental Figure 3 (urine).

2.8) Application to a clinical project

These validated methods were applied to a clinical study approved by the Centre hospitalier de l'Université de Montreal (CHUM) institutional research ethic committee. Informed consent was obtained from healthy volunteers and patients before enrollment in the

study. Subjects received, after an overnight fast, an oral dose of the CYP450 probe cocktail consisting of 100 mg CAF, 100 mg BUP, 30 mg DX, 2 mg MDZ, 20 mg OME and 250 mg TOL. Serial blood samples were drawn immediately before (t=0h) and at 0.3, 0.6, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 and 8 hours post-dose and urine was collected during an 8 hour-period. At bedtime of the study day, a 250 mg oral dose of CZX (Acetazone® containing chlorzoxazone and acetaminophen) was taken alone and urine collected overnight. CZX is administered alone during the evening due to possible drug-drug interactions; CZX can inhibit first pass metabolism of oral MDZ in the gastrointestinal tract [36]. Moreover, the CZX formulation used in this cocktail contains acetaminophen and it is well known that acetaminophen is metabolized by CYP1A2 as well as CAF [37]. Plasma and urine samples were stored at -80 °C and -20 °C, respectively until analysis. Samples were processed as described above (Supplemental Figure 2 and 3). Pharmacokinetic parameters such as metabolic clearance and phenotypic index based on plasma and/or urine samples were derived to estimate activities of individual CYP450 [17, 23-25, 30].

3) Results

These methods were validated according to U.S Food and Drug Administration guidelines for bioanalytical methods validation [38]. All probe-drugs tested in our CYP450 cocktail were evaluated for selectivity, sensitivity, linearity, precision, accuracy, recovery, matrix effect, and stability (freeze and thaw cycles, short term, long term, stock and auto sampler stabilities). Probe drugs and their metabolites can be measured in human plasma and urine, except for OME and CZX which were analyzed in human plasma and urine only, respectively.

3.1) Linearity

For all probe drugs and metabolites, assays were linear over a wide range (Table 2). A linear regression (weighted 1/concentration) was judged to produce the best fit for the concentration-detector relationship for all analytes and metabolites in both plasma and urine. The coefficients of correlation (R^2) were greater than 0.9956 for all compounds in all batches during validation.

3.2) Sensitivity and selectivity

Selectivity of the assays were investigated by processing and analyzing six independent blank (drug-free) samples using the previously described isolation procedures (except for CAF where solely a specific donor was used due to the variability in baseline levels of CAF and PXT). Each blank sample was tested for interference, and selectivity was ensured at the lower limit of quantification (LLOQ). During all experimentation, no interference was observed at the mass transition and retention times for all compounds monitored (except CAF and PXT). The LLOQ concentration was chosen based on the literatures reported concentrations for the administered doses [19, 22, 24, 25, 39-42]. The LLOQ varied between 0.1-50 ng/mL in human plasma and between 0.3-600 ng/mL in human urine (Table 2). Precisions were better than 10.3% and accuracies were in the 98.0-116.7% range. The LLOQ precision and accuracy statistical results are shown in Table 3 (plasma) and Table 4 (urine). Figure 2 shows representative chromatograms of the overlay of processed blank plasma and the LLOQ standards in plasma for all substrates and metabolites, except for CZX which the overlay chromatogram obtained from a processed urine sample is shown.

3.3) Precision and accuracy

The intra-day precision and accuracy was assessed by replicate analysis (n=6) of QC samples at three different concentrations (low, mid and high) within an analytical run whereas the inter-day precision and accuracy was assessed by replicate analysis (n=6) of QC samples at three different concentrations (low, mid and high) within three different analytical runs for a total of 18 measurements. The intra-batch precision was evaluated as relative standard deviation (RSD), and the accuracy as relative error (RE). Precisions were better than 8.7% and accuracies were in the 90.6-110.2% range. The intra and inter batch precision and accuracy statistical results are shown in Table 3 (plasma) and Table 4 (urine).

3.4) Recovery and matrix effect

The extraction recoveries were determined for human plasma and urine at low and high concentrations (LQC and HQC). The recovery was determined by comparing pre-processed and fortified quality control samples to those of post-isolation and fortified quality control samples

(representing 100% recovery). Recoveries were between 84.5% and 110.5% in plasma and between 81.7% and 115.3% in urine. Recoveries for all compounds are reported in Table 2.

Evaluation of a matrix effect was assessed using six different matrix lots fortified at LLOQ and high quality control concentrations for all analytes (not performed for CAF and PXT due to high variability in baseline levels) in both matrices and their concentrations were back calculated against the calibration curve. No difference was observed between the different lots assayed as shown in Table 5 (plasma) and Table 6 (urine).

3.5) Stability

Stability experiments were performed in order to demonstrate whether or not all compounds were stable under typical sample analysis and storage conditions in both plasma and urine. Stability results were evaluated by back calculating the concentration of stability samples (low, mid and high concentrations) against freshly prepared calibration curves. Stability data was deemed acceptable if the %CV of the replicate (n=6) determinations did not exceed 15% and the mean accuracy value was within $\pm 15\%$ of the nominal value. Stability has been tested for freeze and thaw, short-term, autosampler, stock solution and long term stability. As experimentally verified (data not shown) and previously mentioned [34, 35], BUP was found unstable in human plasma or urine when processed at room temperature. Thus, all stability testing were performed at 4 °C except for CZX which was evaluated at room temperature since it was analyzed separately.

Freeze and thaw stability was evaluated by performing 4 freeze (-80 °C) and thaw (4 °C or ambient temperature for CZX) cycles. In short-term stability experiments, the quality control samples were kept at 4 °C (or ambient temperature for CZX) over 24 hour period. For long term stability, quality control samples were stored at -80 °C for a period of at least 40 days and the stability data was obtained against a freshly prepared calibration curve. To evaluate the autosampler stability, quality control samples were maintained in the autosampler for a minimum period of 3 days and the stability data was obtained against a freshly prepared calibration curve. All probe drugs and metabolites were stable at least 3 days in the autosampler (data not shown). For the stock stability, stock solutions were stored at 4 °C except OME and its metabolite which were stored at -80 °C and were compared to fresh stock solutions. All stock solutions were stable at least 8 months at 4 °C or -80 °C (OME) (data not shown). All

compounds met the acceptance criteria and were stable for at least four freeze/thaw cycles, 24 hour short term and over 40 days long term. Stability results are reported in Table 7 (plasma) and Table 8 (urine).

3.6) Application of the method

These analytical methods were successfully applied to the analysis of human plasma and urine samples from a clinical study. The suitability of these analytical methods was confirmed by analyzing all probe drugs and their metabolites in human plasma and urine obtained in several polymedicated patients. Plasma concentration profiles of CAF, BUP, DM, MDZ, OME, TOL and their metabolites from one patient, following oral administration of the CYP450 cocktail, are shown in Figure 3.

4) Discussion

Full validation of LC-MS/MS methods for the determination of CYP450 activities was carried out in compliance with FDA guidance for validation of bioanalytical methods. A phenotype determination for seven major isoenzymes in plasma and/or urine, namely CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4/5 and 2E1 can be achieved using these assays. Our optimized multiprobe cocktail assay utilizing low oral drug doses, simple extraction procedures and low volume of biological samples, has been successfully used to support sample analyses in polymedicated patients with several comorbidities. Our validated methods were found to be selective for all tested analytes and did not reveal interferences of matrix compounds or metabolites.

The most relevant CYP450 isoenzymes for drug metabolism are CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, CYP1A2 and CYP2E1 since they are heavily involved in the biotransformation of a large number of drugs. Therefore, most of previously developed probe cocktail methods were intended to target most of these isoenzymes although CYP2B6 and CYP2E1 were often not included [17-23, 25]. Several multiprobe cocktail methods such as the Pittsburg cocktail, the Karolinska cocktail and the Cooperstown 5+1 cocktail were successfully used to phenotype and investigate drug-drug interactions *in vivo*; however, their sample bioanalyses were performed by HPLC, needed large volume of samples, lacked sensitivity or showed analytical interference between compounds [26, 27, 31]. The GW cocktail reported by Scott *et al.*[30] was the first validated cocktail using LC-MS/MS methods to phenotype for six isoenzymes and was composed of caffeine, diclofenac, mephenytoin, debrisoquine, chlorzoxazone and midazolam as probes drugs. Mephenytoin and debrisoquin have been commonly used for phenotyping CYP2C19 and CYP2D6 activities, respectively. However, their administration is non-longer possible since these drugs were withdrawn from the market in most countries. Three cocktails described by Zhang *et al.*[22], Turpault *et al.* [23] and Yin *et al.*[25] have been also developed but, they were associated with some limitations including; lower detection sensitivity, use of higher doses of probe drugs increasing risk to adverse drug effects, and finally the assay methods were restricted to the analysis of probe drugs only hindering an accurate estimation of CYP450 phenotyping indices since specific metabolite measurements are often required. Many assays described in the literature were developed and

validated in either plasma or in urine for specific CYP450 probes. Our methods are more versatile and will allow assessment of various pharmacokinetic parameters such as metabolic clearance and renal clearance.

Our methods (Supplemental Figure 2) require only 50 μL of plasma for CAF and 200 μL for BUP, DM, MDZ, OME and TOL to assure a sufficient sensitivity compared to 300-1000 μL of plasma commonly used in most methods from literature [17, 19-21, 24, 25, 30]. Zhang *et al.* [22] developed an assay using only 50 μL of plasma. However, their method was limited to four probe drugs and did not measure any metabolites. Indeed, sample bioanalysis being less complex makes possible the use of smaller plasma volume while maintaining a good precision at low concentrations (LLOQ) for the probe drugs. The CYP450 cocktail described by Oh *et al.* used microdoses of 5 probe drugs [20]. Although their assay was associated with good sensitivity, it also required a higher volume of plasma than our methods (500 vs. 250 μL , respectively) and used propranolol as internal standard while isotopically labeled compounds are employed for all analytes in our methods. The use of labeled analytes as internal standards enhances the robustness of the method by minimizing possible matrix effects; this is an advantage particularly, while performing sample bioanalyses from polymedicated patients. De Andres *et al.* [18] and Wohlfarth *et al.* [19] have recently developed two methods using comparable oral doses as given in our cocktail and showed similar range of LLOQ. These methods were developed to phenotype for CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4 but did not measure probe drugs for CYP2B6 and CYP2E1 which are involved in the metabolism of approximately 7% and 3% of major commercial drugs, respectively [43].

Furthermore, our sample preparation uses a simple isolation procedure. Numerous CYP450 phenotyping methods employed extensive extraction procedures for sample preparation such as dual liquid extraction or solid phase extraction which are costly and time consuming [10, 17-20, 23-25, 30]. A new method was recently reported by Tanaka *et al.* [17] for probe drug extraction *i.e.* “the Ostro Pass-Through Sample preparation” which showed a significant improvement in bioanalysis compared to the use of protein precipitation solely. Extraction recoveries obtained using their method ranged between 66.4% and 116% which are quite comparable to the recoveries attained using our methods *i.e.* 81.7% and 115.3%. In addition, their method showed lower correlation coefficients (between 0.946 and 0.992).

Therefore there is no added benefit in adding an extra step (filtration through a sorbent) with extra cost to the sample preparation process. Finally, the CYP450 phenotyping method reported by Stewart *et al.* [21] using UPLC-MS/MS raised many advantages compared to previous published methods in term of sensitivity, low doses of probe drugs, low blood volume and the rapidity and the simplicity of their extraction methods. Their assay allows the determination of five probe drugs to phenotype for CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 2E1 in human plasma or urine. However, this cocktail approach displays two major limitations, *i.e.* the utilization of mephenytoin and debrisoquin as probes drugs to phenotype for CYP2C19 and 2D6 respectively, and it did not contain any probe drug to measure CYP3A4 activity which metabolizes approximately 30-50% of drugs used in clinic [43].

Our methods demonstrate many advantages compared to previously published methods for the evaluation of CYP450 activities by LC-MS/MS. These current assays offer an improvement in sensitivity allowing the detection of seven probe drugs and their respective metabolites in plasma and urine in polymedicated patients [23-25, 30]. The methods presented in this manuscript have been applied to a clinical study in 30 polymedicated patients to identify properly phenotypic CYP450 activities without induction of any drug side effects.

5) Conclusion

In this present work, we have developed and fully validated reliable, precise and sensitive assays which allow the determination of seven CYP450 probe drugs specifically CAF (CYP1A2), BUP (CYP2B6), DM (CYP2D6), MDZ (CYP3A4/3A5), OME (CYP2C19), TOL (CYP2C9) and CZX (CYP2E1) in human plasma and/or urine. Compared to the numerous cocktails and methods published in the literature, our methods present many advantages. The use of probe drugs available in most countries and their specificity towards CYP450 isoenzymes as well as analyses being performed by LC-MS/MS render our methods selective and easily applicable. The methods require a small volume of plasma and the sample preparation technique is simple, fast and inexpensive. The LLOQs are very low allowing the administration of small doses of probe drugs. The fundamental parameters such as accuracy, precision, linearity, selectivity, sensitivity, recovery, reproducibility and stability meet the criteria acceptance for all probe drugs and metabolites, confirming that these LC-MS/MS methods have been successfully developed and validated. The results for these methods validation, according to U.S. FDA guidelines for bioanalytical method validation, support that all clinical samples found in the validated concentration range can be measured with acceptable precision and accuracy. In addition to genotype, a better assessment of CYP450 phenotypes will enable the determination of inter-individual variability in major CYP450, which are an important source of variation in drug pharmacokinetics and thus, in drug response.

Acknowledgments

We thank the Pharmacokinetic core facility of CRCHUM for the support in method development, validation and sample analysis.

Funding

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; grant #299309). Sophie Gravel is recipient of a studentship from the Fonds de la Recherche du Québec en Santé (FRQS). Veronique Michaud is the recipient of a research scholarship from FRQS in partnership with the Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS).

References

- [1] D.R. Nelson, The cytochrome p450 homepage, *Hum Genomics*, 4 (2009) 59-65.
- [2] D.F. Lewis, 57 varieties: the human cytochromes P450, *Pharmacogenomics*, 5 (2004) 305-318.
- [3] S. Rendic, F.J. Di Carlo, Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug Metab Rev*, 29 (1997) 413-580.
- [4] M.F. Paine, M. Khalighi, J.M. Fisher, D.D. Shen, K.L. Kunze, C.L. Marsh, J.D. Perkins, K.E. Thummel, Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism, *J Pharmacol Exp Ther*, 283 (1997) 1552-1562.
- [5] G. Smith, M.J. Stubbins, L.W. Harries, C.R. Wolf, Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily, *Xenobiotica*, 28 (1998) 1129-1165.
- [6] U. Yasar, G. Tybring, M. Hidestrand, M. Oscarson, M. Ingelman-Sundberg, M.L. Dahl, E. Eliasson, Role of CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation, *Drug Metab Dispos*, 29 (2001) 1051-1056.
- [7] D.J. Touw, Clinical implications of genetic polymorphisms and drug interactions mediated by cytochrome P-450 enzymes, *Drug Metabol Drug Interact*, 14 (1997) 55-82.
- [8] P.T. Manyike, E.D. Kharasch, T.F. Kalhorn, J.T. Slattery, Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation, *Clin Pharmacol Ther*, 67 (2000) 275-282.
- [9] H. Wang, L.M. Tompkins, CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme, *Curr Drug Metab*, 9 (2008) 598-610.
- [10] M. Turpeinen, H. Raunio, O. Pelkonen, The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico, *Curr Drug Metab*, 7 (2006) 705-714.
- [11] S. Rendic, F.P. Guengerich, Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters, *Curr Drug Metab*, 11 (2010) 4-84.
- [12] S.F. Zhou, J.P. Liu, B. Chowbay, Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact, *Drug Metab Rev*, 41 (2009) 89-295.

- [13] N.A. Helsby, Pheno- or genotype for the CYP2C19 drug metabolism polymorphism: the influence of disease, *Proc West Pharmacol Soc*, 51 (2008) 5-10.
- [14] B.N. Zordoky, A.O. El-Kadi, Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure, *Curr Drug Metab*, 9 (2008) 122-128.
- [15] P. du Souich, C. Fradette, The effect and clinical consequences of hypoxia on cytochrome P450, membrane carrier proteins activity and expression, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 7 (2011) 1083-1100.
- [16] D.S. Riddick, C. Lee, A. Bhatena, Y.E. Timsit, P.Y. Cheng, E.T. Morgan, R.A. Prough, S.L. Ripp, K.K. Miller, A. Jahan, J.Y. Chiang, Transcriptional suppression of cytochrome P450 genes by endogenous and exogenous chemicals, *Drug Metab Dispos*, 32 (2004) 367-375.
- [17] S. Tanaka, S. Uchida, N. Inui, K. Takeuchi, H. Watanabe, N. Namiki, Simultaneous LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 substrate drugs and their metabolites, *Biol Pharm Bull*, 37 (2014) 18-25.
- [18] F. de Andres, M. Sosa-Macias, A. Llerena, A rapid and simple LC-MS/MS method for the simultaneous evaluation of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 hydroxylation capacity, *Bioanalysis*, 6 (2014) 683-696.
- [19] A. Wohlfarth, J. Naue, S. Lutz-Bonengel, S. Dresen, V. Auwarter, Cocktail approach for in vivo phenotyping of 5 major CYP450 isoenzymes: development of an effective sampling, extraction, and analytical procedure and pilot study with comparative genotyping, *J Clin Pharmacol*, 52 (2012) 1200-1214.
- [20] K.S. Oh, S.J. Park, D.D. Shinde, J.G. Shin, D.H. Kim, High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 895-896 (2012) 56-64.
- [21] N.A. Stewart, S.C. Buch, T.P. Conrads, R.A. Branch, A UPLC-MS/MS assay of the "Pittsburgh cocktail": six CYP probe-drug/metabolites from human plasma and urine using stable isotope dilution, *Analyst*, 136 (2011) 605-612.
- [22] W. Zhang, F. Han, P. Guo, H. Zhao, Z.J. Lin, M.Q. Huang, K. Bertelsen, N. Weng, Simultaneous determination of tolbutamide, omeprazole, midazolam and dextromethorphan in human plasma by LC-MS/MS--a high throughput approach to evaluate drug-drug interactions, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878 (2010) 1169-1177.

- [23] S. Turpault, W. Brian, R. Van Horn, A. Santoni, F. Poitiers, Y. Donazzolo, X. Boulenc, Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A, *Br J Clin Pharmacol*, 68 (2009) 928-935.
- [24] J.Y. Ryu, I.S. Song, Y.E. Sunwoo, J.H. Shon, K.H. Liu, I.J. Cha, J.G. Shin, Development of the "Inje cocktail" for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo, *Clin Pharmacol Ther*, 82 (2007) 531-540.
- [25] O.Q. Yin, S.S. Lam, C.M. Lo, M.S. Chow, Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18 (2004) 2921-2933.
- [26] M. Christensen, K. Andersson, P. Dalen, R.A. Mirghani, G.J. Muirhead, A. Nordmark, G. Tybring, A. Wahlberg, U. Yasar, L. Bertilsson, The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes, *Clin Pharmacol Ther*, 73 (2003) 517-528.
- [27] S. Chainuvati, A.N. Nafziger, J.S. Leeder, A. Gaedigk, G.L. Kearns, E. Sellers, Y. Zhang, A.D. Kashuba, E. Rowland, J.S. Bertino, Jr., Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail", *Clin Pharmacol Ther*, 74 (2003) 437-447.
- [28] B. Zhu, D.S. Ou-Yang, X.P. Chen, S.L. Huang, Z.R. Tan, N. He, H.H. Zhou, Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach, *Clin Pharmacol Ther*, 70 (2001) 455-461.
- [29] Z. Wang, J.C. Gorski, M.A. Hamman, S.M. Huang, L.J. Lesko, S.D. Hall, The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity, *Clin Pharmacol Ther*, 70 (2001) 317-326.
- [30] R.J. Scott, J. Palmer, I.A. Lewis, S. Pleasance, Determination of a 'GW cocktail' of cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in plasma and urine using automated solid phase extraction and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13 (1999) 2305-2319.
- [31] R.F. Frye, G.R. Matzke, A. Adedoyin, J.A. Porter, R.A. Branch, Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes, *Clin Pharmacol Ther*, 62 (1997) 365-376.

- [32] M. El-Badry, E.I. Taha, F.K. Alanazi, I.A. Alsarra, Study of omeprazole stability in aqueous solution: influence of cyclodextrins, *J Drug Del Sci Tech*, 19 (2009) 347-351.
- [33] N. Sarisuta, T. Tourtip, S. Chuarchoern, Chemical Stability and Mechanism of Degradation of Omeprazole in Solution, *Thai J Pharm*, 22 (1998) 81-88.
- [34] D. Yeniceli, D. Dogrukol-Ak, An LC Method for the Determination of Bupropion and Its Main Metabolite, Hydroxybupropion in Human Plasma, *Chromatographia*, 70 (2009) 1703–1708.
- [35] S.C. Laizure, C.L. DeVane, Stability of bupropion and its major metabolites in human plasma, *Ther Drug Monit*, 7 (1985) 447-450.
- [36] J.L. Palmer, R.J. Scott, A. Gibson, M. Dickins, S. Pleasance, An interaction between the cytochrome P450 probe substrates chlorzoxazone (CYP2E1) and midazolam (CYP3A), *Br J Clin Pharmacol*, 52 (2001) 555-561.
- [37] F. Berthou, T. Goasduff, D. Lucas, Y. Dreano, M.H. Le Bot, J.F. Menez, Interaction between two probes used for phenotyping cytochromes P4501A2 (caffeine) and P4502E1 (chlorzoxazone) in humans, *Pharmacogenetics*, 5 (1995) 72-79.
- [38] U.D.o.H.a.H.S. FDA Guidance, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, 2001.
- [39] R. Coles, E.D. Kharasch, Stereoselective analysis of bupropion and hydroxybupropion in human plasma and urine by LC/MS/MS, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 857 (2007) 67-75.
- [40] L.L. Furge, K.J. Fletke, HPLC determination of caffeine and paraxanthine in urine: An assay for cytochrome P450 1A2 activity, *Biochem Mol Biol Educ*, 35 (2007) 138-144.
- [41] L.L. Hansen, K. Brosen, Quantitative determination of tolbutamide and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography and UV detection, *Ther Drug Monit*, 21 (1999) 664-671.
- [42] R.F. Frye, D.D. Stiff, Determination of chlorzoxazone and 6-hydroxychlorzoxazone in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Biomed Appl*, 686 (1996) 291-296.

[43] U.M. Zanger, K. Klein, M. Thomas, J.K. Rieger, R. Tremmel, B.A. Kandel, M. Klein, T. Magdy, Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes, *Clin Pharmacol Ther*, 95 (2014) 258-261.

