

Université de Montréal

ÉVALUATION DE L'INDUCTION DES CYTOCHROMES P4501A (CYP1A)  
PAR L'OMÉPRAZOLE CHEZ L'ENFANT. UTILISATION DU  
TEST RESPIRATOIRE À LA <sup>13</sup>C-CAFÉINE.

par

Marie-Claude Dubuc

Université de Montréal

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.)  
en sciences pharmaceutiques ; option : pharmacologie

Décembre, 2000

© Marie-Claude Dubuc, 2000



QV  
705  
H58  
2001  
N. 010

identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

ÉVALUATION DE L'INDUCTION DES CYTOCHROMES P4501A (CYP1A)  
PAR L'OMÉPRAZOLE CHEZ L'ENFANT. UTILISATION DU  
TEST RESPIRATOIRE A LA <sup>13</sup>C-CAFÉINE.

présenté par :

Marie-Claude Dubuc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_

## SOMMAIRE

L'oméprazole est un substitut benzimidazole qui agit comme un puissant inhibiteur de la pompe  $H^+$ ,  $K^+$  - ATPase gastrique: dernière étape de la sécrétion acide gastrique. Ce médicament est de plus en plus prescrit aux enfants souffrant de reflux gastro-œsophagien (RGO). Plusieurs études ont été conduites dans des populations adultes dans le but de vérifier l'effet de l'oméprazole sur le métabolisme de la caféine, un substrat du CYP1A2. Les résultats de ces études sont très contradictoires et controversés, puisque l'isoforme CYP1A2 est entre autre responsable de l'activation de pré-carcinogènes en carcinogènes actifs.

L'objectif principal de ce projet était de vérifier, en utilisant les paramètres du test respiratoire à la  $^{13}C$ -caféine, si l'oméprazole, administré à des enfants pour le traitement de reflux gastro-œsophagien (RGO), a un effet inducteur de l'activité du CYP1A2 dans cette population.

Pour atteindre les objectifs, nous avons d'abord mis en place un protocole visant à définir des conditions pré-requises pour le test respiratoire à la  $^{13}C$ -caféine dans une population pédiatrique. À partir de ces résultats, nous avons mis au point un petit déjeuner test, qui, tout en maintenant le niveau basal du  $^{13}CO_2$  expiré constant, permet aux enfants inclus dans l'étude d'éviter la période de jeûne normalement requise pour de tels tests.

Dans le but de déterminer l'effet potentiel inducteur de l'oméprazole sur le CYP1A2 chez les enfants, nous avons mis en place un protocole clinique. Suite à l'inclusion de 26 sujets dans l'étude, les résultats ont montré une induction significative après 2 semaines de traitement à l'oméprazole. L'induction atteint son maximum après 4 semaines de traitement. Et, elle reste significative jusqu'à la 8<sup>ème</sup> semaine de traitement. L'induction de l'activité des CYP1A2 est transitoire puisque la valeur de l'activité régresse à la valeur initiale, 4 semaines après l'arrêt du traitement.

Il était ensuite question de déterminer les paramètres de pharmacocinétique de l'oméprazole chez les sujets qui ont accepté de subir des prises de sang sur une période de 5 heures lors de la visite à la semaine 4. Pour pouvoir déterminer la concentration plasmatique de l'oméprazole et de ses métabolites, il a d'abord fallu mettre au point et valider une méthode analytique adéquate. Dans cette méthode, les molécules à étudier sont extraites du plasma à l'aide d'une extraction en phase solide. Les analytes sont ensuite analysés par chromatographie liquide à haute performance. Pour des échantillons de plasma contenant entre 10 et 2000 ng/mL d'oméprazole, cette méthodologie assure une analyse quantitative précise, exacte et robuste.