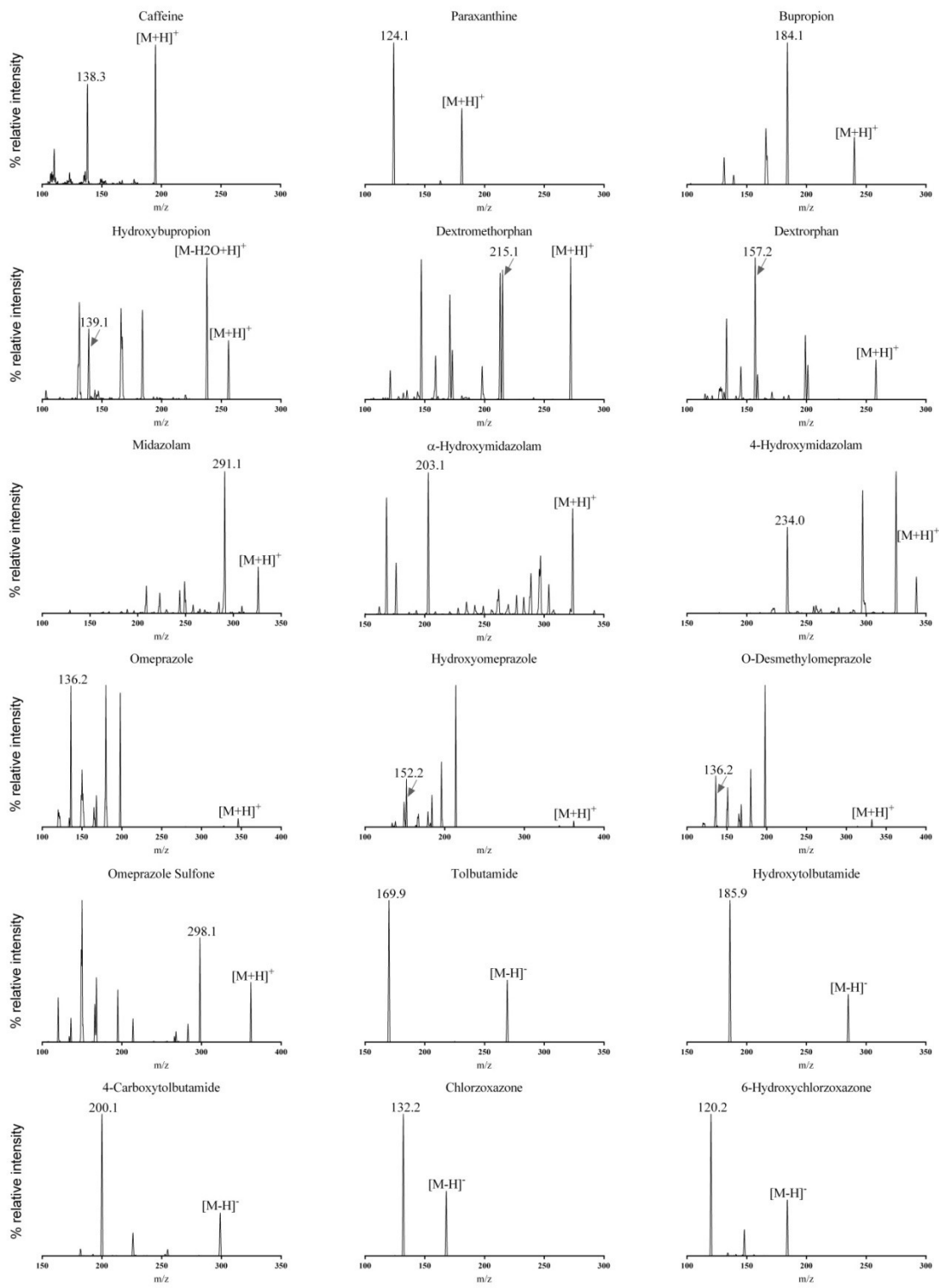
Figures captions

Figure 1 - Chemical structures of the probe drugs and their metabolites. This figure illustrate the major metabolic pathway for the selected specific probes

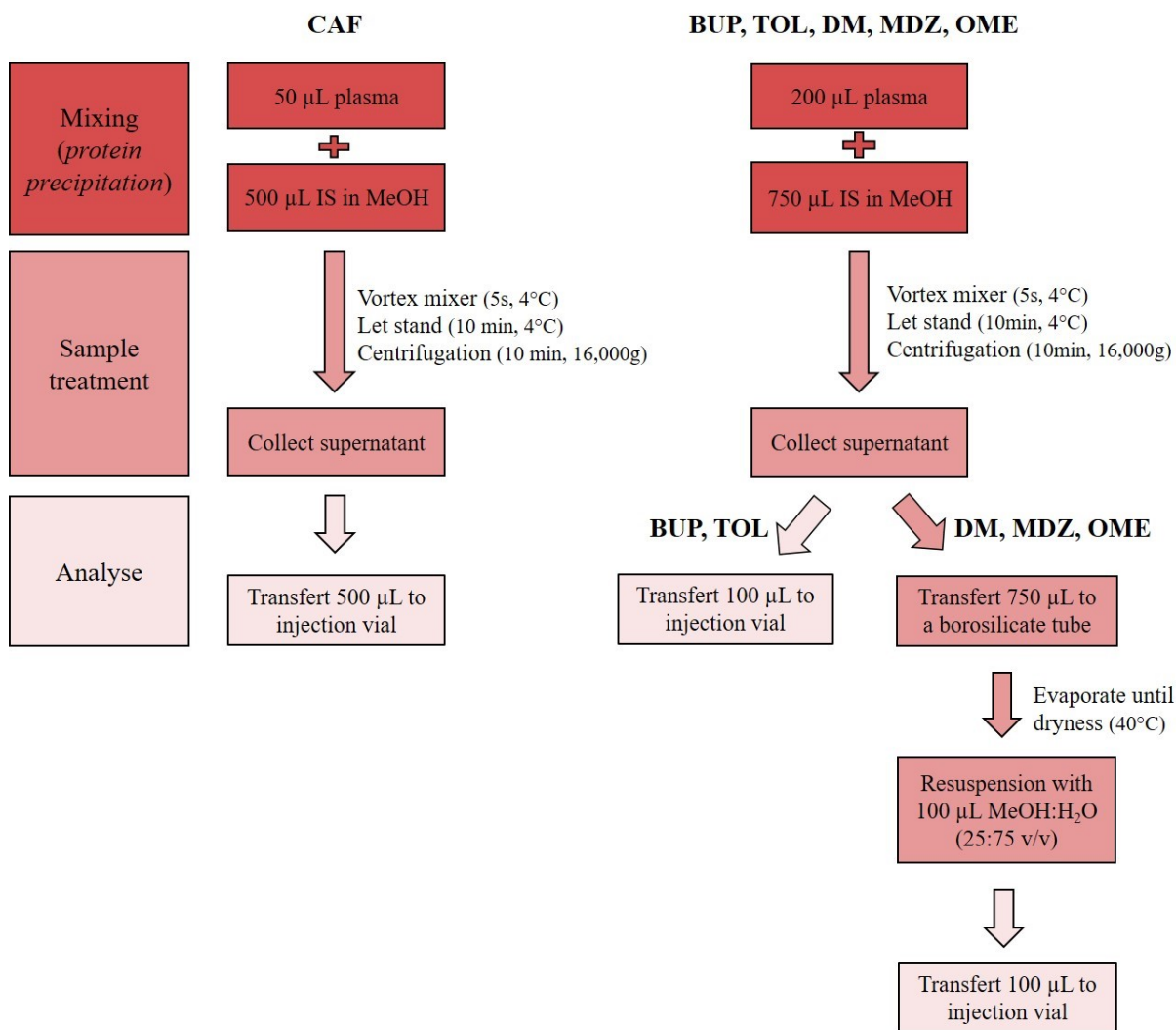
Figure 2 - Representative chromatograms of an extracted LLOQ human plasma spiked with probes drugs and their metabolites and an extracted control (blank) human plasma or urine (CZX).

Figure 3 - Plasma concentration profiles of CAF, BUP, DM, MDZ, OME, TOL and their metabolites from one patient following the oral administration of our CYP450 cocktail.

Supplemental figure 1 - Product ion spectrums of probe drugs used in the cocktail



Supplemental figure 2 - Schematic illustration of main steps in the isolation of probe-drugs and metabolites from plasma.



Supplemental figure 3 – Schematic illustration of main steps in the isolation of probe-drugs and metabolites from urine.

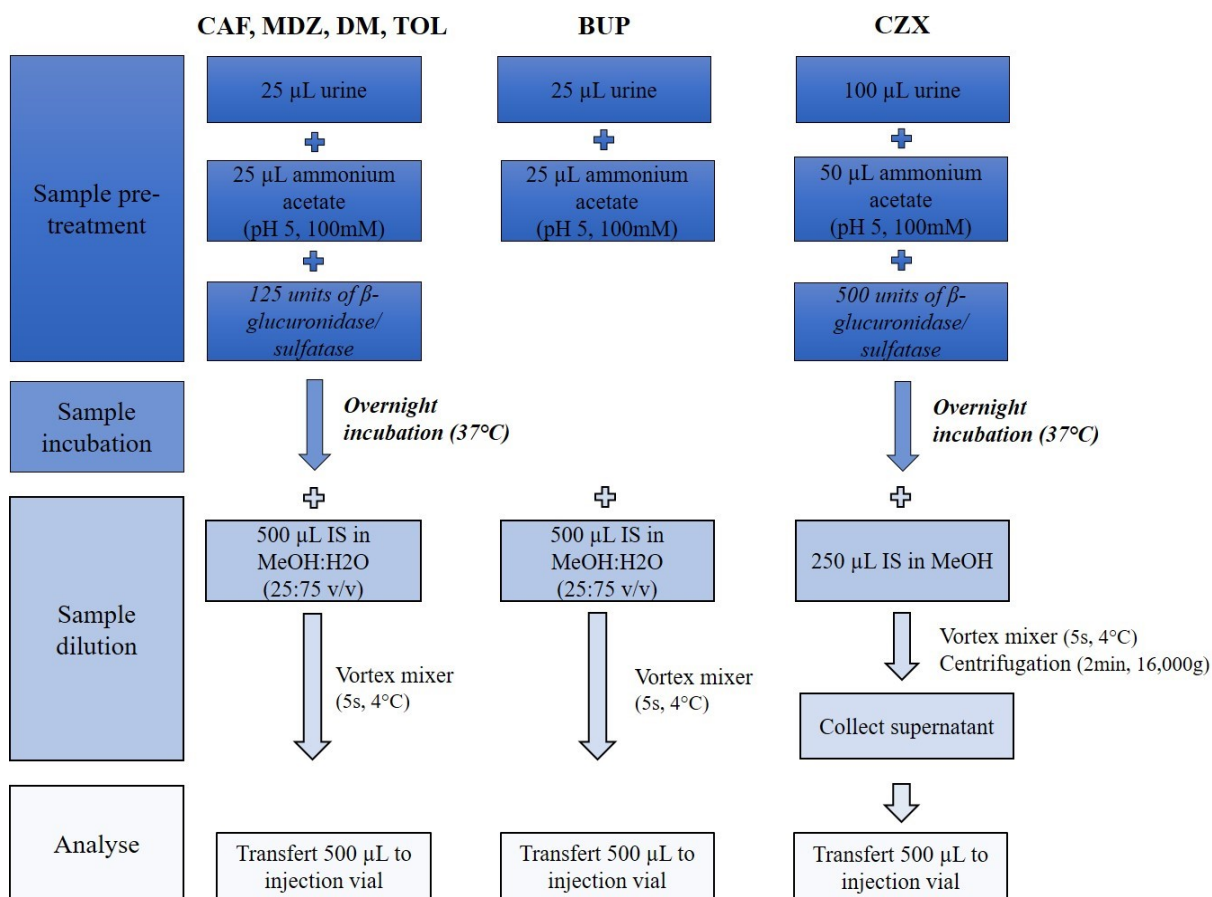


Figure 1

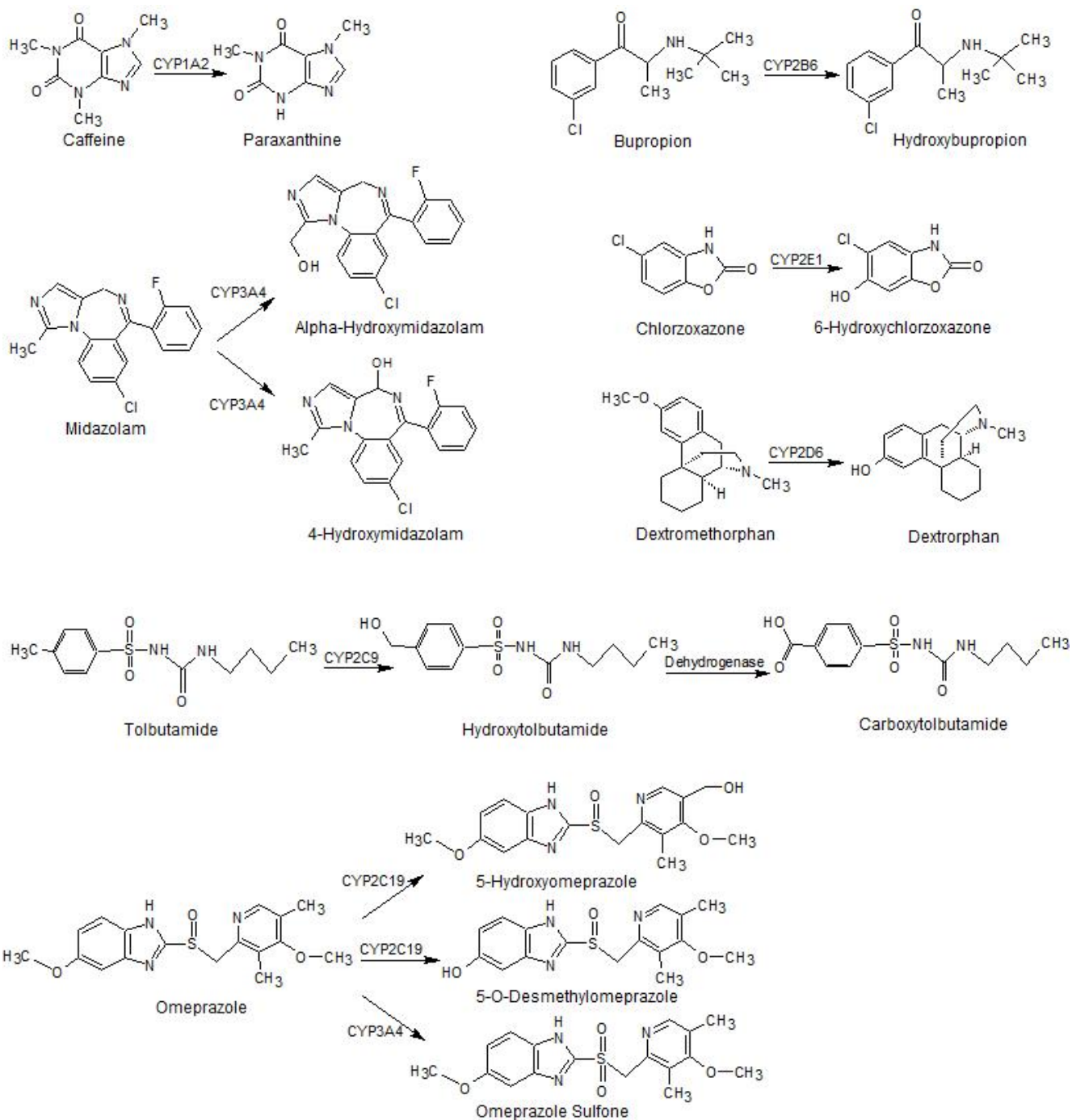


Figure 2

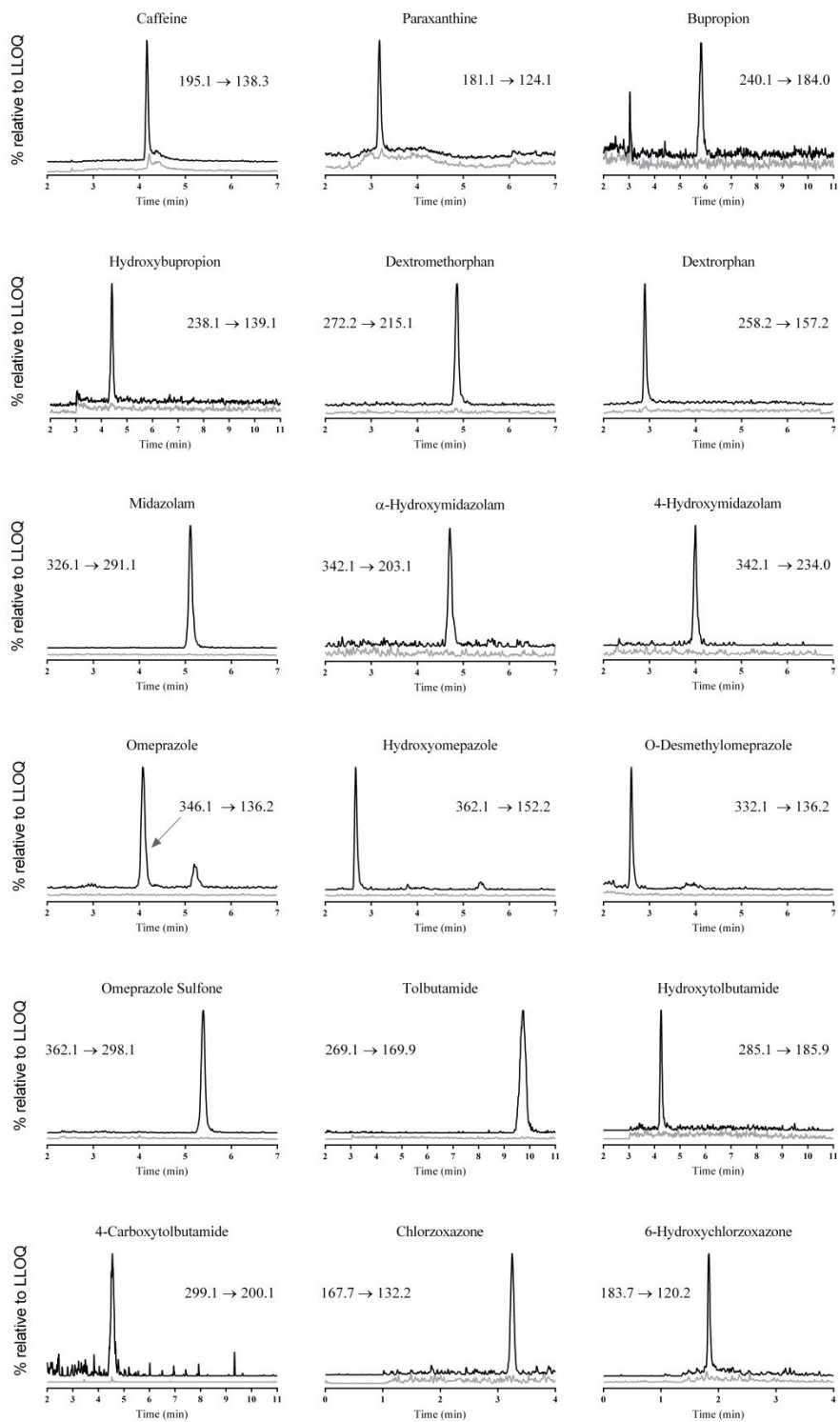


Figure 3

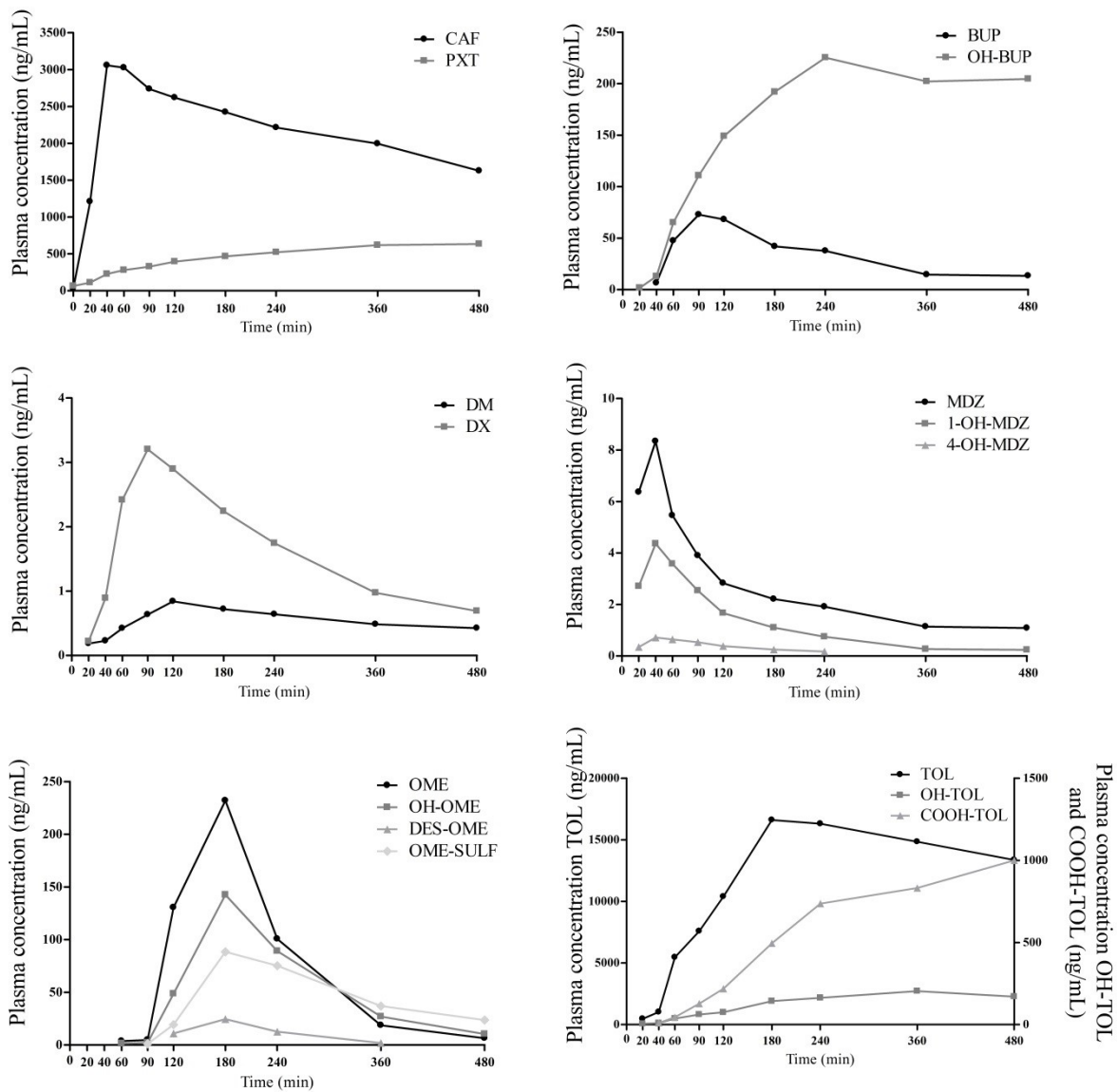


Table 1 - Mass spectrometry conditions: SRM transitions (precursor to product transitions), fragmentation conditions (CE, collision energy; RF, radio frequency) and polarity mode (3500V, positive mode; -3000V, negative mode) for probe drugs, metabolites and internal standards.