Les résultats de ces mesures de concentrations plasmatiques de l'oméprazole nous ont permis de déterminer les paramètres pharmacocinétique de l'oméprazole chez les 11 sujets qui ont participé à cette partie du protocole. En effet, à partir des concentrations plasmatiques recueillies sur 6 prises de sang en 5 heures, les paramètres pharmacocinétique ont été déterminés. Ces paramètres ont d'abord été estimés en utilisant la probabilité maximale (Adapt-II) et ces valeurs ont servi comme valeurs initiales pour l'analyse "iterative two-stage analysis" (IT2S). Les données de concentrations plasmatiques ont été adaptées correctement à un modèle à deux-compartiments avec temps de latence pour l'absorption. Les valeurs moyennes (écart-type) de  $V_{ss}/F$  ( $0.48 \pm 0.195$  L/h.kg),  $t_{1/2\beta}$  ( $0.77 \pm 0.441$  h), et  $k_a$  ( $2.8 \pm 1.15$  hr<sup>-1</sup>) sont similaires aux valeurs trouvés chez les adultes. Cependant, la valeur de la clairance,  $Cl/F$  ( $0.65 \pm 0.510$  L/h/kg), est plus élevée que celle retrouvée chez les adultes.

## TABLE DES MATIÈRES

<u>SOMMAIRE</u>	<u>I</u>
<u>TABLE DES MATIÈRES</u>	<u>III</u>
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	<u>VIII</u>
<u>LISTE DES FIGURES</u>	<u>IX</u>
<u>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</u>	<u>XI</u>
<u>1<sup>ER</sup> CHAPITRE: INTRODUCTION, OBJECTIFS ET ÉTAT DE LA QUESTION</u>	<u>1</u>
1.0 RATIONNEL DE L'ÉTUDE	1
2.0 DÉFINITION DES OBJECTIFS	1
3.0 MÉTHODOLOGIES UTILISÉES POUR ATTEINDRE LES OBJECTIFS	2
4.0 LE REFLUX GASTRO-CESOPHAGIEN CHEZ L'ENFANT	3
4.1 PHYSIOPATHOLOGIE	4
4.2 SYMPTOMES	5
4.3 EXPLORATION	5
4.4 TRAITEMENT	6
5.0 L'OMÉPRAZOLE: INHIBITEUR DE LA POMPE À PROTONS	7
5.1 LA POMPE À PROTON	7
5.2 MÉCANISME D'ACTION DE L'OMEPRAZOLE	9
5.3 PHARMACOCINÉTIQUE CHEZ L'ADULTE	10
5.4 PHARMACOCINÉTIQUE CHEZ L'ENFANT	11

6.0	OMÉPRAZOLE ET LES CYTOCHROMES P450	12
6.1	ROLE DES CYTOCHROMES P450	12
6.2	IMPLICATION DU CYP2C19	14
6.3	IMPLICATION DU CYP3A4	15
6.4	IMPLICATION DU CYP1A2	16
7.0	TEST RESPIRATOIRE À LA CAFÉINE <sup>13</sup> C	20
7.1	APERÇU MÉTABOLIQUE ET MÉTHODOLOGIQUE	20
7.2	MESURE DE L'ABONDANCE ISOTOPIQUE DU CO <sub>2</sub>	23

## 2<sup>IÈME</sup> CHAPITRE: PARTIE EXPÉRIMENTALE 26

### PARTIE 1: DÉFINITION DES PRÉ-REQUIS 26

#### RÉSUMÉ ARTICLE 1 30

#### ARTICLE 1 31

##### 1.0 ABSTRACT 31

##### 2.0 INTRODUCTION 32

##### 3.0 MATERIAL AND METHODS 34

###### 3.1 BREATH TEST 34

###### 3.2 ONE-DAY BASAL <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> VARIATION 34

###### 3.3 INFLUENCE OF MEALS AND BEVERAGES ON BASAL <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> 35

###### 3.4 TEST BREAKFAST 35

4.0	RESULTS AND DISCUSSION	36
4.1	ONE-DAY BASAL $^{13}\text{CO}_2$ VARIATION	36
4.2	INFLUENCE OF MEALS AND BEVERAGES ON BASAL $^{13}\text{CO}_2$	38
4.3	TEST BREAKFAST	40
5.0	CONCLUSION	41
6.0	REFERENCES	43