Analyte	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (eV)	RF (V)
Caffeine	Positive	195.1	138.3	20	58
² H ₉ -Caffeine	Positive	204.1	144.1	20	58
Paraxanthine	Positive	181.1	124.1	20	58
² H ₃ -Paraxanthine	Positive	184.1	127.2	20	58
Bupropion	Positive	240.1	184.1	13	39
² H ₉ -Bupropion	Positive	249.2	185.1	13	39
Hydroxybupropion	Positive	238.1	139.1	24	100
² H ₆ -Hydroxybupropion	Positive	244.2	139.1	24	100
Dextromethorphan	Positive	272.2	215.1	24	60
² H ₃ -Dextromethorphan	Positive	275.2	215.1	24	65
Dextrorphan	Positive	258.2	157.2	38	63
² H ₃ -Dextrorphan	Positive	261.2	157.2	38	65
Midazolam	Positive	326.1	291.1	27	86
² H ₄ -Midazolam	Positive	330.1	295.2	27	96
α -OH-Midazolam	Positive	342.1	203.1	27	73
² H ₄ - α -OH-Midazolam	Positive	346.0	202.3	27	71
4-OH-Midazolam	Positive	342.1	234.0	23	68
² H ₅ -4-OH Midazolam	Positive	347.3	235.1	23	62
Omeprazole	Positive	346.1	136.2	33	54
² H ₃ -Omeprazole	Positive	349.1	136.1	33	46
Hydroxyomeprazole	Positive	362.1	152.2	34	56
² H ₃ -Hydroxyomeprazole	Positive	365.2	152.1	34	49
Omeprazole Sulfone	Positive	362.1	298.1	19	75
² H ₃ -Omeprazole Sulfone	Positive	365.2	301.2	19	70
5'-O-Desmethyl omeprazole	Positive	332.1	136.2	33	47
² H ₃ -5'-O-Desmethyl omeprazole	Positive	335.2	138.1	33	44
Tolbutamide	Negative	269.1	169.9	17	67
² H ₉ -Tolbutamide	Negative	278.2	170.0	17	77
Hydroxytolbutamide	Negative	285.1	185.9	19	71
² H ₉ -Hydroxytolbutamide	Negative	294.2	186.2	19	83
4-Carboxytolbutamide	Negative	299.1	200.1	17	64
² H ₉ -4-Carboxytolbutamide	Negative	308.1	200.0	17	73
Chlorzoxazone	Negative	167.7	132.2	20	103
² H ₃ -Chlorzoxazone	Negative	170.8	134.1	20	101
6-Hydroxychlorzoxazone	Negative	183.7	120.2	20	56
¹⁵ N ² H ₂ -6-Hydroxychlorzoxazone	Negative	188.8	123.1	20	65

Table 2 – Summary of calibration range, correlation coefficient (mean \pm SD), LLOQ and recovery at low and high concentrations for probe drugs and metabolites in human plasma and urine. Recovery results expressed as mean of percentage of reference sample.

Analyte	Matrix	Calibration range (ng/ml)	R ² \pm SD	LLOQ (ng/ml)	Recovery LOQ (%)	Recovery HOQ (%)
Caffeine	Plasma	10-10000	0.9987 \pm 0.0016	10	107.6	104.6
	Urine	30-10000	0.9983 \pm 0.0009	30	95.6	106.7
Paraxanthine	Plasma	10-10000	0.9997 \pm 0.0002	10	101.9	101.4
	Urine	30-10000	0.9988 \pm 0.0006	30	89.2	105.4
Bupropion	Plasma	0.5-500	0.9989 \pm 0.0011	0.5	107.2	92.3
	Urine	6-2000	0.9982 \pm 0.0009	6	102.1	114.5
Hydroxybupropion	Plasma	1-1000	0.9989 \pm 0.0009	1	108.8	102.7
	Urine	6-2000	0.9982 \pm 0.0014	6	83.4	115.3
Dextromethorphan	Plasma	0.1-100	0.9995 \pm 0.0002	0.1	84.5	87.8
	Urine	15-5000	0.9988 \pm 0.0013	15	89.5	103.0
Dextrorphan	Plasma	0.1-100	0.9991 \pm 0.0006	0.1	101.5	91.2
	Urine	600-200000	0.9993 \pm 0.0004	600	90.6	103.1
Midazolam	Plasma	0.1-100	0.9995 \pm 0.0002	0.1	89.5	93.7
	Urine	0.3-100	0.9984 \pm 0.0010	0.3	81.7	114.4
α -Hydroxymidazolam	Plasma	0.1-100	0.9995 \pm 0.0004	0.1	88.4	93.7
	Urine	6-2000	0.9983 \pm 0.0010	6	85.9	114.6
4-Hydroxymidazolam	Plasma	0.1-100	0.9989 \pm 0.0005	0.1	86.0	89.3
	Urine	6-2000	0.9979 \pm 0.0015	6	83.8	113.5
Omeprazole	Plasma	1-1000	0.9995 \pm 0.0003	1	91.8	93.6
Hydroxyomeprazole	Plasma	1-1000	0.9993 \pm 0.0003	1	93.0	93.5
Des-O-methylomeprazole	Plasma	1-1000	0.9995 \pm 0.0003	1	90.2	91.3
Omeprazole-Sulfone	Plasma	1-1000	0.9994 \pm 0.0003	1	92.9	94.3
Tolbutamide	Plasma	50-50000	0.9992 \pm 0.0004	50	104.0	106.8
	Urine	30-10000	0.9990 \pm 0.0004	30	104.0	103.4
Hydroxytolbutamide	Plasma	5-5000	0.9989 \pm 0.0007	5	107.8	100.5
	Urine	30-10000	0.9982 \pm 0.0010	30	82.6	114.9
Carboxytolbutamide	Plasma	5-5000	0.9986 \pm 0.0014	5	110.5	102.4
	Urine	30-10000	0.9983 \pm 0.0012	30	83.8	113.3
Chlorzoxazone	Urine	3-1000	0.9983 \pm 0.0006	3	91.1	114.4
6-Hydroxychlorzoxazone	Urine	30-10000	0.9972 \pm 0.0017	30	94.4	111.5

Table 3 – Summary of intra-day (six replicate per concentration) and inter-day (three individuals runs) precision and accuracy of quality control samples for CAF, BUP, DM, MDZ, OME, TOL and their metabolites in human plasma. Results are expressed as concentration mean \pm SD; RSD, relative standard deviation; RE, relative error.

	Concentration (ng/mL)	Intra-day (n=6)			Inter-day (n=18)		
		Mean \pm SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)	Mean \pm SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)
CAF	10	10.3 \pm 0.8	7.5	2.6	10.2 \pm 0.6	5.9	2.0
	30	30.3 \pm 1.0	3.4	1.1	29.8 \pm 1.6	5.3	-0.8
	1250	1243.8 \pm 8.8	0.7	-0.5	1317.0 \pm 70.6	5.4	5.4
	6000	6578.9 \pm 125.7	1.9	9.6	6441.1 \pm 286.9	4.5	7.4
PXT	10	11.6 \pm 0.2	1.3	16.2	10.7 \pm 0.9	8.6	2.1
	30	31.0 \pm 1.0	3.1	3.5	30.0 \pm 1.4	4.8	0.0
	1250	1236.0 \pm 12.8	1.0	-1.1	1324.8 \pm 66.1	5.0	6.0
	6000	6373.8 \pm 69.4	1.1	6.2	6385.9 \pm 89.5	1.4	6.4
BUP	0.5	0.5 \pm 0.03	5.1	3.5	0.5 \pm 0.04	6.8	2.1
	1.5	1.5 \pm 0.1	5.0	-2.5	1.5 \pm 0.1	6.0	-0.7
	62.5	60.5 \pm 2.2	3.6	-3.1	63.4 \pm 2.7	4.2	1.5
	300	298.7 \pm 2.4	0.8	-0.4	314.6 \pm 15.4	4.9	4.9
OH-BUP	1	1.2 \pm 0.02	1.8	15.6	1.2 \pm 0.07	6.0	16.4
	3	3.0 \pm 0.2	5.2	1.4	3.1 \pm 0.1	4.2	4.3
	125	125.6 \pm 1.9	1.5	0.5	122.3 \pm 8.7	7.1	-2.2
	600	638.4 \pm 11.9	1.9	6.4	635.1 \pm 26.8	4.2	5.8
DM	0.1	0.1 \pm 0.01	2.0	12.7	0.1 \pm 0.01	3.9	10.1
	0.3	0.3 \pm 0.01	2.2	-6.1	0.3 \pm 0.02	7.9	-3.1
	12.5	12.1 \pm 0.1	0.6	97.1	12.6 \pm 0.4	3.1	0.5
	60	58.6 \pm 0.7	1.2	-2.3	60.1 \pm 1.2	2.0	0.1
DX	0.1	0.1 \pm 0.01	3.9	10.5	0.1 \pm 0.01	5.2	11.4
	0.3	0.3 \pm 0.01	2.0	-5.8	0.3 \pm 0.01	2.8	-3.5
	12.5	12.4 \pm 0.1	0.9	-0.8	12.6 \pm 0.3	2.2	0.5
	60	59.0 \pm 0.7	1.2	-1.7	61.0 \pm 3.5	5.7	1.7
MDZ	0.1	0.1 \pm 0.01	4.7	7.3	0.1 \pm 0.01	5.8	8.2
	0.3	0.3 \pm 0.02	6.0	-1.4	0.3 \pm 0.01	3.9	-2.4
	12.5	12.7 \pm 0.3	2.0	1.6	12.4 \pm 0.4	3.1	-1.2
	60	62.8 \pm 1.3	2.1	4.6	60.5 \pm 2.0	3.4	0.9
1-OH-MDZ	0.1	0.1 \pm 0.01	10.2	6.2	0.1 \pm 0.01	7.2	7.1
	0.3	0.3 \pm 0.01	2.4	-5.4	0.3 \pm 0.02	7.9	-1.1
	12.5	12.2 \pm 0.3	2.6	-2.3	12.3 \pm 0.2	1.8	-1.5
	60	59.3 \pm 0.7	1.2	-1.1	62.6 \pm 3.0	4.8	4.4
4-OH-MDZ	0.1	0.1 \pm 0.01	9.6	11.9	0.1 \pm 0.01	6.5	13.8
	0.3	0.3 \pm 0.01	3.5	4.4	0.3 \pm 0.03	8.7	6.4
	12.5	12.4 \pm 0.3	2.4	-0.6	12.6 \pm 0.4	3.5	0.5
	60	65.9 \pm 1.5	2.3	9.9	63.2 \pm 2.9	4.6	5.4

	Concentration (ng/mL)	Intra-day (n=6)			Inter-day (n=18)		
		Mean ± SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)	Mean ± SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)
OME	1	1.1 ± 0.03	2.8	7.3	1.0 ± 0.05	4.8	2.7
	3	2.8 ± 0.1	2.7	-7.2	2.8 ± 0.1	2.7	-8.3
	125	131.3 ± 1.0	0.8	5.0	130.0 ± 4.1	3.2	4.0
	600	604.3 ± 5.4	0.9	0.7	616.6 ± 12.6	2.0	2.8
OH-OME	1	1.1 ± 0.05	5.0	5.4	1.0 ± 0.05	4.4	4.7
	3	2.7 ± 0.1	2.5	-9.4	2.8 ± 0.1	3.7	-8.1
	125	132.2 ± 1.5	1.1	5.7	130.0 ± 4.4	3.4	4.1
	600	609.4 ± 4.1	0.7	1.6	617.9 ± 15.2	2.5	3.0
DES-OME	1	1.2 ± 0.02	1.5	16.7	1.1 ± 0.05	4.3	11.3
	3	2.8 ± 0.1	3.5	-8.3	2.7 ± 0.1	2.7	-8.7
	125	128.0 ± 1.2	0.9	2.4	126.9 ± 4.8	3.8	1.5
	600	601.4 ± 5.6	0.9	0.2	610.4 ± 13.9	2.3	1.7
OME-SULF	1	1.0 ± 0.03	2.7	-2.0	1.0 ± 0.03	2.8	-1.2
	3	2.8 ± 0.1	2.2	-5.8	2.8 ± 0.1	2.1	-5.7
	125	132.6 ± 1.4	1.1	6.1	129.8 ± 3.9	3.0	3.9
	600	603.3 ± 5.4	0.9	0.5	610.3 ± 11.0	1.8	1.7
TOL	50	58.8 ± 1.0	1.7	17.6	58.3 ± 5.6	9.6	16.7
	150	149.9 ± 3.4	2.2	-0.1	151.0 ± 5.8	3.8	0.6
	6250	6165.7 ± 71.0	1.2	-1.3	6205.8 ± 165.2	2.7	-0.7
	30000	30292.2 ± 411.2	1.4	1.0	30982.3 ± 747.4	2.4	3.3
OH-TOL	5	5.7 ± 0.3	5.2	13.4	5.3 ± 0.4	8.4	6.2
	15	14.6 ± 0.7	4.7	-2.7	14.9 ± 0.9	5.9	-0.5
	625	614.5 ± 13.6	2.2	-1.7	631.4 ± 22.6	3.6	1.0
	3000	3137.3 ± 89.6	2.9	4.6	3181.3 ± 115.6	3.6	6.0
COOH-TOL	5	5.8 ± 0.2	3.4	15.0	5.4 ± 0.6	10.3	8.7
	15	15.8 ± 0.5	3.4	5.5	15.6 ± 0.8	5.2	3.8
	625	624.5 ± 10.0	1.6	-0.1	626.4 ± 29.4	4.7	0.2
	3000	3110.4 ± 63.0	2.0	3.7	3159.0 ± 166.7	5.3	5.3

Table 4 – Summary of intra-day (six replicate per concentration) and inter-day (three individuals runs) precision and accuracy of quality control samples for CAF, BUP, DM, MDZ, TOL, CZX and their metabolites in human urine. Results are expressed as concentration mean \pm SD; RSD, relative standard deviation; RE, relative error.

	Concentration (ng/mL)	Intra-day (n=6)			Inter-day (n=18)		
		Mean \pm SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)	Mean \pm SD (ng/mL)	RSD (%)	RE (%)
CAF	30	34.1 \pm 2.0	5.7	13.6	34.5 \pm 1.8	2.5	15.1
	90	88.9 \pm 5.0	5.7	-1.2	89.6 \pm 6.2	6.9	-0.4
	1250	1229.2 \pm 45.2	3.7	-1.7	1255.7 \pm 48.2	3.8	0.5
	6000	6234.6 \pm 199.1	3.2	3.9	6202.7 \pm 349.6	5.6	3.4
PXT	30	32.3 \pm 2.3	7.0	7.8	33.7 \pm 2.2	6.4	12.4
	90	84.3 \pm 3.5	4.2	-6.4	86.8 \pm 5.4	6.2	-3.6
	1250	1218.6 \pm 41.6	3.4	-2.5	1248.6 \pm 47.1	3.8	-0.1
	6000	6170.7 \pm 168.2	2.7	2.8	6148.2 \pm 296.8	4.8	2.5
BUP	6	6.9 \pm 0.3	4.2	14.5	6.8 \pm 0.4	6.3	13.0
	18	17.7 \pm 0.3	1.7	-1.8	18.0 \pm 0.7	3.6	0.1
	250	233.5 \pm 4.9	2.1	-6.6	246.2 \pm 19.7	8.0	-1.5
	1200	1221.6 \pm 35.7	2.9	1.8	1282.1 \pm 72.1	5.6	6.8
OH-BUP	6	6.5 \pm 0.3	4.0	7.8	6.8 \pm 0.3	5.1	14.1
	18	17.1 \pm 0.8	4.8	-5.3	17.1 \pm 0.9	5.0	-5.0
	250	244.5 \pm 10.5	4.3	-2.2	238.2 \pm 15.6	6.6	-4.7
	1200	1206.6 \pm 47.3	3.9	0.5	1248.9 \pm 79.0	6.3	4.1
DM	15	15.8 \pm 0.5	3.1	5.6	16.5 \pm 0.8	4.7	9.7
	45	44.8 \pm 2.4	5.6	-0.5	44.6 \pm 2.0	4.5	-0.8
	625	662.4 \pm 23.5	3.5	6.0	650.4 \pm 34.8	5.4	4.1
	3000	3187.6 \pm 162.0	5.1	6.3	3141.8 \pm 150.0	4.8	4.7
DX (μ g/mL)	0.6	0.6 \pm 0.02	3.0	93.2	0.6 \pm 0.03	5.2	-1.7
	1.8	1.9 \pm 0.1	6.6	2.8	1.8 \pm 0.1	5.3	1.2
	25	27.6 \pm 0.7	2.6	10.2	27.0 \pm 1.1	3.9	7.9
	120	128.4 \pm 3.8	3.0	7.0	126.0 \pm 5.2	4.1	5.0
MDZ	0.3	0.3 \pm 0.02	6.6	11.7	0.4 \pm 0.02	6.4	15.8
	0.9	0.9 \pm 0.05	5.3	-1.9	0.9 \pm 0.06	6.6	-4.9
	12.5	12.3 \pm 0.4	2.9	-1.8	11.9 \pm 0.8	6.5	-5.0
	60	59.9 \pm 2.5	4.2	-0.2	62.5 \pm 3.7	5.9	4.2
α-OH-MDZ	6	6.2 \pm 0.4	6.8	103.5	6.7 \pm 0.5	7.1	11.1
	18	17.6 \pm 1.1	6.4	-2.1	17.0 \pm 1.2	7.3	-5.7
	250	241.5 \pm 11.1	4.6	-3.4	234.8 \pm 14.0	6.0	-6.1
	1200	1203.8 \pm 62.8	5.2	0.3	1240.9 \pm 65.4	5.3	3.4
4-OH-MDZ	6	6.6 \pm 0.6	9.5	10.1	6.9 \pm 0.6	8.2	14.8
	18	17.6 \pm 1.2	6.8	-2.5	17.6 \pm 1.1	6.0	-2.1
	250	239.5 \pm 7.9	3.3	-4.2	237.5 \pm 10.8	4.5	-5.0
	1200	1206.6 \pm 34.6	2.9	0.6	1256.0 \pm 80.1	6.4	4.7

TOL	30	35.2 ± 1.6	4.7	17.2	35.0 ± 1.5	4.1	16.6
	90	89.2 ± 3.5	3.9	-0.9	92.6 ± 5.3	5.7	2.9
	1250	1199.4 ± 46.8	3.9	-4.0	1212.3 ± 46.3	3.8	-3.0
	6000	6023.9 ± 297.2	4.9	0.4	6171.1 ± 310.2	5.0	2.9
OH-TOL	30	33.5 ± 1.1	3.4	11.6	35.0 ± 1.7	4.8	16.7
	90	87.0 ± 4.9	5.6	-3.3	85.8 ± 4.0	4.7	-4.6
	1250	1195.3 ± 48.2	4.0	-4.4	1167.1 ± 65.4	5.6	-6.6
	6000	5957.7 ± 250.1	4.2	-0.7	6208.8 ± 410.6	6.6	3.5
COOH-TOL	30	30.2 ± 1.9	6.4	0.7	35.6 ± 4.6	8.3	11.9
	90	86.2 ± 3.6	4.2	-4.2	85.9 ± 4.6	5.3	-4.6
	1250	1204.7 ± 49.5	4.1	-3.6	1173.3 ± 63.6	5.4	-6.1
	6000	5853.3 ± 229.3	3.9	-2.4	6094.4 ± 371.5	6.1	1.6
CZX	3	3.4 ± 0.1	3.7	13.3	3.3 ± 0.3	7.5	11.8
	9	8.9 ± 0.4	4.7	-1.6	8.9 ± 0.5	5.8	-0.8
	250	244.6 ± 7.8	3.2	-2.1	256.4 ± 11.7	4.5	2.6
	700	717.1 ± 12.0	1.7	2.4	716.3 ± 31.8	4.4	2.3
6-OH-CZX	30	34.2 ± 3.3	9.6	13.9	32.9 ± 3.1	9.4	9.6
	90	91.8 ± 4.1	4.5	2.0	87.7 ± 0.5	7.5	-2.6
	2500	2497.1 ± 73.0	2.9	-0.1	2449.8 ± 11.7	7.0	-2.0
	7000	7051.5 ± 186.6	2.6	0.7	6814.0 ± 31.8	7.9	-2.7

Table 5 – Summary of matrix effect in human plasma for BUP, DM, MDZ, OME, TOL and their metabolites.
Results are expressed as percent nominal \pm SD, n=6.

	Concentration (ng/mL)	%Nominal (mean \pm SD, n=6)					
		Matrice 1	Matrice 2	Matrice 3	Matrice 4	Matrice 5	Matrice 6
BUP	0.5	97.1 \pm 12.9	90.4 \pm 3.9	100.0 \pm 15.4	91.9 \pm 10.5	101.7 \pm 11.7	97.4 \pm 8.4
	300	98.9 \pm 2.1	95.5 \pm 2.5	93.8 \pm 1.3	95.3 \pm 2.0	99.6 \pm 2.8	98.1 \pm 5.4
OH-BUP	1	111.4 \pm 6.0	101.9 \pm 7.5	108.5 \pm 3.9	113.1 \pm 6.2	118.6 \pm 8.9	119.5 \pm 2.5
	600	103.7 \pm 1.3	102.0 \pm 1.0	99.3 \pm 2.1	101.6 \pm 2.4	107.1 \pm 3.4	104.7 \pm 4.1
DM	0.1	110.4 \pm 4.0	109.9 \pm 5.1	106.8 \pm 3.1	112.9 \pm 4.2	108.0 \pm 4.3	107.3 \pm 3.3
	60	105.6 \pm 0.9	103.2 \pm 1.0	101.2 \pm 0.7	103.5 \pm 1.4	104.3 \pm 0.4	102.4 \pm 0.9
DX	0.1	108.8 \pm 4.6	104.3 \pm 5.6	107.6 \pm 3.4	114.2 \pm 5.1	105.5 \pm 5.0	109.8 \pm 4.2
	60	105.0 \pm 1.1	101.0 \pm 1.7	100.1 \pm 1.3	102.7 \pm 1.4	102.8 \pm 1.1	102.5 \pm 1.6
MDZ	0.1	99.9 \pm 1.9	94.5 \pm 1.8	99.5 \pm 2.7	98.9 \pm 5.2	106.4 \pm 2.1	103.8 \pm 3.5
	60	105.2 \pm 1.9	101.7 \pm 2.0	99.3 \pm 1.5	101.2 \pm 1.3	107.2 \pm 1.8	108.3 \pm 2.0
1-OH-MDZ	0.1	105.0 \pm 7.0	104.6 \pm 11.7	110.0 \pm 9.7	99.4 \pm 7.9	116.0 \pm 5.3	110.7 \pm 6.0
	60	104.5 \pm 2.0	101.3 \pm 1.5	98.6 \pm 2.3	100.0 \pm 2.3	106.5 \pm 2.2	106.7 \pm 2.5
4-OH-MDZ	0.1	113.2 \pm 5.1	109.4 \pm 11.0	118.7 \pm 6.2	107.4 \pm 7.4	106.6 \pm 4.3	110.6 \pm 4.5
	60	105.3 \pm 2.2	100.8 \pm 2.3	98.4 \pm 2.2	101.5 \pm 3.1	107.0 \pm 3.7	107.4 \pm 3.4
OME	1	101.1 \pm 1.4	100.7 \pm 3.2	107.2 \pm 2.3	102.3 \pm 3.7	114.6 \pm 3.0	109.9 \pm 2.1
	600	107.5 \pm 1.6	106.2 \pm 0.9	103.5 \pm 1.0	105.3 \pm 1.4	111.8 \pm 1.1	111.6 \pm 1.7
OH-OME	1	110.6 \pm 3.9	107.9 \pm 3.4	115.7 \pm 4.0	111.8 \pm 2.6	114.7 \pm 3.2	117.0 \pm 5.2
	600	106.7 \pm 1.3	105.9 \pm 1.3	103.1 \pm 1.4	105.0 \pm 2.1	111.8 \pm 2.8	111.8 \pm 1.8
DES-OME	1	99.8 \pm 4.2	98.2 \pm 2.5	102.4 \pm 3.7	103.1 \pm 6.5	96.5 \pm 3.6	93.6 \pm 3.0
	600	110.5 \pm 1.0	110.4 \pm 1.5	106.4 \pm 1.5	107.0 \pm 2.1	109.3 \pm 1.3	112.5 \pm 1.1
OME-SULF	1	94.6 \pm 4.5	93.1 \pm 2.7	100.0 \pm 2.4	94.9 \pm 1.2	101.7 \pm 2.4	103.0 \pm 1.5
	600	104.4 \pm 0.8	101.9 \pm 1.7	98.4 \pm 1.4	100.5 \pm 1.1	106.3 \pm 1.4	106.4 \pm 1.1
TOL	50	119.3 \pm 5.2	110.8 \pm 1.9	115.0 \pm 1.5	112.3 \pm 1.2	114.3 \pm 2.5	115.1 \pm 1.2
	30000	100.7 \pm 1.5	96.2 \pm 1.4	96.5 \pm 1.3	99.3 \pm 1.6	97.9 \pm 2.2	99.0 \pm 3.3
OH-TOL	5	101.8 \pm 8.1	98.7 \pm 8.0	104.7 \pm 6.7	99.4 \pm 5.4	107.8 \pm 6.4	106.4 \pm 9.1
	3000	105.4 \pm 2.9	103.8 \pm 1.1	100.6 \pm 2.1	104.2 \pm 2.8	108.1 \pm 4.0	103.3 \pm 9.9
COOH-TOL	5	100.1 \pm 10.2	102.0 \pm 7.2	100.3 \pm 6.6	102.1 \pm 4.4	112.4 \pm 14.1	108.0 \pm 9.8
	3000	104.9 \pm 0.6	101.8 \pm 1.3	98.2 \pm 1.2	101.2 \pm 1.9	105.9 \pm 1.6	104.9 \pm 2.2

Table 6 - Summary of matrix effect in human urine for BUP, DM, MDZ, TOL, CZX and their metabolites. Results are expressed as percent nominal \pm SD, n=6.

	Concentration (ng/mL)	%Nominal (mean \pm SD, n=6)					
		Matrice 1	Matrice 2	Matrice 3	Matrice 4	Matrice 5	Matrice 6
BUP	6	100.1 \pm 5.5	108.4 \pm 3.3	109.9 \pm 4.0	106.0 \pm 2.9	112.1 \pm 4.4	103.7 \pm 2.6
	1200	107.3 \pm 4.1	111.2 \pm 2.5	112.3 \pm 4.0	112.6 \pm 8.3	113.4 \pm 6.2	108.8 \pm 3.5
OH-BUP	6	118.3 \pm 3.9	117.2 \pm 4.1	117.0 \pm 3.9	115.4 \pm 4.0	113.7 \pm 3.6	119.1 \pm 3.5
	1200	110.1 \pm 3.1	88.7 \pm 6.4	101.7 \pm 8.7	101.6 \pm 2.9	105.7 \pm 3.0	106.3 \pm 3.1
DM	15	109.1 \pm 1.3	105.0 \pm 3.5	107.4 \pm 2.8	107.7 \pm 3.1	101.6 \pm 3.3	106.6 \pm 2.5
	3000	107.1 \pm 5.5	104.4 \pm 3.1	105.6 \pm 8.8	106.0 \pm 3.0	102.8 \pm 2.4	105.6 \pm 3.2
DX μ g/ml	0.6	95.6 \pm 3.1	91.7 \pm 4.8	92.7 \pm 3.4	92.9 \pm 2.6	88.8 \pm 4.9	93.3 \pm 2.2
	120	108.4 \pm 5.4	104.9 \pm 3.8	106.7 \pm 9.1	106.7 \pm 2.9	102.6 \pm 2.3	106.6 \pm 2.7
MDZ	0.3	113.3 \pm 4.3	107.5 \pm 6.8	118.5 \pm 11.5	113.8 \pm 10.7	109.5 \pm 6.1	113.7 \pm 8.2
	60	111.9 \pm 3.9	99.0 \pm 2.3	100.7 \pm 8.8	100.6 \pm 4.1	103.2 \pm 2.8	103.8 \pm 4.2
1-OH-MDZ	6	114.1 \pm 6.1	112.9 \pm 6.8	113.2 \pm 4.7	116.5 \pm 4.7	111.8 \pm 7.2	117.0 \pm 3.1
	1200	109.0 \pm 4.6	98.9 \pm 2.4	99.2 \pm 8.4	99.7 \pm 3.8	103.5 \pm 3.9	103.0 \pm 4.4
4-OH-MDZ	6	118.6 \pm 4.9	119.9 \pm 3.3	118.9 \pm 7.3	117.2 \pm 3.7	112.5 \pm 4.2	110.7 \pm 3.4
	1200	114.3 \pm 3.7	98.8 \pm 2.0	103.0 \pm 10.9	106.0 \pm 6.7	107.4 \pm 3.8	108.8 \pm 3.3
TOL	30	117.0 \pm 3.3	112.0 \pm 6.0	115.0 \pm 4.1	113.8 \pm 3.0	109.5 \pm 2.8	114.3 \pm 1.8
	6000	105.9 \pm 6.2	104.7 \pm 2.9	103.2 \pm 9.5	101.9 \pm 3.1	103.8 \pm 2.9	103.1 \pm 2.4
OH-TOL	30	109.1 \pm 8.4	111.4 \pm 2.6	117.2 \pm 4.3	118.9 \pm 2.9	115.2 \pm 5.7	119.4 \pm 1.2
	6000	110.3 \pm 3.7	95.0 \pm 5.1	101.8 \pm 9.1	101.4 \pm 2.8	104.5 \pm 3.4	106.2 \pm 3.0
COOH-TOL	30	117.5 \pm 7.0	114.6 \pm 5.9	118.4 \pm 2.1	118.0 \pm 4.6	111.5 \pm 5.2	118.9 \pm 4.5
	6000	108.4 \pm 3.2	114.0 \pm 2.9	101.2 \pm 8.9	100.3 \pm 1.5	103.2 \pm 2.2	105.0 \pm 2.6
CZX	3	94.9 \pm 6.0	97.1 \pm 9.4	99.5 \pm 10.8	96.2 \pm 5.8	99.6 \pm 7.7	102.5 \pm 8.9
	700	95.1 \pm 3.6	102.3 \pm 5.8	109.2 \pm 4.5	100.2 \pm 2.5	98.5 \pm 1.8	102.8 \pm 3.3
OH-CZX	30	93.0 \pm 6.7	96.7 \pm 6.3	101.1 \pm 17.1	100.5 \pm 9.7	101.8 \pm 17.8	106.1 \pm 10.6
	7000	99.4 \pm 7.1	99.0 \pm 5.0	108.5 \pm 5.0	100.4 \pm 4.3	98.2 \pm 3.1	106.7 \pm 3.0

Table 7 – Freeze and thaw (4 cycles), short-term (24 h) and long-term (40 days) stability results for CAF, BUP, DM, MDZ, OME, TOL and their metabolites in human plasma. Results are expressed as percent nominal \pm SD, n=6.

	Concentration (ng/mL)	Freeze/Thaw (4 cycles) %Nominal (mean \pm SD, n=6)	Short-term (24h) %Nominal (mean \pm SD, n=6)	Long-term (40 days) %Nominal (mean \pm SD, n=6)
CAF	30.00	93.9 \pm 1.6	97.8 \pm 5.1	92.5 \pm 4.4
	1250.00	96.3 \pm 2.7	111.4 \pm 1.3	87.2 \pm 4.5
	6000.00	95.9 \pm 2.2	107.0 \pm 4.6	89.5 \pm 3.9
PXT	30.00	92.6 \pm 2.8	99.0 \pm 5.7	98.8 \pm 8.2
	1250.00	92.8 \pm 4.2	113.5 \pm 1.0	101.2 \pm 7.7
	6000.00	96.3 \pm 2.1	107.2 \pm 5.2	96.9 \pm 2.1
BUP	1	93.9 \pm 3.3	86.7 \pm 1.9	100.7 \pm 6.0
	62.5	96.9 \pm 2.0	90.6 \pm 1.3	95.7 \pm 3.8
	300	99.6 \pm 0.9	93.7 \pm 1.2	103.7 \pm 1.6
OH-BUP	3	98.9 \pm 2.9	91.2 \pm 2.5	111.4 \pm 5.3
	125	106.0 \pm 1.8	90.8 \pm 1.7	97.3 \pm 4.5
	600.00	107.3 \pm 2.3	95.3 \pm 1.6	104.0 \pm 4.5
DM	0.3	85.3 \pm 3.7	86.3 \pm 1.4	106.6 \pm 9.4
	12.5	99.7 \pm 1.6	91.7 \pm 1.0	94.4 \pm 5.6
	60	101.1 \pm 1.0	94.4 \pm 1.7	98.0 \pm 2.4
DX	0.3	94.3 \pm 1.1	91.4 \pm 2.5	95.6 \pm 5.7
	12.5	93.6 \pm 1.9	94.5 \pm 1.4	97.4 \pm 10.4
	60.00	94.9 \pm 1.4	95.9 \pm 2.0	97.7 \pm 4.2
MDZ	0.3	94.5 \pm 1.1	88.4 \pm 1.8	104.4 \pm 7.7
	12.5	100.4 \pm 1.5	91.8 \pm 1.4	94.4 \pm 4.3
	60	97.4 \pm 1.1	96.2 \pm 2.1	102.4 \pm 2.6
1-OH-MDZ	0.3	88.8 \pm 5.2	94.8 \pm 3.8	103.1 \pm 9.6
	12.5	95.5 \pm 1.5	87.7 \pm 1.2	93.5 \pm 5.6
	600.00	96.1 \pm 0.3	94.3 \pm 1.5	104.0 \pm 3.4
4-OH-MDZ	0.3	91.4 \pm 5.0	95.9 \pm 7.2	112.5 \pm 7.6
	12.5	98.7 \pm 2.3	92.1 \pm 1.5	96.0 \pm 4.6
	600.00	97.2 \pm 2.2	97.0 \pm 2.5	104.3 \pm 3.3
OME	3	86.0 \pm 2.3	91.7 \pm 1.6	94.3 \pm 7.4
	125	99.6 \pm 0.8	103.0 \pm 1.0	110.9 \pm 6.0
	600	95.9 \pm 0.5	103.5 \pm 1.8	114.0 \pm 3.8
OH-OME	3	86.9 \pm 0.9	92.6 \pm 2.6	107.4 \pm 5.9
	125	97.9 \pm 1.0	103.2 \pm 1.6	114.0 \pm 5.9
	600.00	92.3 \pm 1.2	105.3 \pm 1.7	113.6 \pm 1.2
Des-OME	3.00	96.0 \pm 3.7	93.7 \pm 2.2	98.7 \pm 10.4
	125.00	109.9 \pm 1.5	103.6 \pm 1.0	102.8 \pm 5.3
	600.00	105.1 \pm 2.1	107.3 \pm 1.9	113.2 \pm 3.2
OME-SULF	3.00	94.0 \pm 1.2	90.4 \pm 1.8	98.6 \pm 2.9
	125.00	113.6 \pm 2.0	95.3 \pm 0.5	102.1 \pm 4.5
	600.00	109.4 \pm 1.1	95.7 \pm 1.5	108.1 \pm 6.3
TOL	150	93.9 \pm 2.0	93.7 \pm 1.8	98.3 \pm 5.0
	6250	94.1 \pm 2.1	92.0 \pm 1.5	92.3 \pm 3.8
	30000	94.9 \pm 2.5	96.8 \pm 1.8	99.7 \pm 1.4
OH-TOL	15	96.8 \pm 4.9	90.9 \pm 3.8	100.0 \pm 4.7
	625	105.3 \pm 1.1	91.9 \pm 1.5	98.6 \pm 4.7
	3000.00	110.0 \pm 1.1	96.4 \pm 1.9	106.2 \pm 2.1
COOH-TOL	15.00	89.0 \pm 10.6	91.0 \pm 3.6	100.8 \pm 5.9
	625.00	102.2 \pm 4.9	88.7 \pm 1.4	95.9 \pm 6.1
	3000.00	102.1 \pm 8.2	95.0 \pm 1.7	104.9 \pm 2.4

Table 8 – Freeze and thaw (4 cycles), short-term (24 h) and long-term (40 days) stability results for CAF, BUP, DM, MDZ, TOL, CZX and their metabolites in human urine. Results are expressed as percent nominal \pm SD, n=6.

	Concentration (ng/mL)	Freeze/Thaw (4 cycles) %Nominal (mean \pm SD, n=6)	Short-term (24h) %Nominal (mean \pm SD, n=6)	Long-term (40 days) %Nominal (mean \pm SD, n=6)
CAF	90	100.2 \pm 5.0	100.5 \pm 5.1	98.0 \pm 9.8
	1250	96.0 \pm 4.6	99.2 \pm 2.5	93.1 \pm 12.0
	6000	96.0 \pm 2.8	101.4 \pm 3.6	105.5 \pm 6.6
PXT	90	97.1 \pm 4.8	94.4 \pm 7.0	99.5 \pm 3.7
	1250	106.8 \pm 5.8	109.7 \pm 2.4	103.5 \pm 1.6
	6000.00	99.6 \pm 3.5	105.6 \pm 3.2	102.7 \pm 2.4
BUP	18	105.1 \pm 5.0	96.4 \pm 7.1	93.6 \pm 2.5
	250	96.5 \pm 5.1	102.2 \pm 4.7	101.2 \pm 1.7
	1200	111.2 \pm 4.8	104.7 \pm 7.1	110.8 \pm 2.7
OH-BUP	18	97.5 \pm 6.3	90.4 \pm 6.2	97.0 \pm 4.6
	250	95.4 \pm 4.7	99.0 \pm 3.3	98.9 \pm 1.1
	1200.00	99.3 \pm 2.4	106.1 \pm 4.3	109.5 \pm 2.0
MDZ	0.9	93.7 \pm 5.4	94.0 \pm 6.8	95.9 \pm 7.4
	12.5	95.9 \pm 4.2	98.2 \pm 2.9	92.2 \pm 2.2
	60	99.8 \pm 2.1	106.3 \pm 3.9	99.4 \pm 1.5
1-OH-MDZ	18	94.0 \pm 4.6	97.1 \pm 7.7	92.2 \pm 6.7
	250	95.6 \pm 3.7	96.1 \pm 4.0	92.7 \pm 2.5
	1200.00	98.0 \pm 2.2	103.6 \pm 3.4	106.7 \pm 4.4
4-OH-MDZ	18.00	99.5 \pm 5.0	95.5 \pm 7.6	90.4 \pm 2.2
	250.00	99.8 \pm 5.6	93.2 \pm 3.3	85.6 \pm 0.1
	1200.00	101.2 \pm 2.1	99.2 \pm 4.7	91.1 \pm 1.1
DM	45	99.5 \pm 5.1	98.1 \pm 6.5	96.3 \pm 3.5
	625	102.0 \pm 3.7	104.4 \pm 2.2	102.1 \pm 3.3
	3000	98.7 \pm 2.7	104.4 \pm 5.8	103.2 \pm 2.5
DX	1.8	99.1 \pm 5.4	98.2 \pm 7.6	102.1 \pm 3.7
	25	105.9 \pm 5.9	108.0 \pm 2.3	106.0 \pm 3.7
	120.00	99.3 \pm 2.8	106.4 \pm 4.4	103.5 \pm 2.4
TOL	90	101.0 \pm 6.7	103.4 \pm 8.7	103.9 \pm 5.2
	1250	97.9 \pm 5.8	100.9 \pm 2.7	98.3 \pm 2.4
	6000	98.7 \pm 2.7	104.7 \pm 4.9	102.7 \pm 3.5
OH-TOL	15	96.9 \pm 5.4	88.8 \pm 5.5	94.4 \pm 2.7
	625	96.4 \pm 5.4	98.8 \pm 3.9	100.0 \pm 2.0
	3000.00	99.4 \pm 2.9	106.8 \pm 5.1	109.4 \pm 1.8
COOH-TOL	15.00	97.7 \pm 5.6	92.6 \pm 9.2	96.0 \pm 3.2
	625.00	97.6 \pm 4.8	98.6 \pm 1.6	95.7 \pm 1.8
	3000.00	98.3 \pm 2.5	104.9 \pm 3.4	105.2 \pm 1.4
CZX	9	105.3 \pm 3.5	101.4 \pm 5.8	87.5 \pm 2.4
	250	96.6 \pm 3.5	100.6 \pm 5.5	93.8 \pm 3.5
	700	104.9 \pm 3.8	104.4 \pm 5.2	98.1 \pm 1.8
6-OH-CZX	90	94.7 \pm 9.0	99.5 \pm 7.1	86.0 \pm 0.5
	2500	90.8 \pm 5.9	86.0 \pm 7.7	89.7 \pm 3.7
	7000.00	94.7 \pm 6.0	92.1 \pm 3.8	95.4 \pm 2.2

2.1.4. Discussion et conclusion

Les méthodes analytiques développées ci-dessus ont été validées en respectant les critères de spécificité, sensibilité, linéarité, précision et justesse requis pour la validation de méthodes bioanalytiques par la FDA. L'objectif principal étant d'appliquer ces méthodes analytiques à un projet clinique, nous les avons appliquées à une étude clinique visant à évaluer les effets du diabète de type 2 sur l'activité des isoenzymes des CYP450s. Ces méthodes ont permis de mesurer sensiblement et spécifiquement les différents substrats marqueurs et leurs métabolites et de déterminer avec succès les activités des CYP450s chez des volontaires sains et des patients diabétiques de type 2.

De par le nombre important de substrats marqueurs et métabolites, pour étudier l'activité des isoenzymes des CYP450s, et de leurs caractéristiques physico-chimiques très diverses, nous avons rencontré de nombreuses difficultés dans le développement et la validation des méthodes analytiques.

La méthode a premièrement été développée dans le plasma. Au vu des caractéristiques physicochimiques différentes des composés, trois méthodes analytiques ont été développées, soit une pour CAF, une pour TOL/BUP/CZX et une pour OME/DM/MDZ. La méthode utilisée pour BUP/TOL/CZX a été testée et optimisée pour OME/DM/MDZ mais les solutés étaient trop retenus d'où des pics chromatographiques larges et des temps de rétention longs.

Nous avons commencé par développer la méthode pour OME, DM, MDZ et BUP mais nous avons rencontré des problèmes au niveau de la détection des LLOQ des composés. Nous avons souhaité améliorer la détection aux basses concentrations en faisant une étape de re-concentration de l'échantillon, en évaporant au bain marie et sous azote l'échantillon puis en le reconstituant dans un solvant. Cela nous a permis d'améliorer la détection pour tous les analytes excepté pour le BUP qui avait une variabilité trop importante aux basses concentrations. Nous avons ensuite testé différents solvants (acétonitrile, méthanol, acétone, eau) pour précipiter les protéines et pour reconstituer l'échantillon. L'utilisation de 100% méthanol pour la précipitation des protéines et 25:75 (v/v) méthanol-eau pour la reconstitution de l'échantillon donnait les meilleures réponses chromatographiques. Également, certains analytes, comme le DM et le DX, n'étaient pas stables lors de l'utilisation d'autres solvants. La variabilité de la réponse de BUP étant toujours trop importante, nous avons ajouté du HCl pour acidifier l'échantillon. Cela a

permis une légère amélioration de la variabilité de sa réponse mais les analytes tels que OME et certains de ses métabolites n'étaient plus du tout observables à pH acide. Après différents tests et recherches bibliographiques, nous nous sommes aperçus que le BUP n'était pas stable à haute température et que la variabilité importante aux basses concentrations était due à une instabilité lors de l'évaporation de l'échantillon à 40 °C. Nous avons donc choisi de séparer l'analyse de BUP des autres composés et de l'analyser avec la même méthode analytique que TOL et CZX. Nous avons ensuite eu des problèmes de contamination croisée pour TOL et son standard interne. Le TOL et TOL-d9 ont le même ion fille donc lors de l'analyse du TOL puis du TOL-d9, le voltage appliqué à la cellule de collision n'étant pas assez important pour expulser l'ion fille, certains ions filles demeuraient dans la chambre d'ionisation. Ainsi, lors de l'analyse du TOL-d9, à la suite de l'analyse du TOL, les ions expulsés de la cellule de collision comprenaient également les ions filles de TOL qui n'avaient pas été expulsés. Conséquemment, lorsque nous analysions les pics du TOL-d9, les valeurs des aires du pic chromatographique n'étaient pas constantes et augmentaient considérablement. Cette situation était d'autant plus critique lors de l'analyse des plus hautes concentrations, car encore plus d'ions filles du TOL n'étaient pas expulsés et se retrouvaient analysés avec le TOL-d9.