	<b>PARTIE 2 : ÉTUDE DE L'INDUCTION DU CYP1A2 PAR L'OMÉPRAZOLE</b>	45
--	---	----

	RÉSUMÉ ARTICLE 2	47
--	------------------	----

	ARTICLE 2	48
--	-----------	----

1.0	ABSTRACT	48
-----	----------	----

2.0	INTRODUCTION	49
-----	--------------	----

3.0	METHODS	50
-----	---------	----

3.1	STUDY POPULATION	50
-----	------------------	----

3.2	CAFFEINE BREATH TEST	50
-----	----------------------	----

3.3	CALCULATIONS AND STATISTICAL ANALYSIS	51
-----	---------------------------------------	----

4.0	RESULTS	52
-----	---------	----

5.0	DISCUSSION	54
-----	------------	----

6.0	REFERENCES	59
-----	------------	----

	<b>PARTIE 3 : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE POUR LA SÉPARATION ET LA QUANTIFICATION DE L'OMÉPRAZOLE</b>	62
--	--	----

	RÉSUMÉ ARTICLE 3	63
--	------------------	----

	ARTICLE 3	64
--	-----------	----

1.0	ABSTRACT	64
2.0	INTRODUCTION	65
3.0	EXPERIMENTAL	66
3.1	EQUIPMENT	66
3.2	REAGENTS	67
3.3	CHROMATOGRAPHIC CONDITONS	67
3.4	CALIBRATION AND REAGENT SOLUTIONS	67
3.5	SAMPLE PREPERATION: SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)	68
3.6	ANALYTICAL PARAMETERS	68
4.0	RESULTS AND DISCUSSION	69
4.1	APPLICATION	71
5.0	REFERENCES	73

	<b>PARTIE 4 : DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES PHARMACO- CINÉTIQUES DE L'OMÉPRAZOLE CHEZ L'ENFANT</b>	74
--	---	----

	<b>RÉSUMÉ ARTICLE 4</b>	75
--	-------------------------	----

	<b>ARTICLE 4</b>	76
--	------------------	----

1.0	ABSTRACT	76
2.0	INTRODUCTION	77
3.0	METHODS	78
3.1	PATIENTS	78
3.2	PHARMACOKINETIC STUDY	78
3.3	COMPARTMENTAL PHARMAOCKINETIC ANALYSIS	79
4.0	RESULTS	80

5.0	DISCUSSION	81
6.0	REFERENCES	86
3 <sup>IÈME</sup>	CHAPITRE: DISCUSSION ET CONCLUSION	88
	RÉFÉRENCES	93

LISTE DES TABLEAUXARTICLE 2

Table 1 :	Demographic data of patients and effect of 8-week omeprazole treatment on the <sup>13</sup> C-caffeine breath test	55
-----------	--	----

ARTICLE 4

Table 1 :	Demographic data and omeprazole dosage for patients included in the trial	79
Table 2 :	Individual population pharmacokinetic parameters of omeprazole in children	80

## LISTE DES FIGURES

### PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION, OBJECTIFS ET ÉTAT DE LA QUESTION

Figure 1:	Sécrétion de l'acide gastrique par la cellule pariétale_____	8
Figure 2:	Devenir de l'oméprazole dans l'organisme_____	10
Figure 3:	Schéma métabolique de l'oméprazole_____	15
Figure 4:	Déméthylation de la caféine aux positions 1, 3 et 7_____	21
Figure 5:	Schéma métabolique complet de la caféine_____	22
Figure 6:	Schéma de l'appareil analytique; chromatographie gazeuse couplée à un couplée à un spectromètre de masse isotopique (GC-IRMS)_____	24

### DEUXIÈME CHAPITRE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### PARTIE 1

Figure 1:	Cycle de Calvin (cycle en C <sub>3</sub> )_____	27
Figure 2:	Cycle de Hatch-Shalk (cycle en C <sub>4</sub> )_____	28