Lors des études de stabilité à court terme, le BUP n'était pas stable plus de 3 h à température ambiante, nous avons donc dû développer toutes les méthodes d'analyse à 4 °C étant donné que dans les échantillons cliniques tous les analytes sont contenus dans un même échantillon.

Pour CAF, les mêmes conditions chromatographiques que pour TOL, CZX et BUP sont utilisées mais avec un gradient de phase mobile car le pic chromatographique était trop large en situation isocratique.

Nous avons ensuite souhaité valider les mêmes méthodes dans l'urine. Certains métabolites résultant d'une biotransformation de phase I deviennent substrats d'une réaction de phase II et principalement par la voie métabolique appelée glucuronidation. Cette étape de déconjugaison enzymatique des métabolites glucuronidés dans l'urine est nécessaire pour pouvoir analyser le métabolite de phase I préalablement formé. Nous utilisons pour cela, l'enzyme β -glucuronidase qui est active à 37 °C et que nous incubons pendant une période de 16 h. Chaque échantillon est analysé avec et sans incubation de la β -glucuronidase. Cette étape a cependant entraîné une limitation pour le BUP qui n'est analysé que sans incubation dû à son instabilité à 40 °C. Également, des tests *in vitro* avec OME à différents pH ont montré qu'il n'était pas stable à pH

acide. Cela a été confirmé avec les premiers tests *in vivo*, où l'OME est davantage dégradé quand le pH urinaire des patients est plus acide. La dégradation d'OME et les variations interindividuelles du pH urinaire ne permettent pas une quantification précise de ce composé et de ses métabolites dans l'urine.

Les premiers tests *in vivo* ont été réalisés chez des patients diabétiques de type II et chez des volontaires sains. Pour certains composés, comme CZX, les concentrations observées étaient plus élevées que les concentrations de la courbe de calibration qui avait été développées. Ainsi, des facteurs de dilution pour ces composés ont dû être validés.

Dans l'ensemble, les différentes problématiques observées et soulevés lors des processus de développement et de validation ont été considérées et des ajustements ont été apportés afin de les éliminer ou les minimiser. Ces différents obstacles ont mené au développement de trois méthodes analytiques très sensibles et très spécifiques pour chaque substrat marqueur et leurs métabolites, permettant une analyse et une évaluation précise des composés et du phénotype des isoenzymes des CYP450s.

2.2. Développement d'une méthode LC-HRMS hautement spécifique pour la détermination de l'expression de 14 CYP450s humains.

2.2.1. Objectif de l'étude

Ce deuxième projet est la première partie d'un projet de recherche visant à caractériser et à quantifier 14 isoenzymes des CYP450s (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5, 3A7 et 4F2) dans les trois sections de l'intestin grêle, soit le duodénum, le jéjunum et l'iléon. L'objectif spécifique de mon projet est de sélectionner des peptides spécifiques à chaque isoenzyme, d'optimiser une méthode de digestion trypsique *in vitro* et de développer une méthode analytique quantitative par spectrométrie de masse permettant l'identification et la quantification absolue et différentielle de 14 isoformes des CYP450s. Dans le cadre de ma recherche, ce projet se veut une étape d'initiation aux méthodes analytiques appliquées à la quantification protéiques des CYP450s.

2.2.2. Introduction

La variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments peut être attribuée à de nombreux facteurs comme l'âge, le sexe, l'environnement, des comorbidités, la co-médication, l'alimentation et des variations génétiques. Le foie exprime des niveaux élevés de CYP450s et constitue l'organe majeur impliqué dans le métabolisme des médicaments. Environ 70% des médicaments utilisés en clinique sont administrés par la voie orale, et la première barrière anatomique à l'entrée de ces médicaments dans la circulation systémique est la barrière intestinale. Des études ont montré que des enzymes de métabolisme dont les CYP450s seraient présents dans l'intestin grêle. Cependant ces études se basent sur les niveaux d'ARNm et les activités de métabolisme obtenues dans les différentes sections de l'intestin grêle non normalisées et variables selon les études. Ces résultats sont ainsi inconsistants et ne permettent qu'une analyse qualitative des protéines.

L'hypothèse faite est que, en plus des CYP450s hépatiques, les CYP450s exprimés dans l'intestin peuvent contribuer au métabolisme des médicaments et ainsi contribuer à la variabilité dans la biodisponibilité, et dans les concentrations plasmatiques atteintes des médicaments. Les

enzymes de métabolisme des CYP450s, retrouvées tout au long de l'intestin grêle pourraient donc affecter significativement l'effet de premier passage des médicaments administrés par voie orale et influencer leurs effets pharmacologiques et/ou toxiques. Par conséquent, les variations inter- et intra-individuelles dans l'expression de ces protéines pourraient expliquer en partie la variabilité observée dans la pharmacocinétique de certains médicaments.

Dans ce projet de recherche, nous nous intéressons à 14 isoenzymes des CYP450s soit les 13 isoenzymes les plus cliniquement importantes et abondantes dans le corps humain, les CYP1A1, 1A2, 1B1, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5 et 3A7 ainsi qu'à l'isoenzyme CYP4F2 qui serait fortement exprimée dans le foie mais également dans l'intestin [38]. Peu d'études de métabolisme et de quantification absolue ont été réalisées pour le CYP4F2, mais des évidences suggèrent que cette isoenzyme pourrait avoir un rôle majeur dans le métabolisme de composés endogènes et de quelques xénobiotiques [127-130]. La première étape de ce projet est d'identifier un peptide protéotypique spécifique à chaque isoenzyme afin de pouvoir synthétiser les peptides et leurs standards internes stables isotopiquement marqués. Ces peptides seront identifiés par digestion *in silico* et digestion *in vitro*. Toutes les étapes de digestion trypsique *in vitro* sont optimisées afin de définir une méthode de digestion optimale et uniforme pour toutes les isoenzymes des CYP450s d'intérêts. Les peptides synthétisés seront par la suite utilisés pour développer et valider une méthode analytique par LC-HRMS afin de pouvoir quantifier les protéines d'intérêts dans l'intestin grêle mais également dans tous organes du corps humain.

2.2.3. Matériels et méthodes

2.2.3.1. Produits chimiques et réactifs

Les protéines recombinantes, les microsomes de foies humains (HLM) et les microsomes intestinaux humains (HIM) ont été achetés chez BD Biosciences (Woburn, MA, USA). L'eau de grade LC-MS a été achetée chez EMD Milipore (Billerica, MA, USA). L'acétonitrile de grade LC-MS, la trypsine, le dithiothréitol (DTT), le potassium phosphate, le Tris et l'ammonium bicarbonate (ABC) ont été achetés chez Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). L'acide formique, l'albumine sérique humaine (HSA), l'iodoacétamide (IAA) et l'acide trifluoacétique (TFA) ont été achetés chez Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Les peptides

protéotypiques et les standards internes stables marqués isotopiquement ont été synthétisés par New England Peptide (Boston, MA, USA).

2.2.3.2. Identification des peptides protéotypiques

La quantification absolue (AQUA) de protéines par LC-HRMS ne s'effectue pas sur la protéine entière et requiert la sélection de peptides protéotypiques spécifiques à la protéine d'intérêt. Les peptides protéotypiques sont obtenus suivant l'action d'une enzyme de digestion, la trypsine. Une première digestion tryptique *in silico* va permettre de sélectionner plusieurs peptides protéotypique théoriques pour chaque isoenzyme. Ensuite, chacune des étapes de la digestion tryptique doit être optimisée afin de sélectionner, par digestions *in vitro*, le peptide ayant le meilleur profil afin de permettre une quantification spécifique et sensible de la protéine d'intérêt. La digestion *in silico* permet de déterminer tous les peptides pouvant être théoriquement obtenus par digestion tryptique pour une protéine d'intérêt. La base de données UniProtKB/Swiss-Prot a été utilisée pour déterminer les séquences d'acides aminés de chaque CYP450 d'intérêt. Tous les peptides pouvant être observés par digestion tryptique ont été générés à l'aide du logiciel mMass en rentrant la séquence d'acides aminés de chaque protéine. Puis, les peptides protéotypiques *in silico* sont sélectionnés en fonction de critères spécifiques comme la taille de leurs séquences, les polymorphismes, les acides aminés instables, les clivages manqués par la trypsine et la spécificité du peptide.

Les peptides sélectionnés théoriquement sont ensuite analysés par digestions *in vitro* en utilisant des cytochromes recombinants purifiés. Succinctement, les étapes de digestion tryptique sont les suivantes : 25 µg de protéines recombinantes totales sont diluées en duplicata dans un tampon, puis les protéines sont réduites et alkylées par le DTT et le IAA, respectivement. Les protéines sont ensuite digérées par la trypsine à 37 °C et à un pH se situant entre 7,5 et 8,5. Les standards internes stables isotopiquement marqués n'étant pas synthétisés avant l'optimisation de la méthode de digestion, un peptide non humain dilué dans du 0,1% TFA dans l'eau est rajouté après la digestion pour éliminer toutes sources de variabilité qui seraient dues à l'injection par l'appareil.

Après avoir optimisé la méthode de digestion, chaque isoenzyme recombinante est digérée afin de sélectionner les peptides ayant une saturation de la réponse enzymatique. Ensuite, les peptides protéotypiques sont départagés selon trois critères qui sont les suivants : les peptides

ayant des acides aminés avec modifications post-traductionnelles (MPT), les peptides ayant une succession d'acides aminés arginine et lysine en C-terminal et finalement, les peptides ayant une proportion de clivage manqué trop importante. Ce dernier paramètre a été déterminé à l'aide du logiciel informatique Proteome Discoverer™.

Les critères de sélection détaillés ci-dessus permettent ainsi de sélectionner un peptide protéotypique et spécifique à chaque isoenzyme des CYP450s.

2.2.3.3. Solution stock et courbe de calibration

Les solutions stock de tous les peptides protéotypiques et de leurs standards internes synthétisés sont préparées dans du 0,1% TFA dans l'eau à 1 mg/mL et 0,2 mg/mL, respectivement. Étant donné qu'il n'existe pas de blanc de microsomes à utiliser comme matrice, une solution de 1 mg/mL de HSA digérée est utilisée afin de représenter au mieux la complexité des échantillons biologiques et les quantités de protéines qui pourraient être retrouvées dans les microsomes humains et qui pourraient interférer avec les analyses. Une solution stock contenant tous les peptides est préparée à 25 µM puis diluée dans du 0,1% TFA dans l'eau pour obtenir une série de 5 solutions à différentes concentrations. Pour les standards de calibration et les contrôles qualités, 1 mg/mL de HSA digérée est fortifiée avec les solutions contenant tous les peptides, pour obtenir la gamme de concentrations suivante : 0,25; 0,5; 1; 2,5; 100; 200 nM. Une solution stock contenant tous les standards internes stables marqués isotopiquement est préparée dans du 0.1%TFA dans l'eau à 100 nM et est ajoutée aux échantillons.

2.2.3.4. Conditions chromatographiques et spectromètre de masse

Les analyses LC-HRMS sont réalisées avec un système UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) Ultimate 3000 XRS couplé à un spectromètre de masse hybride quadripôle-orbitrap Q exactive de chez Thermo Scientific (San José, CA, USA). Les deux propriétés « quadripôle » et « orbitrap » du spectromètre de masse permettent de quantifier les peptides par MS1 (MS simple) selon leur masse à ± 5 ppm mais également par MS2 (MS en tandem) pour confirmer l'analyse du peptide d'intérêt grâce à son profil de fragmentation.

La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne Biobasic-8 (5 µ, 100 x 2.1 mm) de Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA) chauffée à 40 °C et un gradient de phase

mobile composé de 0.1% acide formique dans l'acétonitrile (solvant A) et 0.1% acide formique dans l'eau (solvant B). Le gradient est comme suit : 5% de solvant A pendant 1 min, gradient linéaire de 5-40% de solvant A pendant 19 min, 40% de solvant A pendant 1 min puis 5% de solvant A pendant 9 min.

Le spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation par électro nébulisation (HESI) qui opère en mode positif avec les paramètres de source suivants : voltage de l'électrode à 3500 V, température de vaporisation à 400 °C et température du capillaire à 350 °C. Le nitrogène est utilisé pour les gaz « sheath », « auxiliary » et « sweep » et sont fixés à 35, 30 et 2 en unités arbitraires. Les masses M , les états de charges z et les masses exactes de l'ion précurseur $[M+zH]^{z+}$ pour chaque peptide protéotypique et son standard interne sont déterminés avec le spectromètre de masse.

2.2.4. Résultats

2.2.4.1. Sélection des peptides protéotypiques par digestion enzymatique *in silico*

Un exemple de la méthode employée pour la sélection des peptides *in silico* est présenté ci-dessous pour le peptide CYP2C9.

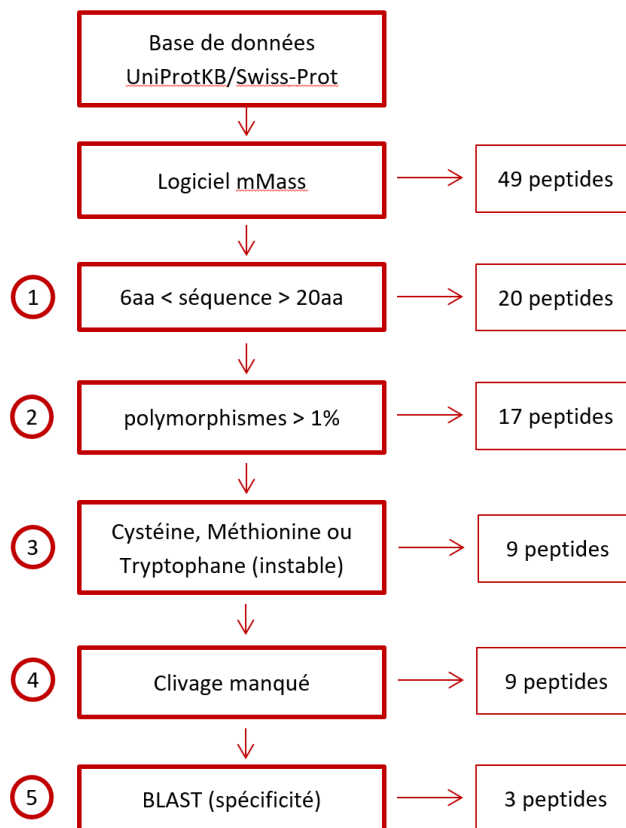


Figure 13 : Méthode détaillée pour sélectionner par digestion *in silico* les peptides spécifiques à l'isoenzyme CYP2C9.

Cette méthode a été appliquée pour chacune des 14 isoenzymes des CYP450s d'intérêt. Pour certaines isoenzymes comme le CYP3A4, seulement deux peptides pouvaient être sélectionnés avec les 5 premiers critères de sélection *in silico*, tandis que pour certaines isoenzyme comme le CYP1A1, 2B6 et 2D6, 7 peptides pouvaient être sélectionnés. Ainsi, deux critères supplémentaires ont été appliqués pour les isoenzymes ayant plus de 2 peptides possibles afin de les départager. Les peptides ayant des acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine pouvant subir des modifications post-traductionnelles et/ou les peptides ayant une succession d'acides aminés arginine ou lysine en C-terminal (site de clivage) pouvant influencer l'efficacité de l'hydrolyse, n'ont pas été sélectionnés. Ces paramètres sont moins importants comparativement aux autres, dû au fait que les modifications post-traductionnelles ne seront présentes que sur une petite proportion de la protéine et il sera donc possible de la détecter spécifiquement. Il est cependant possible qu'on observe une variabilité dans la quantité de protéines mesurées plus importante comparativement aux peptides n'ayant pas d'acides aminés pouvant subir des

modifications post traductionnelles. C'est également le cas pour les peptides ayant une succession de sites de clivage en C-terminal, la variabilité dans la réponse observée pourra être plus importante mais il sera toujours possible de la détecter en partie et spécifiquement.

Après cette première étape de digestion trypsique *in silico*, 2 à 7 peptides protéotypiques ont été sélectionnés pour chaque isoenzyme.

Table 2 : Nombre de peptides protéotypiques obtenus par digestion *in silico* pour 14 isoenzymes des CYP450s.

CYP450	Nombre de peptides après digestion <i>in silico</i>	CYP450	Nombre de peptides après digestion <i>in silico</i>
CYP1A1	7	CYP2D6	7
CYP1A2	4	CYP2E1	6
CYP1B1	6	CYP2J2	6
CYP2B6	7	CYP3A4	2
CYP2C8	4	CYP3A5	4
CYP2C9	3	CYP3A7	3
CYP2C19	4	CYP4F2	4

2.2.4.2. Optimisation de la méthode de digestion *in vitro*

Afin d'optimiser la méthode de digestion, un peptide non humain a été rajouté après la digestion trypsique comme standard interne. Les peptides formés sont ensuite analysés par LC-HRMS, et les ratios $\frac{\text{Aire du pic du peptide protéotypique}}{\text{Aire du peptide non humain}}$ sont mesurés afin de déterminer les pourcentages d'intensité relative au contrôle.

Afin de réaliser la deuxième sélection des peptides par la méthode de digestion *in vitro*, toutes les étapes de digestion ont dû être optimisées. Cinq différents tests d'optimisation ont été réalisés :

- Optimisation des tampons de dilution
- Optimisation des conditions d'incubation du DTT
- Optimisation des quantités de DTT et d'IAA
- Optimisation des quantités de trypsine
- Optimisation du temps d'incubation de la trypsine

Les différents tests de digestions ont été optimisés pour notre projet de recherche à partir de méthodes trouvées dans la littérature.

a) Optimisation des tampons de dilution

Initialement, on ajoutait 40 μ L d'ammonium bicarbonate (50 mM, pH 7,8) à l'échantillon à digérer afin que le pH se situe entre 7,5 et 8,5; pH auquel la trypsine a une activité optimale. Également, les protéines recombinantes étaient diluées à 0.25 mg/mL (25 μ g) dans les tampons utilisés par BD Biosciences pour les préparer soit dans du potassium phosphate (100 mM, pH 7,4) ou soit du TRIS (100 mM, pH 7,5). Les premiers résultats ont montré que pour l'isoenzyme CYP2C9 préparée dans du TRIS, les peptides protéotypiques étaient soit non observables ou soit très faiblement observables par LC-HRMS, tandis que pour les isoformes préparées dans du potassium phosphate, tous les peptides protéotypiques pouvaient être analysés. On a ainsi voulu déterminer l'impact de trois tampons de dilution, soit le potassium phosphate, le TRIS et l'ammonium bicarbonate sur la réponse observée par LC-HRMS des peptides de trois isoformes des CYP450s : les CYP1B1, 2J2 et 2C9.

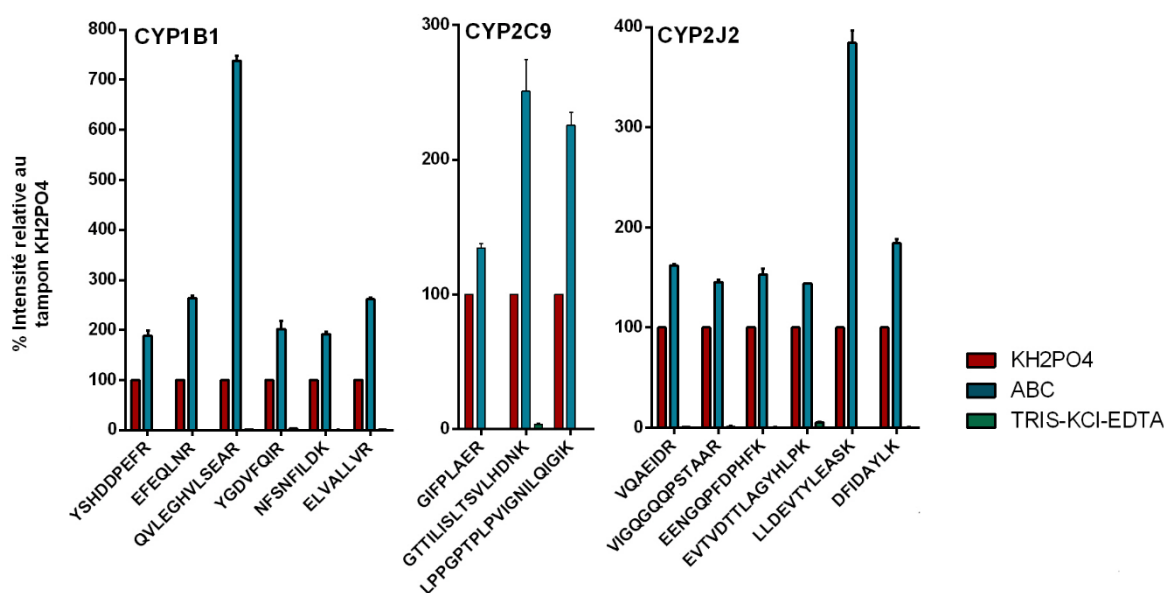


Figure 14 : Optimisation des tampons de dilution des isoenzymes recombinantes CYP1B1, 2C9 et 2J2 (N=2).

La Figure 14 représente le pourcentage d'intensité relative au tampon potassium phosphate, des pics chromatographiques de chaque peptide obtenus avec différents tampons. Ces résultats

montrent que pour chacun des peptides protéotypiques, l'intensité des pics observée par LC-HRMS semble optimale quand les isoenzymes recombinantes sont diluées à 1 mg/mL dans un tampon d'ammonium bicarbonate. A l'inverse, lorsque diluées dans un tampon TRIS, la majorité des peptides ne sont plus observables.

b) Optimisation des conditions d'incubation du DTT

Le DTT est ajouté avant la réaction de digestion trypsique afin de réduire les ponts disulfures formés entre les atomes de soufre des fonctions thiols de deux cystéines de la protéine. Différents temps d'incubation et températures d'incubation du DTT ont été testés avec les isoenzymes recombinantes CYP1B1 et 2J2, comme illustrés sur la Figure 15.