#### ARTICLE 1

Figure 1:	<sup>13</sup> CO <sub>2</sub> abundance in breath for fifteen healthy subjects over a one-day period_____	36
Figure 2:	<sup>13</sup> CO <sub>2</sub> abundance in breath for one subject over a one-day period_____	37
Figure 3:	Difference in <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> abundance in breath after ingestion of two different cereals, as an average for 10 subjects_____	38
Figure 4:	Difference in <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> abundance in breath after ingestion of five different soft drinks, as an average for 10 subjects_____	39
Figure 5:	<sup>13</sup> CO <sub>2</sub> abundance in breath in ten patients before and after a non-controlled breakfast taken at 9:00 hours_____	40

Figure 6 :	$^{13}\text{CO}_2$ abundance in breath in ten patients before and after a standardized breakfast taken at 9:00 hours	41
------------	--	----

## ARTICLE 2

Figure 1 :	Enrichment of isotopic abundance of expired $^{13}\text{CO}_2$ over a 2h period after administration of 3mg/kg of $^{13}\text{C}$ -[1,3,7 N-methyl]-caffeine. Evolution of caffeine metabolism during an 8 week treatment with 10mg omeprazole in a 5 year old child	53
------------	--	----

Figure 2:	Figure 2. Mean $^{13}\text{C}$ recovery evolution during an 8-week treatment with omeprazole and after 4 week post-treatment in children (n=26)	54
-----------	---	----

## ARTICLE 3

Figure 1:	Structural formulae of omeprazole, 5'-hydroxyomeprazole, omeprazole sulfone and internal standard (H168/24)	66
-----------	---	----

Figure 2:	Chromatograms monitored at 302 nm of (A) blank pooled human plasma, (B) pooled human plasma spiked with omeprazole and internal standard at concentrations of 200 ng/mL and (C) subject's plasma 3h after oral administration of 20 mg omeprazole	70
-----------	---	----

Figure 3:	Plasma omeprazole concentration versus time profiles in 2 children after administration of 20mg and 15mg doses at steady state respectively	72
-----------	---	----

## ARTICLE 4

Figure 1:	Individual profiles of plasma omeprazole on Day 27: A: linear scale, and B: log scale	82
-----------	--	----

Figure 2:	Weighted residuals versus observed plasma concentrations of omeprazole	83
-----------	--	----

Figure 3:	Graphical representation of observed and fitted plasma concentrations of omeprazole (ng/mL) on Day 27, where A, B and C represent quality of fit for 3 (ID#5), 4 (ID#31) and 5 (ID#12) measurable plasma concentrations, respectively	84
-----------	---	----

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ASC	Aire sous la courbe
AUC	Area under curve
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2
CYP2C19	Cytochrome P450 2C19
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
CYP450	Cytochrome P450
DAD	Diode Array Detector
EM	Extensive Metabolisers
GC-IRMS	Gas chromatography- Isotope ratio mass spectrometry
GERD	Gastro esophageal reflux disease
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-MS-MS	High performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry
IPP	Inhibiteurs de la pompe à proton
IRMS	Isotope ratio mass spectrometry
LC	Liquid chromatography
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
ML	Métaboliseurs lents de la <i>S</i> -méphynétain
MR	Métaboliseurs rapides de la <i>S</i> -méphynétain
OH-OPZ	5'-hydroxyméprazole
OPZ	Oméprazole
OPZ-SO <sub>2</sub>	Oméprazole sulphone
PDB	Pee Dee Belemnite
PM	Poor Metabolisers
RGO	Reflux gastro-œsophagien
SIO	Sphincter inférieur de l'œsophage
SPE	Solid phase extraction
TR	Test respiratoire
TRC	Test respiratoire à la <sup>13</sup> C-caféine

## PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION, OBJECTIFS ET ÉTAT DE LA QUESTION

### 1.0 RATIONNEL DE L'ÉTUDE

Il a été montré que l'oméprazole induit les CYP1A2 chez l'adulte (1). L'oméprazole, administré à l'enfant souffrant de reflux gastro-œsophagien (RGO), serait susceptible d'induire les mêmes cytochromes. À ce jour, aucune étude n'a été conduite pour vérifier l'effet inducteur de l'oméprazole sur le CYP1A2 dans une population pédiatrique. Puisqu'il a été montré que le CYP1A2 devient actif entre les quatrième et cinquième mois de la vie (2) et que les CYP1A2 sont entre autres responsables de l'activation de pré-carcinogènes en carcinogènes actifs, une induction de cette enzyme, chez des enfants âgés de 6 mois à 17 ans, pourrait être un facteur de risque non négligeable (3).

De plus, la pharmacocinétique de l'oméprazole chez les enfants est très peu documentée. En effet, à ce jour seulement 3 études rapportent des données de pharmacocinétique pour la population pédiatrique (4-6). Aucune étude ne rapporte de données sur la pharmacocinétique de l'oméprazole administré par voie orale chez des enfants âgés de moins de 3 ans.

### 2.0 DÉFINITION DES OBJECTIFS

L'objectif principal de ce projet est donc de vérifier, en utilisant les paramètres du test respiratoire à la caféine  $^{13}\text{C}$ , si l'oméprazole, administré à des enfants pour le traitement de reflux gastro-œsophagien (RGO), a un effet inducteur du CYP1A2 dans cette population.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Déterminer si l'induction des CYP1A2 par l'oméprazole varie en fonction de l'âge chez l'enfant.
- Déterminer le niveau d'induction des CYP1A2 pendant un traitement à l'oméprazole.

- Évaluer le temps de régression de l'induction après l'arrêt du traitement par l'oméprazole.
- Établir la pharmacocinétique de l'oméprazole en fonction de l'âge chez l'enfant.

### 3.0 MÉTHODOLOGIES UTILISÉES POUR ATTEINDRE LES OBJECTIFS

Dans le but de déterminer si un traitement à l'oméprazole peut causer une induction du CYP1A2, il faudra mesurer l'activité du CYP1A2. Or il a été montré que la caféine peut servir de sonde métabolique pour ce CYP (7). Plus précisément, le test respiratoire à la <sup>13</sup>C-caféine (TRC), permet une mesure de l'activité du CYP1A2. Le résultat du TRC permet de quantifier l'activité du CYP1A2 au moment où le test est effectué. Pour déterminer un effet inducteur il faudra faire une première mesure de l'activité du CYP1A2 avant l'exposition à l'inducteur, donc avant le traitement à l'oméprazole, et d'autres mesures pendant le traitement. La comparaison des résultats avant et pendant le traitement pour chaque sujet, permettra de déterminer si l'activité du CYP1A2 est significativement modifiée. Puisque la variabilité interindividuelle de l'activité de CYP est grande, l'ajout d'un groupe contrôle, non exposé à l'oméprazole, n'est pas nécessaire. Chaque sujet est son propre témoin en ce sens que pour chaque sujet la valeur de l'activité du CYP1A2 déterminée avant le traitement à l'oméprazole servira de valeur de référence. Cette méthode permettra de déterminer si l'oméprazole est un inducteur du CYP1A2 dans les conditions thérapeutiques habituelles pour le traitement du RGO chez l'enfant.

Pour déterminer si l'induction est variable en fonction de l'âge, la population sera divisée en 4 sous-groupes. La répartition des sous-groupes est la suivante : les enfants âgés de 3 mois à 6 mois forment le premier groupe, les enfants âgés entre 1 an et 6 ans, entre 7 ans et 12 ans et entre 13 ans et 17 ans forment les trois autres sous-groupes. La comparaison des résultats obtenus pour ces 4 sous-groupes permettra de déterminer si l'âge est un facteur déterminant dans l'intensité de l'induction du CYP1A2 par l'oméprazole.

Pour déterminer le niveau d'induction du CYP1A2 produite par un traitement de 8 semaines à l'oméprazole (0,5 à 1,4 mg/kg/jour), des TRC seront réalisés aux semaines 2, 4 et 8 en plus du premier test réalisé avant le début du traitement. Ceci permettra de caractériser le niveau d'induction en fonction de la durée du traitement, et d'évaluer le niveau d'induction à chaque visite par comparaison aux observations de la visite du jour 1 mais également à celui des autres visites. De cette façon, un suivi longitudinal de chaque patient sera réalisé.