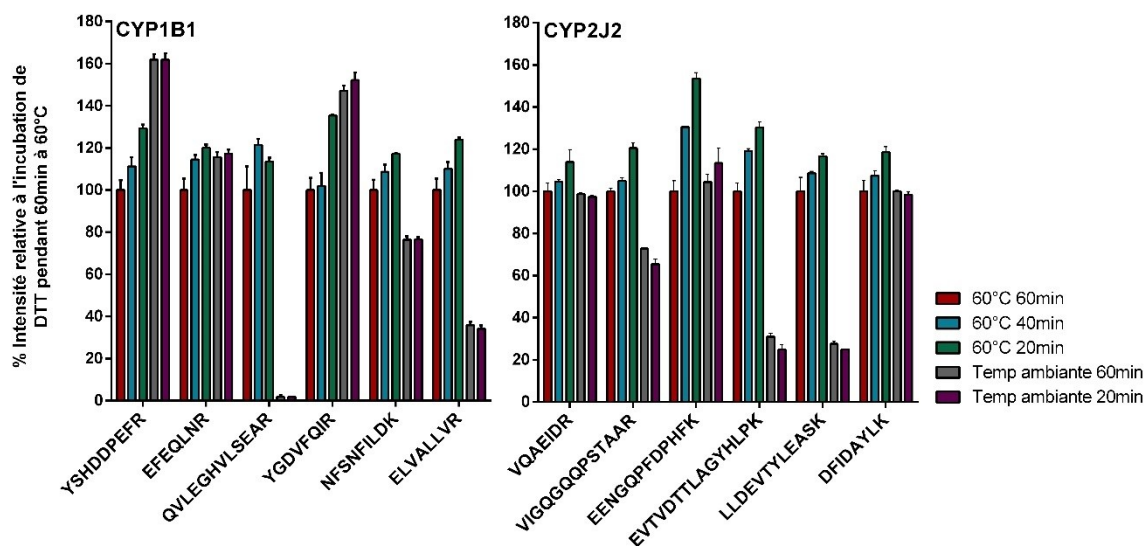


Figure 15 : Optimisation des conditions d'incubation du DTT avec les isoenzymes recombinantes CYP1B1, et 2J2 (N=2).

La Figure 15 représente le pourcentage d'intensité relative à l'incubation du DTT pendant 60 min à 60 °C, des pics chromatographiques de chaque peptide obtenus lors de l'incubation du DTT sous différentes conditions. Ces résultats montrent que l'incubation du DTT pendant 20 min à 60 °C semble être la condition d'incubation pour laquelle l'intensité observée des pics par LC-HRMS est optimale et ceci semble être constant pour tous les peptides des deux isoenzymes recombinantes.

c) Optimisation des quantités de DTT et d'IAA

L'IAA est ajouté après le DTT afin de bloquer les fonctions thiols libres et pour empêcher que les ponts disulfures se reforment. L'IAA a une activité optimale à 37 °C pendant 15 min et c'est un composé très sensible à la lumière. Il est ainsi incubé dans le noir à 37 °C pendant 15 min. Différentes quantités de DTT et d'IAA ont été testées, comme illustré sur la Figure 16, avec les isoenzymes recombinantes CYP2C8 et 2C19.

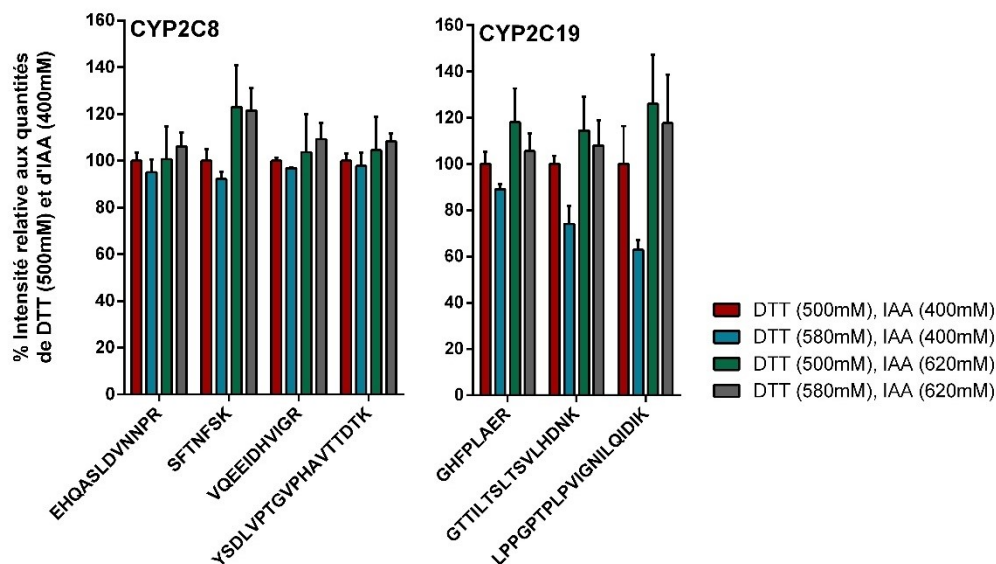


Figure 16 : Optimisation des quantités de DTT et d'IAA avec les isoenzymes recombinantes CYP2C8 et 2C19 (N=2).

La Figure 16 représente le pourcentage d'intensité relative à l'incubation de 500 mM de DTT et 400 mM d'IAA, des pics chromatographiques de chaque peptide obtenus lors de l'incubation de différentes quantités de DTT et d'IAA. Ces résultats montrent que pour la majorité des peptides pour ces deux isoenzymes recombinantes, l'augmentation des concentrations de DTT et d'IAA n'influe pas sur l'intensité des pics obtenus en LC-HRMS et donc, n'influence pas la quantité observée de peptides. L'incubation de 500 mM de DTT et 400 mM d'IAA semble optimale.

d) Optimisation des quantités de trypsine

La trypsine est utilisée comme enzyme de digestion afin de cliver les protéines spécifiquement en C-terminale des acides aminés arginine. Elle est généralement ajoutée à un ratio trypsine:protéine entre 1:20 et 1:100 et a une activité optimale à des valeurs de pH 7,5-8,5 et à 37 °C. Pour optimiser ce paramètre, la trypsine a été incubée pendant 16 h à pH 7,8 et à 37 °C avec les isoenzymes recombinantes CYP2C8 et 2C19.

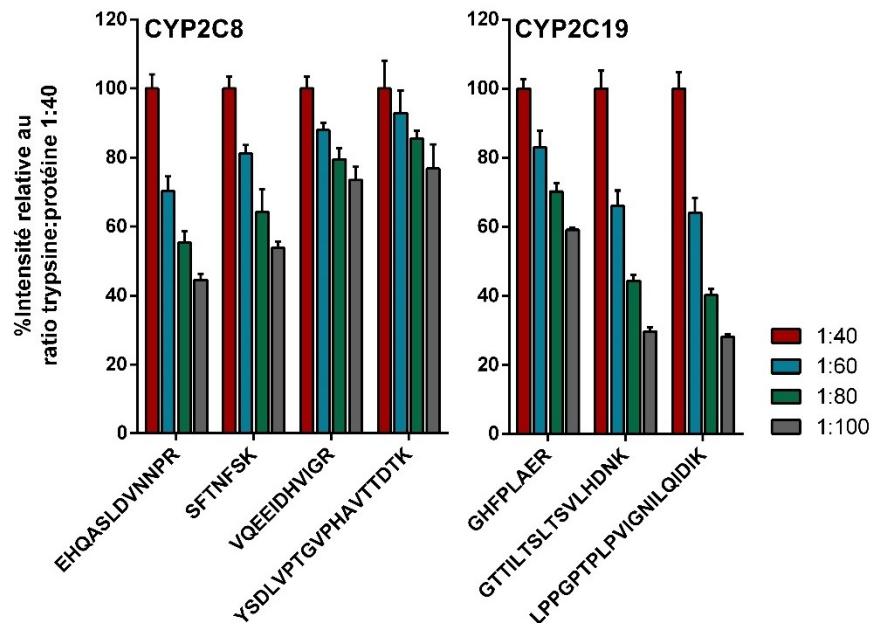


Figure 17 : Optimisation des quantités de trypsine avec les isoenzymes recombinantes CYP2C8 et 2C19 (N=2).

La Figure 17 représente le pourcentage d'intensité relative à l'incubation de la trypsine en proportion 1:40 trypsine:protéine, des pics chromatographiques de chaque peptide obtenus lors de l'incubation de différentes quantités de trypsine. Ces résultats montrent que plus le ratio trypsine:protéine est élevé et plus la quantité de peptides formés est importante. Des méthodes de digestion déjà développées par d'autres laboratoires et utilisées pour d'autres applications utilisaient majoritairement le ratio trypsine:protéine 1:40. L'utilisation d'une faible quantité de trypsine limite la quantité de peptides mesurables alors que l'utilisation d'une quantité trop importante de trypsine augmenterait les coûts de façon considérable. Le ratio 1:40 semble ainsi être optimal. La quantité de peptides observée avec un ratio trypsine 1:40 est plus importante

que les ratios 1:60, 1:80, 1:100. La quantité de trypsine utilisée pour avoir un ratio trypsine:protéine 1:20 était trop importante et n'a pas été testée même si l'on considère que la quantité de peptides formés aurait été plus importante que pour le ratio 1:40. La trypsine sera ainsi incubée à 37 °C avec un ratio trypsine:protéine 1:40.

e) Optimisation du temps d'incubation de la trypsine

Le paramètre de temps d'incubation de la trypsine est très important car, afin de limiter toute variabilité dans les digestions intra-journée et inter-journée, il est préférable d'obtenir une saturation de la réponse enzymatique. Les temps d'incubation de la trypsine rapportés dans des méthodes publiées dans la littérature sont généralement de 8, 16 ou 20 h [156-158]. Tous les cytochromes recombinants d'intérêts ont été incubés avec la trypsine à différents temps soit à 2, 4, 8, 16, 20 et 24 h afin de s'assurer qu'il y a saturation de la réponse enzymatique pour chaque peptide protéotypique sélectionné. Chaque peptide obtenu *in silico* en tenant compte des 5 critères détaillés ci-dessus (taille, polymorphisme, acides aminés instables, clivage manqués et BLAST) a été évalué par digestion *in vitro*. Les résultats des digestions tryptiques *in vitro* à différents temps pour les isoenzymes recombinantes CYP1B1, 2C8, 2C9, 2C19 et 2J2 sont présentés dans la Figure 18.

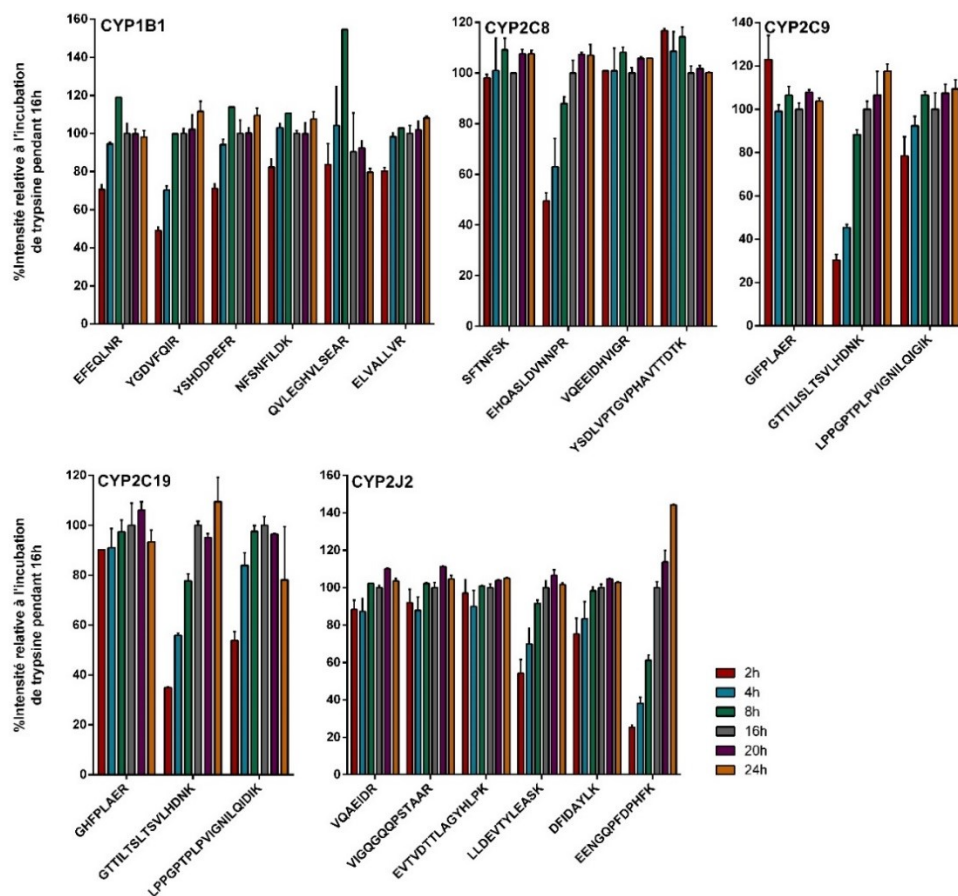


Figure 18 : Optimisation du temps de digestion trypsique avec les isoenzymes recombinantes CYP1B1, 2C8, 2C9, 2C19 et 2J2 (N=2).

La Figure 18 représente le pourcentage d'intensité relative à l'incubation de la trypsine pendant 16 h, des pics chromatographiques de chaque peptide obtenus lors de l'incubation de la trypsine pendant différents temps. Il est important de choisir un temps suffisamment long pour avoir une saturation de la réponse enzymatique mais il ne faut pas que la trypsine soit incubée trop longtemps car elle pourrait couper non-spécifiquement la protéine. D'après les résultats obtenus pour chaque isoenzyme recombinante, le temps d'incubation à 16 h semble être le plus constant pour toutes les isoenzymes. La trypsine sera donc incubée pendant 16 h à pH 7,8 et à 37 °C.

f) Méthode de digestion trypsique optimisée

Chaque étape de la méthode de digestion trypsique *in vitro* a été optimisée afin de développer une méthode optimale pour les 14 isoenzymes des CYP450s d'intérêts. Cette méthode optimisée consiste à digérer 100 µL de protéines recombinantes (25 µg) dans un tampon ABC (50 mM;

pH 7,8). Les protéines sont ensuite incubées avec 5 µL de DTT (500 mM, 20 min, 60 °C) puis 10 µL d'IAA (400 mM, 15 min, 37 °C) dans le noir. La trypsine est ensuite incubée avec un ratio trypsine:protéine de 1:40 pendant 16 h à 37 °C. Vingt (20) µL de standard interne stable marqué isotopiquement dilué dans du 0,1% TFA est ajouté. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 10 min à 16000g.

Lors de l'optimisation de cette méthode de digestion, 0.25 mg/mL (25 µg) de protéines recombinantes étaient digérées. Cependant, les échantillons de microsomes de foie (HLM) et intestinaux (HIM) humains ne sont pas une source purifiée de protéines contrairement aux protéines recombinantes. Ainsi, 1 mg/mL soit 100 µg de protéines totales seront digérées pour les échantillons de HLM et HIM.

2.2.4.3. Sélection des peptides protéotypiques par digestion enzymatique *in vitro* et *in silico*

L'optimisation de la méthode de digestion tryptique et principalement le paramètre de saturation de la réponse à 16 h a permis de réduire le nombre de peptide protéotypique pour chaque isoenzyme.

Table 3 : Nombre de peptides protéotypiques obtenus par digestion *in vitro* pour 14 isoenzymes des CYP450s.

CYP450	Nombre de peptides après digestion <i>in vitro</i>	CYP450	Nombre de peptides après digestion <i>in vitro</i>
CYP1A1	4	CYP2D6	4
CYP1A2	4	CYP2E1	5
CYP1B1	5	CYP2J2	5
CYP2B6	5	CYP3A4	2
CYP2C8	4	CYP3A5	2
CYP2C9	2	CYP3A7	2
CYP2C19	2	CYP4F2	2

Trois paramètres ont ensuite permis de sélectionner le peptide protéotypique à chacune des 14 isoenzymes des CYP450s d'intérêts :

- Paramètres *in silico* :
 - o Acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine pouvant subir des MPT : la base de données UniProtKB/Swiss-Prot référence les sites de phosphorylation trouvés

expérimentalement et le site NetPhos 3.1 liste, en rentrant la séquence de la protéine, les acides aminés ayant une probabilité > 50% de subir des MPT.

- Succession d'acides aminés arginine ou lysine en C-terminal de la séquence d'acides aminés du peptide, soit le site de clivage, qui peut influencer l'efficacité de l'hydrolyse.

- Paramètres *in vitro* :

- Le logiciel Proteome Discoverer™ liste tous les peptides se retrouvant dans l'échantillon analysé avec différents niveaux de confiance. Il permet également de déterminer si les peptides choisis sont retrouvés clivés et non clivés. C'est un paramètre important car si un peptide est souvent retrouvé non clivé, la variabilité des analyses pourrait alors être augmentée.

En tenant compte de ces trois paramètres, un peptide protéotypique a été sélectionné pour chaque isoenzyme des CYP450s.

Table 4 : Séquences d'acides aminés des peptides protéotypiques pour 14 isoenzymes des CYP450s.

CYP450	Séquence des peptides protéotypiques	CYP450	Séquence des peptides protéotypiques
CYP1A1	LAQNLK	CYP2D6	SQGVFLAR
CYP1A2	YLPNPALQR	CYP2E1	LHEEIDR
CYP1B1	YGDVFQIR	CYP2J2	VQAEIDR
CYP2B6	GYGVIFANGNR	CYP3A4	LGIPGPTPLPFLGNILSYHK
CYP2C8	VQEEIDHVIGR	CYP3A5	LFPVAIR
CYP2C9	GIFPLAER	CYP3A7	VISFLTK
CYP2C19	GHFPLAER	CYP4F2	SVINASAAIAPK

Les 14 peptides protéotypiques des 14 isoenzymes des CYP450s ainsi que les 14 standards internes ont ensuite été synthétisés. Les standards internes utilisés dans ce projet de recherche sont des standards internes stables marqués isotopiquement (¹³C et ¹⁴N sur les acides aminés arginine et lysine).

2.2.4.4. Analyse LC-HRMS et MS/MS

a) Analyse des peptides protéotypiques synthétisés

Les masses exactes des peptides protéotypiques et de leurs standards internes ont été déterminées en injectant chaque peptide synthétisé individuellement dans le spectromètre de

masse à une concentration de 200 nM. Les masses M, les états de charges z et les masses exactes de l'ion précurseur $[M+zH]^{z+}$ pour chaque peptide protéotypique et son standard interne sont indiqués dans la Table 5.

Table 5 : Masse M, état de charge z et ion précurseur $[M+zH]^{z+}$ des peptides protéotypiques et standards internes de 14 isoenzymes des CYP450s.

CYP450	Peptide protéotypique	Masse	z	$[M+zH]^{z+}$	Standard interne	Masse	z	$[M+zH]^{z+}$
CYP1A1	LAQNGLK	742,4412	2	372,2236	LAQNGLK- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂	750,4551	2	376,2313
CYP1A2	YLPNPALQR	1070,5942	2	536,3001	YLPNPALQR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	1080,6025	2	541,3054
CYP1B1	YGDVFQIR	996,5085	2	499,2594	YGDVFQIR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	1006,5184	2	504,263
CYP2B6	GYGVIFANGNR	1166,5884	2	584,2982	GYGVIFANGNR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	1176,5986	2	589,3032
CYP2C8	VQEEIDHVIGR	1292,563	3	432,2297	VQEEIDHVIGR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	1303,6865	3	435,5672
CYP2C9	GIFPLAER	901,5086	2	451,7582	GIFPLAER- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	911,5164	2	456,7621
CYP2C19	GHFPLAER	925,4825	2	463,7455	GHFPLAER- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	935,4926	2	468,7506
CYP2D6	SQGVFLAR	876,4878	2	439,2475	SQGVFLAR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	886,4984	2	444,2524
CYP2E1	LHEEIDR	910,4559	3	304,4903	LHEEIDR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	920,4661	3	307,8267
CYP2J2	VQAEIDR	829,4347	2	415,7205	VQAEIDR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	839,445	2	420,7264
CYP3A4	LGIPGPTPLPFLGNILSYHK	2133,1970	3	712,0735	LGIPGPTPLPFLGNILSYHK- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂	2141,2073	3	714,7436
CYP3A5	LFPVAIR	814,5125	2	408,2601	LFPVAIR- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	824,5215	2	413,2646
CYP3A7	VISFLTK	806,497	2	404,252	VISFLTK- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂	814,5119	2	408,2598
CYP4F2	SVINASAAIAPK	1140,6565	2	571,3322	SVINASAAIAPK- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂	1148,6691	2	575,3387

Les peptides protéotypiques et leurs standards internes seront par la suite analysés selon leurs masses exactes afin de quantifier spécifiquement les 14 isoenzymes des CYP450s dans les organes du corps humain comme les organes majeurs d'excrétion des médicaments comme le foie et l'intestin grêle.

Les conditions chromatographiques de la méthode analytique sont détaillées dans la section Matériels et Méthodes. Un chromatogramme de tous les peptides protéotypiques fortifiés dans du 1 mg/mL de HSA digérée pour atteindre une concentration de 200 nM est présenté dans la Figure 19. Cette Figure représente les chromatogrammes des pics chromatographiques de chaque peptide protéotypique ainsi que leur identification et leur temps de rétention.

Chromatogramme des peptides protéotypiques aux 14 isoenzymes des CYP450s

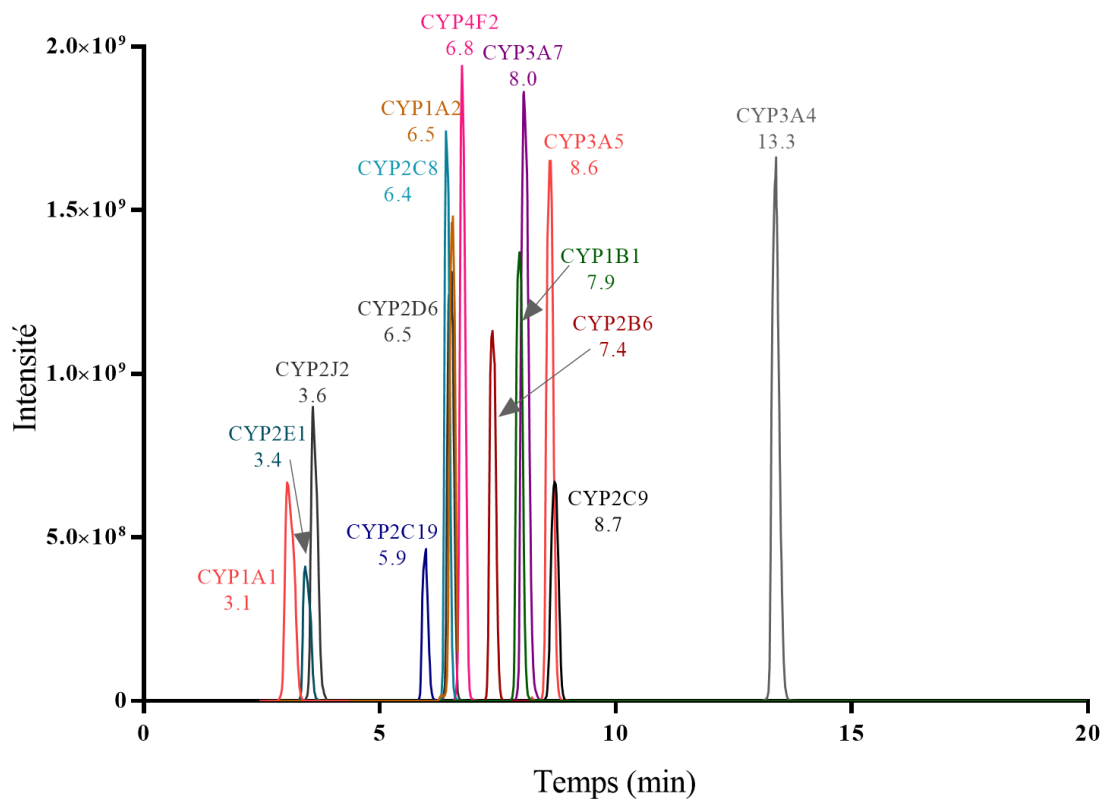


Figure 19 : Chromatogramme de tous les peptides injectés à une concentration de 200 nM selon la méthode chromatographique développée.

b) Analyse des peptides protéotypiques digérés

À titre d'exemple, les spectres MS¹ et MS² du CYP3A4 sont présentés ci-dessous. Vingt-cinq (25) µg de protéine CYP3A4 recombinante, 100 µg d'un pool de microsomes de foie (HLM) et 100 µg d'un pool de microsomes intestinaux (HIM) sont dilués dans un tampon ABC et digérés par la méthode de digestion trypsique *in vitro* optimisée. Les chromatogrammes et les spectres MS¹ et MS² du CYP3A4 sont présentés sur la Figure 20.

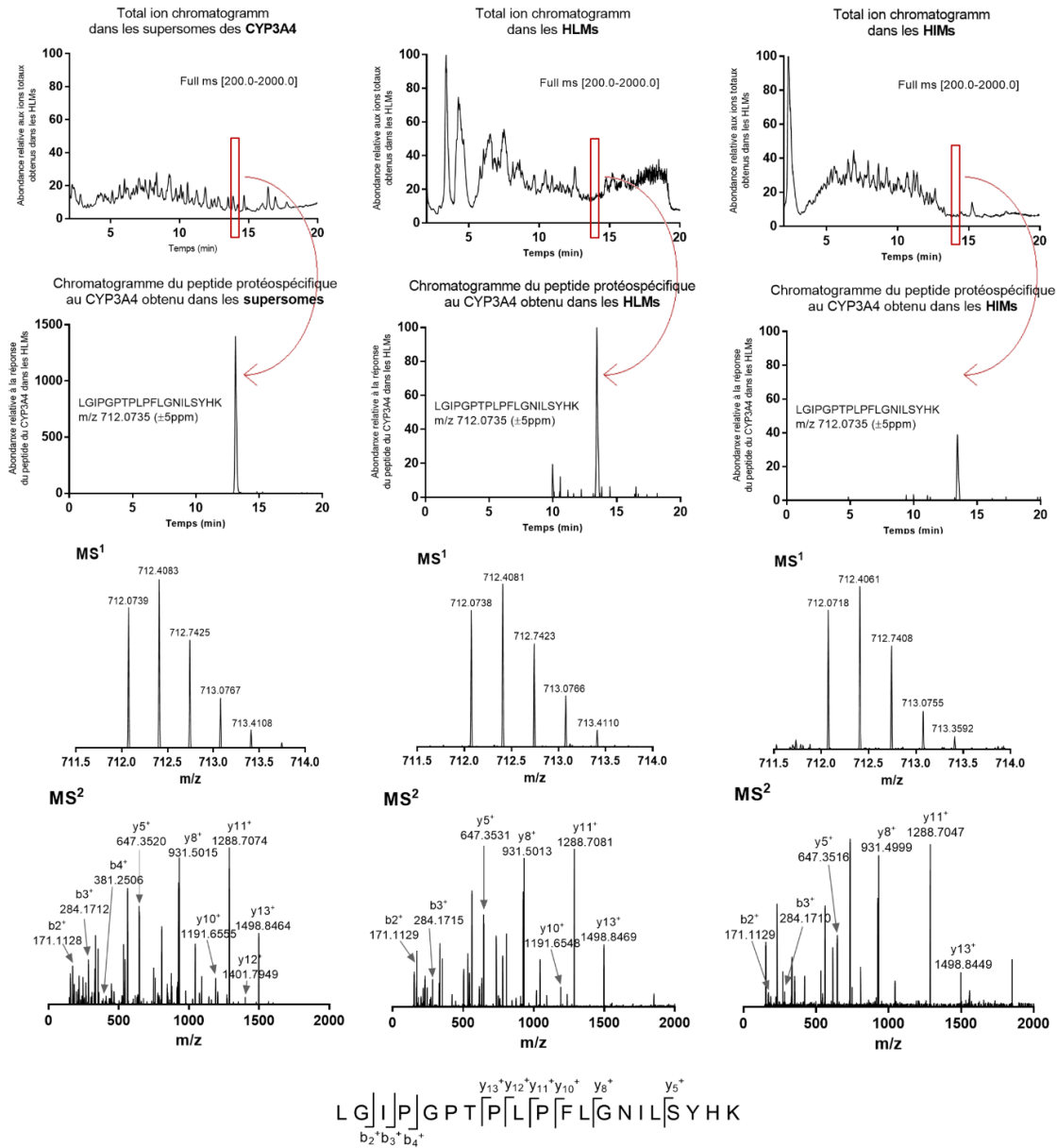


Figure 20 : Chromatogrammes et spectres MS et MS/MS du peptide protéotypique au CYP3A4 dans des protéines recombinantes, des HLM et des HIM.

Le chromatogramme « Total Ion Chromatogram » représente tous les ions présents ayant un rapport masse sur charge (m/z) entre 200 et 2000. À partir de ce spectre, le pic chromatographique du peptide d'intérêt est extrait selon sa masse exacte à ± 5 ppm et son rapport m/z . Le spectre MS^1 représente le profil isotopique de l'ion précurseur sélectionné et le spectre MS^2 représente les ions fragments obtenus après fragmentation de l'ion précurseur dans la cellule de collision du spectromètre de masse. Comme détaillé dans l'introduction, lors d'une

fragmentation de l'ion précurseur à faible énergie, les ions y et b seront majoritairement observés.

Dans ce projet de recherche, les protéines sont quantifiées selon la masse exacte des peptides protéotypiques et la fragmentation en MS² permet de confirmer, avec le profil de fragmentation et les ions formés, que le peptide d'intérêt est bien celui sélectionné. Comme on peut le voir sur le chromatogramme du peptide protéotypique, où l'axe des y correspond à l'abondance relative du peptide relatif aux HLM, la source purifiée de CYP3A4 a une quantité plus importante de CYP3A4 que la quantité observée dans les HLM. À l'inverse, dans les HIM la quantité du peptide spécifique au CYP3A4 est moindre comparativement aux HLM et aux CYP3A4 recombinants. Les spectres MS² permettent de confirmer que le même peptide est analysé pour les trois sources enzymatiques car des ions fragments similaires sont observés. En relation avec la quantité de peptides observés, davantage d'ions fragments sont observés dans la source purifiée de CYP3A4 que dans les pools de HLM et HIM. Les fragments non observables dans les HLM et HIM sont cependant présents dans l'échantillon mais à une intensité trop faible pour être détectés.

2.2.4.5. Données préliminaires

Cent (100) µg de deux pools de microsomes commerciaux de foie (HLM) et 100 µg de deux pools de microsomes commerciaux intestinaux (HIM) ont été dilués dans un tampon ABC et digérés par la méthode de digestion trypsique *in vitro* optimisée. Une courbe de calibration de concentration de 0,25 à 200 nM fut fortifiée dans 1 mg/mL de HSA digérée. Une solution à 100 nM contenant tous les standards internes stables marqués isotopiquement a été rajoutée dans les échantillons de HLM, HIM et HSA préalablement digérés. Les ratios $\frac{\text{Aire du pic du peptide protéotypique}}{\text{Aire du pic du standard interne}}$ ont été extrapolés à partir de la courbe de calibration afin de déterminer les quantités de protéines de chaque isoenzyme en pmol/mg de protéine dans les HLM et HIM. Les résultats préliminaires des quantités observées de chaque isoenzyme sont indiqués dans la Table 6.

Table 6 : Quantités de protéines de chaque isoenzyme obtenues dans deux pools de HLM et HIM commerciaux.

CYP450	Quantité de protéines en pmol/mg	
	Pool de HLM commerciaux	Pool de HIM commerciaux
CYP1A1	<LLOQ	<LLOQ
CYP1A2	11,64 ± 0,42	<LLOQ
CYP1B1	<LLOQ	<LLOQ
CYP2B6	13,62 ± 2,38	<LLOQ
CYP2C8	28,31 ± 4,78	<LLOQ
CYP2C9	92,85 ± 12,28	4,97 ± 0,66
CYP2C19	3,4 ± 0,64	1,89 ± 0,38
CYP2D6	6,94 ± 1,13	<LLOQ
CYP2E1	52,45 ± 7,36	<LLOQ
CYP2J2	1,2 ± 0,32	0,52 ± 0,01
CYP3A4	46,01 ± 1,91	14,70 ± 0,84
CYP3A5	4,3 ± 0,88	0,64 ± 0,07
CYP3A7	<LLOQ	<LLOQ
CYP4F2	9,89 ± 1,72	4,09 ± 2,23

La Table 6 énonce les isoenzymes qui ont été observées par LC-HRMS dans des HLM et dans des HIM commerciaux et leurs proportions respectives. Dans les HLM commerciaux, 11 isoenzymes ont été quantifiées soient les isoenzymes CYP2C9, 2E1, 3A4, 2C8, 2B6, 4F2, 1A2, 2D6, 3A5 et 2J2. Dans les HIM commerciaux, les isoenzymes CYP3A4, 2C9, 4F2, 2C19, 3A5 et 2J2 ont pu être quantifiées.

2.2.5. Discussion et conclusion

Les objectifs de mon projet de recherche étaient de sélectionner des peptides protéotypiques à une isoenzyme en particulier par des méthodes de digestion *in silico* et *in vitro*, d'optimiser ces méthodes de digestion et de développer une méthode analytique permettant la quantification absolue de protéines de chaque isoenzyme dans des microsomes intestinaux.

La digestion *in silico* a été une étape très importante de ce projet car elle a permis d'éliminer de nombreux peptides selon des critères définis très précis. Les isoenzymes des CYP450s d'intérêts ont environ 500 acides aminés et lorsqu'on les digère par digestion trypsique, plus de 50 peptides peuvent être obtenus. Les critères qui ont été définis pour identifier des peptides par digestion *in silico* ont permis de réduire ce nombre à un maximum de 7 peptides. Les peptides sélectionnés sont tous des peptides spécifiques à une isoenzyme particulière mais la digestion *in vitro* va

permettre de définir les peptides ayant les meilleurs profils aussi bien au niveau de l'ionisation en MS, que de leurs capacités à être digérés par la trypsine. Toutes les étapes de la digestion *in vitro* ont été évaluées selon plusieurs conditions et optimisées afin d'obtenir une méthode de digestion *in vitro* optimale pour toutes les isoenzymes. Notre méthode de digestion *in vitro* a plusieurs points communs avec des méthodes déjà développées dans la littérature, cependant la majorité des méthodes n'ont pas testé différents tampons de dilution et n'indiquent pas le type de tampon utilisé pour la dilution des échantillons [156-159]. Nos résultats ont montré que le tampon de digestion avait un impact important et non négligeable et que chaque peptide avait une meilleure réponse en MS lorsqu'ils étaient dilués dans de l'ABC. Par la suite, en tenant compte des différents critères de sélection pour les digestions *in silico* et *in vitro*, le peptide protéotypique ayant le meilleur profil pour chaque isoenzyme a été sélectionné et synthétisé.

Les peptides synthétisés et leurs standards internes ont été utilisés pour développer une méthode analytique spécifique par LC-HRMS qui permet de quantifier, selon la masse exacte des peptides, les quantités de protéines de chaque isoenzyme. La méthode de digestion optimisée et la méthode chromatographique ont été testées dans des pools de HLM et HIM. Peu d'articles se sont intéressés à la quantification des CYP450s dans l'intestin grêle mais à l'inverse, plusieurs articles s'y sont intéressés pour les CYP450s exprimés dans le foie.

Les études quantitatives par spectrométrie de masse de différents groupes comme Langenfeld *et al.*, Kawakami *et al.*, Ohtsuki *et al.* et Gröer *et al.* ont permis la quantification des isoenzymes CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 et 3A5 dans des HLM et leurs résultats sont sensiblement comparables aux résultats préliminaires que nous avons obtenus [156-159]. Cependant, il est important de noter que les résultats peuvent être fortement variables d'un individu à un autre et ainsi d'un laboratoire à un autre dû entre autres à la nature des échantillons étudiés ou encore à des facteurs comme des variants génétiques ou à des maladies. Par exemple, Langenfeld *et al.* reportaient que les quantités de CYP2D6 dans des microsomes de foie de 26 patients variaient entre 0.8 et 81 pmol/mg [159]. Également, les quantités de protéines mesurées chez 17 donneurs dans l'étude d'Ohtsuki *et al.* montrent également des variations importantes dans les quantités de protéines mesurées, comme la quantité de CYP3A4 qui varie de 6,22 à 270 pmol/mg de protéines dans les HLM [157]. Michaels *et al.* ont mesuré une quantité de CYP4F2 de 16,1 et 11,0 pmol/mg de protéines dans des HLM de deux panels de 20 et 11 donneurs,

respectivement [38]. Avec notre méthode de quantification, nous obtenons une quantité de CYP4F2 de $9,89 \pm 1,72$ pmol/mg de protéines, ce qui semble en concordance avec les résultats de leurs études. Pour l'expression de l'isoenzyme CYP2J2 dans les HLM, très peu de résultats ont été publiés dans la littérature, des évidences indiquent que le CYP2J2 est principalement exprimé dans le cœur, les poumons et les intestins [103]. Deux études, une par spectrométrie de masse et une par RT-PCR, ont évalué la quantité de CYP2J2 présente dans les HLM, mais ces études visaient principalement à comparer les expressions des CYP450s entre eux et non à mesurer la quantité absolue du CYP2J2 [160, 161]. Cependant, les conclusions de ces articles se rejoignent rapportant que le CYP2J2 est exprimé dans les HLM mais ce, à de très faibles niveaux. Ces conclusions sont aussi en accord avec nos résultats lesquels montrent que l'isoenzyme CYP2J2 est la plus faiblement mesurée dans les HLM.

Le groupe de Gröer *et al.* s'est intéressé à la quantification de 8 isoenzymes dans l'intestin grêle et trois isoenzymes ont été détectées; le CYP3A4, 2C9, et 2C19 [158]. Les résultats que nous obtenons pour ces mêmes isoenzymes sont en concordance avec les quantités de protéines qu'ils ont mesurées. Nous avons également détecté les isoenzymes CYP4F2, 3A5 et 2J2 dans les HIM. Aucune méthode de quantification développée dans la littérature ne s'est intéressée à la quantification du CYP4F2 dans les HIM alors que nos résultats préliminaires montrent qu'il est fortement exprimé soit avec une quantité de protéine mesurée de $4,09 \pm 2,23$ pmol/mg de protéines. Ces résultats préliminaires viennent confirmer les résultats d'une étude de métabolisme du DB289 de Wang *et al.* qui concluait que le CYP4F2 était exprimé dans les HIM [131]. Davantage d'études seront nécessaires afin de déterminer le rôle clinique du CYP4F2 dans le métabolisme d'autres xénobiotiques. Comme pour le CYP4F2, aucune étude de quantification absolue des protéines CYP3A5 et 2J2 n'a été réalisée. Une étude par *Western blot* de Paine *et al.* montrait que les isoenzymes CYP3A5 et 2J2 étaient exprimées dans l'intestin grêle à une quantité moyenne de 16 et 0,9 pmol/mg de protéines, respectivement [114]. Les quantités mesurées de CYP2J2 semblent en concordance avec celles que nous avons mesurées mais les quantités de l'isoenzyme CYP3A5 mesurées par leur méthode apparaissent beaucoup plus élevées que celles observées avec notre méthode soit 0,64 pmol/mg de protéines. Cela pourrait être dû aux différents donneurs utilisés dans ces deux études. Ils ont aussi mesuré une quantité plus importante de la protéine CYP3A4, 43 pmol/mg de protéines, comparativement

aux résultats préliminaires obtenus avec notre méthode (14,7 pmol/mg de protéines). Il est également important de noter que nos données préliminaires proviennent de pools de microsomes intestinaux humains et ne permettent pas d'évaluer les variations dans la quantité de protéines entre les trois différentes sections de l'intestin grêle.

En général, les résultats préliminaires obtenus dans les HLM et dans les HIM semblent être en concordance avec la majorité des résultats trouvés dans la littérature. Cependant, en fonction des études et des protéines évaluées, différents peptides protéotypiques ont été sélectionnés. Si nous comparons les peptides des isoenzymes qui ont été mesurés dans les méthodes discutées précédemment, les peptides choisis pour CYP1A2, 2B6, 2C9 et 2C19 sont les mêmes parmi les différentes études. Cependant, pour les CYP2C8, 2D6, 2E1, 3A4 et 3A5, les peptides sélectionnés sont différents parmi ces études. Les quantités mesurées de ces protéines peuvent ainsi être plus variables entre les études. De plus, la plupart des méthodes de quantification absolue déjà développées, analysent les échantillons par LC-MS/MS et non pas par LC-HRMS. Les méthodes LC-HRMS sont davantage spécifiques puisque les masses exactes des peptides sont analysées. Ce sera un avantage majeur pour mesurer les quantités de protéines de peptides faiblement exprimés dans les tissus mais cela pourra également diminuer la variabilité inter- et intra-journée.

La prochaine étape de ce projet de recherche serait de valider la méthode analytique par LC-HRMS. Pour la validation de méthodes bioanalytiques, la FDA a rédigé des lignes directrices précises afin que les méthodes bioanalytiques soient toutes validées selon les mêmes normes. Plusieurs paramètres fondamentaux sont à évaluer tels que la précision, la justesse, la sélectivité, la sensibilité, et la reproductibilité d'une méthode. Ils ont également recommandé des critères à ne pas dépasser, comme une variation maximale entre les valeurs expérimentales et théoriques de 15%. Les échantillons cliniques dans le domaine de la protéomique sont beaucoup plus complexes, et aucune ligne directrice n'a encore été instaurée pour le développement de méthodes quantitatives. Nous nous appuyerons au mieux sur les critères de la FDA, et sur les différents tests préconisés, mais on s'attend à ce que les variations intra-journée et inter-journée dans les mesures de protéines, puisse dépasser les 15% préconisés pour des méthodes bioanalytiques. D'autres étapes du projet seraient de quantifier les différentes isoenzymes dans différentes sections de l'intestin grêle de patients ayant consentis au don d'organe et d'évaluer

les variabilités intra-individuelles entre les sections de l'intestin grêle d'un même patient, et les variabilités interindividuelles d'une même section entre deux patients. Également, des études de métabolisme *in vitro*, et des mesures d'ARNm de chaque isoenzyme des CYP450s d'intérêt sont une autre partie de ce projet, visant à étudier les corrélations avec les quantités absolue de protéines mesurées.

SECTION 3 : CONCLUSION GÉNÉRALE

L'organisme est composé de nombreux systèmes et membranes biologiques qui agissent simultanément comme barrière pour empêcher l'intrusion de substances exogènes potentiellement toxiques dans l'organisme. Les Cytochromes P450 représentent le système enzymatique majeur qui est impliqué dans la biotransformation et l'élimination de composés exogènes, tels que les xénobiotiques. De nombreux facteurs comme la polymédication, les conditions physiopathologiques, les polymorphismes génétiques et les facteurs environnementaux peuvent moduler l'expression et/ou l'activité des CYP450s.

Ce projet de recherche visait à développer des méthodes par LC-MS/MS ou LC-HRMS dans le but d'identifier et d'analyser de manière sensible et spécifique des composés ou protéines d'intérêts. Ces deux projets se rejoignent dans un objectif commun d'amélioration des méthodes et des techniques utilisées actuellement pour évaluer aussi bien l'activité que l'expression des CYP450s.

Mon premier projet de recherche a permis le développement de méthodes spécifiques par LC-MS/MS afin d'évaluer l'activité de 7 CYP450s à l'aide d'un cocktail de substrats marqueurs. Plusieurs cocktails ont été développés dans la littérature, mais les méthodes développées et validées dans ce projet de recherche sont plus spécifiques, plus sensibles, utilisent des substrats marqueurs disponibles sur le marché, et ne requièrent que de très faibles quantités de plasma. De plus, ces méthodes peuvent être utilisées dans diverses études telles que des études d'interactions médicamenteuses de même que des études visant à étudier la capacité de patients avec certaines maladies à éliminer les médicaments. L'application clinique de cette méthode dans un projet visant à évaluer la capacité de patient diabétique de type II, soutient son applicabilité en clinique.

Mon deuxième projet de recherche s'inscrit dans un projet plus large visant à évaluer l'expression des CYP450s par LC-HRMS. Ma contribution à ce projet a permis de sélectionner des peptides spécifiques à chacune des 14 isoenzymes d'intérêts et également d'amorcer le développement d'une méthode spécifique afin de les quantifier. Ces techniques sont nouvelles, complexes, en pleine émergence et seulement quelques articles peuvent être trouvés dans la

littérature, ainsi tous les paramètres permettant de quantifier ces peptides ont dû être développés. La suite de ce projet sera l'évaluation quantitative de l'expression des protéines le long de l'intestin grêle et d'en étudier les variabilités intra et interindividuelles. Ces résultats pourront avoir un impact majeur lors du développement de nouveaux médicaments ou lors de l'amélioration de médicaments déjà présents sur le marché.

Ces deux projets de recherche m'ont permis de développer des méthodes par spectrométrie de masse complexes et spécifiques aux analyses souhaitées, tout en ayant deux champs d'application complètement différents.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des publications et abstracts

Publications

Grangeon, A., Gravel S, Gaudette F, Turgeon J, Michaud V. *Highly sensitive LC-MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016. **1040**: p. 144-158.

Lu J, Grangeon A., Gaudette F, Turgeon J, Michaud V. *Effects of Tricyclic Compounds on the Transport of Anti-migraine Triptans through Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1A2 (OATP1A2)*. J Pharmacokinet Exp Ther, 2016 1: 106.

Abstracts

Grangeon A., Barama A, Gaudette F, Turgeon J, Michaud V. Simultaneous absolute protein quantification method of 14 CYP450 enzymes in human intestine by mass spectrometry-based targeted proteomics. Abrégé accepté pour une présentation par affiche à l'*American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (ASCPT)*. Washington, DC, Mars 2017.

Grangeon A., Gaudette F, Barama A, Turgeon J, Michaud V. Sélection de peptides protéotypiques et optimisation des conditions de digestion trypsique afin de caractériser 14 isoenzymes des CYP450s dans l'intestin grêle par LC-MS/MS. Abrégé accepté pour une présentation par affiche au *Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal*, Montréal QC, Mai 2016

Clermont V, Grangeon A., Gaudette F, Barama A, Michaud V. Évaluation et caractérisation des enzymes du métabolisme des médicaments CYP450s exprimées au long de l'intestin grêle chez l'humain. Abrégé accepté pour une présentation par affiche au *Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal*, Montréal QC, Mai 2016.

Gravel S, Grangeon A., Gaudette F, Bélanger F, Chiasson J, Dallaire S, Turgeon J, Michaud V. Effet du diabète de type 2 sur l'activité métabolique des isoenzymes du cytochrome P450;

facteur de variabilité dans la capacité à éliminer les médicaments. Abrégé accepté pour une présentation par affiche au *Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal*, Montréal QC, Mai 2016.

Gravel S, Grangeon A, Gaudette F, Chiasson J, Dallaire S, Langelier H, Turgeon J, Michaud V. Type 2 Diabetes modulates CYP450 metabolic activities; an important variability factor in drug response. Abrégé accepté pour une présentation par affiche à l'*American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (ASCPT)*. San Diego CA, Mars 2016.

Grangeon A, Gaudette F, Turgeon J, Michaud V. Highly sensitive LC-MS/MS methods for the in vivo assessment of human CYP450 activities using small doses of probe-drugs. Abrégé accepté pour une présentation par affiche à l'*International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX)*. Orlando FL, Octobre 2015.

REFERENCES

1. Ure, A., *On gouty concretions, with a new method of treatment*. Med Chir Trans, 1841. **24**: p. 30-5.
2. Caldwell, J., *Drug metabolism and pharmacogenetics: the British contribution to fields of international significance*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S89-99.
3. Conti, A. and M.H. Bickel, *History of drug metabolism: Discoveries of the major Pathways in the 19th Century*. Drug Metabolism Reviews, 1977. **6**(1).
4. Prasad, C. and P.A. Galbraith, *Sir Archibald Garrod and alkaptonuria - 'story of metabolic genetics'*. Clin Genet, 2005. **68**(3): p. 199-203.
5. Garrod, A.E., *The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality*. Lancet, 1902. **2**: p. 1616-1620.
6. Williams, R.T., *Detoxification Mechanisms*. London: Chapman & Hall, 1947.
7. Estabrook, R.W., *A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450)*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(12): p. 1461-73.
8. Mueller, G.C. and J.A. Miller, *The metabolism of methylated aminoazo dyes II. Oxydative demethylation by rat liver homogenates*. J Biol Chem, 1953. **202**: p. 579-587.
9. Mueller, G.C. and J.A. Miller, *The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver: reactivation of carbon dioxide-treated homogenates by riboflavin-adenine dinucleotide*. J Biol Chem, 1950. **185**(1): p. 145-54.
10. Gillette, J.R., *Laboratory of Chemical Pharmacology, National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH: a short history*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 18-41.
11. Axelrod, J., *The enzymatic demethylation of ephedrine*. J Pharmacol Exp Ther, 1955. **114**(4): p. 430-8.
12. Gillette, J.R., B.B. Brodie, and B.N. La Du, *The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen*. J Pharmacol Exp Ther, 1957. **119**(4): p. 532-40.
13. Ryan, K.J. and L.L. Engel, *Hydroxylation of steroids at carbon 21*. J Biol Chem, 1957. **225**(1): p. 103-14.
14. Chance, B., *Rapid and sensitive spectrophotometry. I. The accelerated and stopped-flow methods for the measurement of the reaction kinetics and spectra of unstable compounds in the visible region of the spectrum*. Rev Sci Instrum, 1951. **22**: p. 619-627.
15. Chance, B. and G.R. Williams, *Kinetics of cytochrome b5 in rat liver microsomes*. J Biol Chem, 1954. **209**(2): p. 945-51.
16. Klingenberg, M., *Pigments of rat liver microsomes*. Arch Biochem Biophys, 1958. **75**(2): p. 376-86.
17. Garfinkel, D., *Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions*. Arch Biochem Biophys, 1958. **77**(2): p. 493-509.
18. Omura, T. and R. Sato, *A new cytochrome in liver microsomes*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 1375-6.
19. Cooper, D.Y., et al., *Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase Systems*. Science, 1965. **147**(3656): p. 400-2.
20. Cooper, D.Y., R.W. Estabrook, and O. Rosenthal, *On the cytochromes in microsomes from cortex and medulla of steer adrenals*. Fed Proc, 1963. **22**: p. 587.
21. Cooper, D.Y., R.W. Estabrook, and O. Rosenthal, *The stoichiometry of C21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes*. J Biol Chem, 1963. **238**: p. 1320-3.

22. Estabrook, R.W., D.Y. Cooper, and O. Rosenthal, *The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition of the Steroid C21-Hydroxylase System of the Adrenal Cortex*. *Biochem Z*, 1963. **338**: p. 741-55.
23. Sladek, N.E. and G.J. Mannering, *Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1966. **24**(5): p. 668-74.
24. De Montellano, O., *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Plenum Press, 1996. **2nd edition**.
25. Testa, B. and S.D. Kramer, *The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes*. *Chem Biodivers*, 2007. **4**(3): p. 257-405.
26. Cribb, A.E., et al., *The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity*. *Drug Metab Rev*, 2005. **37**(3): p. 405-42.
27. Ding, X. and L.S. Kaminsky, *Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. **43**: p. 149-73.
28. Guengerich, F.P., *Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity*. *Chem Res Toxicol*, 2001. **14**(6): p. 611-50.
29. Nebert, D.W. and D.R. Nelson, *P450 gene nomenclature based on evolution*. *Methods Enzymol*, 1991. **206**: p. 3-11.
30. Nebert, D.W., et al., *The P450 gene superfamily: recommended nomenclature*. *DNA*, 1987. **6**(1): p. 1-11.
31. Nebert, D.W. and F.J. Gonzalez, *P450 genes: structure, evolution, and regulation*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 945-93.
32. Nelson, D.R., *The cytochrome p450 homepage*. *Hum Genomics*, 2009. **4**(1): p. 59-65.
33. Lewis, D.F., *57 varieties: the human cytochromes P450*. *Pharmacogenomics*, 2004. **5**(3): p. 305-18.
34. Nelson, D.R., et al., *Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants*. *Pharmacogenetics*, 2004. **14**(1): p. 1-18.
35. Tralau, T. and A. Luch, *The evolution of our understanding of endo-xenobiotic crosstalk and cytochrome P450 regulation and the therapeutic implications*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013. **9**(12): p. 1541-54.
36. Zanger, U.M., et al., *Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes*. *Clin Pharmacol Ther*, 2014. **95**(3): p. 258-61.
37. Edson, K.Z., et al., *Cytochrome P450-dependent catabolism of vitamin K: omega-hydroxylation catalyzed by human CYP4F2 and CYP4F11*. *Biochemistry*, 2013. **52**(46): p. 8276-85.
38. Michaels, S. and M.Z. Wang, *The revised human liver cytochrome P450 "Pie": absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics*. *Drug Metab Dispos*, 2014. **42**(8): p. 1241-51.
39. Kitada, M. and T. Kamataki, *Cytochrome P450 in human fetal liver: significance and fetal-specific expression*. *Drug Metab Rev*, 1994. **26**(1-2): p. 305-23.
40. Shimada, T., et al., *Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs*. *Drug Metab Dispos*, 1996. **24**(5): p. 515-22.
41. Shimada, T., et al., *Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens*. *Mol Pharmacol*, 1992. **41**(5): p. 856-64.

42. Anttila, S., et al., *Immunohistochemical detection of pulmonary cytochrome P450IA and metabolic activities associated with P450IA1 and P450IA2 isozymes in lung cancer patients.* Environ Health Perspect, 1992. **98**: p. 179-82.
43. Stejskalova, L. and P. Pavek, *The function of cytochrome P450 1A1 enzyme (CYP1A1) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the placenta.* Curr Pharm Biotechnol, 2011. **12**(5): p. 715-30.
44. Hakkola, J., et al., *Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta.* Biochem Pharmacol, 1996. **51**(4): p. 403-11.
45. Hakkola, J., et al., *Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy.* Biochem Pharmacol, 1996. **52**(2): p. 379-83.
46. Robie-Suh, K., et al., *Aryl hydrocarbon hydroxylase is inhibited by antibody to rat liver cytochrome P-450.* Science, 1980. **208**(4447): p. 1031-3.
47. van de Kerkhof, E.G., et al., *Induction of metabolism and transport in human intestine: validation of precision-cut slices as a tool to study induction of drug metabolism in human intestine in vitro.* Drug Metab Dispos, 2008. **36**(3): p. 604-13.
48. Yengi, L.G., et al., *Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin.* Anal Biochem, 2003. **316**(1): p. 103-10.
49. Williams, J.A., et al., *Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue.* Carcinogenesis, 2000. **21**(9): p. 1683-9.
50. Walsh, A.A., G.D. Szklarz, and E.E. Scott, *Human cytochrome P450 1A1 structure and utility in understanding drug and xenobiotic metabolism.* J Biol Chem, 2013. **288**(18): p. 12932-43.
51. Rendic, S. and F.P. Guengerich, *Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism.* Chem Res Toxicol, 2012. **25**(7): p. 1316-83.
52. Kim, D. and F.P. Guengerich, *Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 27-49.
53. Shimada, T. and Y. Fujii-Kuriyama, *Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1.* Cancer Sci, 2004. **95**(1): p. 1-6.
54. Diaz, D., et al., *Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450.* Gastroenterology, 1990. **99**(3): p. 737-47.
55. Kim, J.H., et al., *Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers.* Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **199**(3): p. 210-9.
56. Shimada, T., et al., *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians.* J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): p. 414-23.
57. Rendic, S. and F.J. Di Carlo, *Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors.* Drug Metab Rev, 1997. **29**(1-2): p. 413-580.
58. Pelkonen, O., et al., *Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status.* Arch Toxicol, 2008. **82**(10): p. 667-715.
59. Wei, C., et al., *Induction of CYP1A1 and CYP1A2 expressions by prototypic and atypical inducers in the human lung.* Cancer Lett, 2002. **178**(1): p. 25-36.
60. Kaminsky, L.S. and Z.Y. Zhang, *Human P450 metabolism of warfarin.* Pharmacol Ther, 1997. **73**(1): p. 67-74.
61. Bertilsson, L., et al., *Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test.* Br J Clin Pharmacol, 1994. **38**(5): p. 471-3.
62. Raucy, J.L., et al., *Acetaminophen activation by human liver cytochromes P450IIE1 and P450IA2.* Arch Biochem Biophys, 1989. **271**(2): p. 270-83.

63. Campbell, M.E., et al., *Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome(s) P-450 in human liver microsomes*. Drug Metab Dispos, 1987. **15**(2): p. 237-49.
64. Guengerich, F.P. and T. Shimada, *Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes*. Chem Res Toxicol, 1991. **4**(4): p. 391-407.
65. Rasmussen, B.B., T.L. Nielsen, and K. Brosen, *Fluvoxamine is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in vitro*. Pharmacol Toxicol, 1998. **83**(6): p. 240-5.
66. Fuhr, U., et al., *Quinolone antibacterial agents: relationship between structure and in vitro inhibition of the human cytochrome P450 isoform CYP1A2*. Mol Pharmacol, 1993. **43**(2): p. 191-9.
67. Kunze, K.L. and W.F. Trager, *Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline*. Chem Res Toxicol, 1993. **6**(5): p. 649-56.
68. Ingelman-Sundberg, M., et al., *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects*. Pharmacol Ther, 2007. **116**(3): p. 496-526.
69. Hakkola, J., et al., *Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells*. Carcinogenesis, 1997. **18**(2): p. 391-7.
70. Shimada, T., et al., *Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1*. Cancer Res, 1996. **56**(13): p. 2979-84.
71. Newbold, R.R. and J.G. Liehr, *Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 235-7.
72. Han, X. and J.G. Liehr, *DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy*. Carcinogenesis, 1994. **15**(5): p. 997-1000.
73. Lee, A.J., et al., *Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms*. Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3382-98.
74. Hayes, C.L., et al., *17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9776-81.
75. Turpeinen, M., H. Raunio, and O. Pelkonen, *The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(7): p. 705-14.
76. Zanger, U.M., et al., *Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(7): p. 743-59.
77. Gervot, L., et al., *Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities*. Pharmacogenetics, 1999. **9**(3): p. 295-306.
78. Wang, H. and L.M. Tompkins, *CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme*. Curr Drug Metab, 2008. **9**(7): p. 598-610.
79. Kreth, K., et al., *Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy"-related designer drugs*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(12): p. 1563-71.
80. Zanger, U.M. and K. Klein, *Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance*. Front Genet, 2013. **4**: p. 24.
81. Goldstein, J.A. and S.M. de Morais, *Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily*. Pharmacogenetics, 1994. **4**(6): p. 285-99.

82. Nelson, D.R., et al., *The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature*. DNA Cell Biol, 1993. **12**(1): p. 1-51.
83. Goldstein, J.A., *Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily*. Br J Clin Pharmacol, 2001. **52**(4): p. 349-55.
84. Totah, R.A. and A.E. Rettie, *Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance*. Clin Pharmacol Ther, 2005. **77**(5): p. 341-52.
85. Lau, T.K., D.R. Leachman, and R. Lufschanowski, *Severe rhabdomyolysis associated with the cerivastatin-gemfibrozil combination therapy: report of a case*. Tex Heart Inst J, 2001. **28**(2): p. 142-5.
86. Miners, J.O. and D.J. Birkett, *Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism*. Br J Clin Pharmacol, 1998. **45**(6): p. 525-38.
87. Kazui, M., et al., *Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(1): p. 92-9.
88. Smith, G., et al., *Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily*. Xenobiotica, 1998. **28**(12): p. 1129-65.
89. Wilkinson, G.R., F.P. Guengerich, and R.A. Branch, *Genetic polymorphism of S-mephenytoin hydroxylation*. Pharmacol Ther, 1989. **43**(1): p. 53-76.
90. Nakamura, K., et al., *Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations*. Clin Pharmacol Ther, 1985. **38**(4): p. 402-8.
91. Kimura, S., et al., *The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene*. Am J Hum Genet, 1989. **45**(6): p. 889-904.
92. Zanger, U.M., S. Raimundo, and M. Eichelbaum, *Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. **369**(1): p. 23-37.
93. Brosen, K., et al., *Extensive metabolizers of debrisoquine become poor metabolizers during quinidine treatment*. Pharmacol Toxicol, 1987. **60**(4): p. 312-4.
94. Ingelman-Sundberg, M., *Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity*. Pharmacogenomics J, 2005. **5**(1): p. 6-13.
95. Mahgoub, A., et al., *Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man*. Lancet, 1977. **2**(8038): p. 584-6.
96. Raucy, J.L., J.C. Kraner, and J.M. Lasker, *Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1*. Crit Rev Toxicol, 1993. **23**(1): p. 1-20.
97. Restrepo, J.G., et al., *Polymorphic drug metabolism in anaesthesia*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(3): p. 236-46.
98. Lee, S.S., et al., *Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen*. J Biol Chem, 1996. **271**(20): p. 12063-7.
99. Lieber, C.S., *The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(3-4): p. 511-29.
100. Seitz, H.K. and F. Stickel, *Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(8): p. 599-612.
101. Raucy, J.L., et al., *Induction of cytochrome P450IIIE1 in the obese overfed rat*. Mol Pharmacol, 1991. **39**(3): p. 275-80.

102. Zeldin, D.C., et al., *Predominant expression of an arachidonate epoxygenase in islets of Langerhans cells in human and rat pancreas*. *Endocrinology*, 1997. **138**(3): p. 1338-46.
103. Wu, S., et al., *Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(7): p. 3460-8.
104. Hashizume, T., et al., *Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **300**(1): p. 298-304.
105. Matsumoto, S., et al., *Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole*. *Drug Metab Dispos*, 2002. **30**(11): p. 1240-5.
106. Lee, C.A., et al., *Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2*. *Drug Metab Dispos*, 2010. **38**(2): p. 347-56.
107. Jiang, J.G., et al., *Expression of cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase 2J2 in human tumor tissues and cell lines*. *Ai Zhonghua*, 2009. **28**(2): p. 93-6.
108. Gibson, G.G., et al., *Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man*. *Xenobiotica*, 2002. **32**(3): p. 165-206.
109. Schuetz, J.D., D.L. Beach, and P.S. Guzelian, *Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver*. *Pharmacogenetics*, 1994. **4**(1): p. 11-20.
110. Domanski, T.L., et al., *cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450*. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(2): p. 386-92.
111. Westlind, A., et al., *Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **281**(5): p. 1349-55.
112. Lacroix, D., et al., *Expression of CYP3A in the human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth*. *Eur J Biochem*, 1997. **247**(2): p. 625-34.
113. Paine, M.F., et al., *Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997. **283**(3): p. 1552-62.
114. Paine, M.F., et al., *The human intestinal cytochrome P450 "pie"*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(5): p. 880-6.
115. Watkins, P.B., *Noninvasive tests of CYP3A enzymes*. *Pharmacogenetics*, 1994. **4**(4): p. 171-84.
116. Thummel, K.E., et al., *Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **271**(1): p. 557-66.
117. Lucey, M.R., et al., *Cyclosporin toxicity at therapeutic blood levels and cytochrome P-450 IIIA*. *Lancet*, 1990. **335**(8680): p. 11-5.
118. Monahan, B.P., et al., *Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use*. *JAMA*, 1990. **264**(21): p. 2788-90.
119. Koch, I., et al., *Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA*. *Drug Metab Dispos*, 2002. **30**(10): p. 1108-14.
120. Kolars, J.C., et al., *CYP3A gene expression in human gut epithelium*. *Pharmacogenetics*, 1994. **4**(5): p. 247-59.
121. Gervot, L., et al., *CYP3A5 is the major cytochrome P450 3A expressed in human colon and colonic cell lines*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1996. **2**(4): p. 381-8.
122. Kamdem, L.K., et al., *Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus*. *Clin Chem*, 2005. **51**(8): p. 1374-81.
123. Wrighton, S.A., et al., *Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450 IIIA5 (HLp3)*. *Mol Pharmacol*, 1990. **38**(2): p. 207-13.
124. Kuehl, P., et al., *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. *Nat Genet*, 2001. **27**(4): p. 383-91.

125. Schuetz, J.D., S. Kauma, and P.S. Guzelian, *Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 1018-24.
126. Tateishi, T., et al., *A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy*. Life Sci, 1997. **61**(26): p. 2567-74.
127. Jin, R., et al., *Role of human CYP4F2 in hepatic catabolism of the proinflammatory agent leukotriene B4*. Arch Biochem Biophys, 1998. **359**(1): p. 89-98.
128. Powell, P.K., et al., *Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **285**(3): p. 1327-36.
129. Sontag, T.J. and R.S. Parker, *Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25290-6.
130. McDonald, M.G., et al., *CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant*. Mol Pharmacol, 2009. **75**(6): p. 1337-46.
131. Wang, M.Z., et al., *Human enteric microsomal CYP4F enzymes O-demethylate the antiparasitic prodrug pafuramidine*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(11): p. 2067-75.
132. Xu, Q.A.M., Timothy L., *LC-MS in Drug Bioanalysis*. 2012.
133. Adaway, J.E. and B.G. Keevil, *Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. **883-884**: p. 33-49.
134. FDA Guidance, U.D.o.H.a.H.S., Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM). *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*. 2001.
135. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
136. Pitt, J.J., *Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry*. Clin Biochem Rev, 2009. **30**(1): p. 19-34.
137. Lewis, J.K., J. Wei, and G. Siuzdak, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2000: p. 5880–5894.
138. Huttenhain, R., et al., *Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(5-6): p. 518-25.
139. Gallien, S., et al., *Targeted proteomic quantification on quadrupole-orbitrap mass spectrometer*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(12): p. 1709-23.
140. Sherman, J., et al., *How specific is my SRM?: The issue of precursor and product ion redundancy*. Proteomics, 2009. **9**(5): p. 1120-3.
141. Olsen, J.V., et al., *A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(12): p. 2759-69.
142. Wilkins, M.R., et al., *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996. **13**: p. 19-50.
143. James, P., *Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics*. Q Rev Biophys, 1997. **30**(4): p. 279-331.
144. Gerszten, R.E. and T.J. Wang, *The search for new cardiovascular biomarkers*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 949-52.
145. Omura, T. and R. Sato, *The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2370-8.
146. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.

147. Snawder, J.E. and J.C. Lipscomb, *Interindividual variance of cytochrome P450 forms in human hepatic microsomes: correlation of individual forms with xenobiotic metabolism and implications in risk assessment*. Regul Toxicol Pharmacol, 2000. **32**(2): p. 200-9.
148. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
149. Burnette, W.N., "*Western blotting*": *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
150. Guengerich, F.P., P. Wang, and N.K. Davidson, *Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Biochemistry, 1982. **21**(7): p. 1698-706.
151. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
152. Brun, V., et al., *Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2139-49.
153. Johnson, R.S., et al., *Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine*. Anal Chem, 1987. **59**(21): p. 2621-5.
154. Roepstorff, P. and J. Fohlman, *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom, 1984. **11**(11): p. 601.
155. Grangeon, A., et al., *Highly sensitive LC-MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016. **1040**: p. 144-158.
156. Kawakami, H., et al., *Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection*. J Pharm Sci, 2011. **100**(1): p. 341-52.
157. Ohtsuki, S., et al., *Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities*. Drug Metab Dispos, 2012. **40**(1): p. 83-92.
158. Groer, C., et al., *Absolute protein quantification of clinically relevant cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases by mass spectrometry-based targeted proteomics*. J Pharm Biomed Anal, 2014. **100**: p. 393-401.
159. Langenfeld, E., et al., *Mass spectrometry-based absolute quantification of microsomal cytochrome P450 2D6 in human liver*. Proteomics, 2009. **9**(9): p. 2313-23.
160. Girault, I., et al., *Simultaneous measurement of 23 isoforms from the human cytochrome p450 families 1 to 3 by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Drug Metabolism and Disposition, 2005. **33** (12).
161. Seibert, C., et al., *Multiple-approaches to the identification and quantification of cytochromes P450 in human liver tissue by mass spectrometry*. J Proteome Res, 2009. **8**(4): p. 1672-81.