La régression de l'induction sera déterminée par le TRC qui est réalisé à la semaine 12, 4 semaines après l'arrêt du traitement. Si l'induction est prolongée, la valeur de l'activité du CYP1A2 sera toujours significativement différente de la valeur obtenue au jour 1. Si la régression de l'induction est remarquée après l'arrêt du traitement, l'activité du CYP mesuré par le TRC à la semaine 12 sera comparable à la valeur initiale, au jour 1.

Les patients qui accepteront de participer à l'épreuve de pharmacocinétique devront se soumettre à des prises de sang. En effet, la seule méthode permettant de déterminer ces paramètres est de mesurer la concentration plasmatique en oméprazole en fonction du temps. Les concentrations plasmatiques d'oméprazole en fonction du temps permettront de calculer les paramètres pharmacocinétiques de façon non compartimentale. De plus, l'analyse des données sur le logiciel Adapt-II suivi d'une analyse utilisant le logiciel IT2S établira le modèle approprié (1 ou 2 compartiments, avec ou sans temps de latence) pour une analyse de pharmacocinétique de population.

#### 4.0 LE REFLUX GASTRO-ŒSOPHAGIEN CHEZ L'ENFANT

En pédiatrie le reflux gastro-œsophagien (RGO) s'impose actuellement comme le trouble alimentaire le plus fréquent de la petite enfance. Le RGO, défini comme une condition clinique symptomatique ou un changement dans la structure du tissu résultant du reflux du contenu de l'estomac ou du duodénum dans l'œsophage, est fréquent dans l'enfance et souvent considéré comme banal et même "physiologique" avant 2 mois. Il

peut cependant revêtir des aspects cliniques graves et ses risques de complications ne doivent pas être négligés. La meilleure connaissance physiopathologique du RGO et les nouvelles techniques d'exploration permettent une surveillance et un traitement optimaux.

#### 4.1 PHYSIOPATHOLOGIE

Le reflux sans effort du contenu de l'estomac est observé chez environ 50% des nouveau-nés en bonne santé. Chez la majorité de ces enfants, le reflux disparaît pendant la première année de la vie quand ils commencent à ingérer plus de solides et lorsqu'ils se tiennent plus souvent assis et debout. Chez tous les enfants, le reflux sporadique après les repas est normal. Le reflux est dit pathologique lorsqu'il est associé à un trouble sous-jacent ou lorsqu'il est associé à un retard de croissance, une œsophagite ou une affection respiratoire.

Le RGO peut être dû à une baisse constante du tonus basal ou à des relaxations transitoires inappropriées du sphincter inférieur de l'œsophage (SIO). L'augmentation de la pression gastrique ou le retard à l'évacuation gastrique, notamment celle des repas liquides, pourrait être chez l'enfant responsable de reflux.

Comme pour beaucoup d'autres fonctions (développement psychomoteur, sommeil, nutrition, etc.), le nourrisson est un être immature. Ainsi le système anti-reflux de la partie basse de l'œsophage, à sa jonction avec l'estomac, peut-il se trouver "défaillant" pour des raisons anatomiques (système de soutien) et fonctionnelles (sphincter inférieur de l'œsophage dont le tonus peut être transitoirement insuffisant chez le petit nourrisson). Lorsque la barrière anti-reflux est défaillante, le liquide gastrique acide peut remonter dans l'œsophage et entraîner des phénomènes inflammatoires au niveau de celui-ci (œsophagite) dont le degré peut être variable, en fonction de l'importance du passage des sécrétions gastriques. La partie de l'œsophage intra-abdominale est courte chez le nourrisson et de ce fait beaucoup plus sensible aux variations de pression très fortes de l'abdomen, ce qui peut contribuer à faire refluer les aliments de l'estomac vers l'œsophage.

## 4.2 SYMPTOMES

Les manifestations du RGO sont identiques chez les enfants assez âgés et chez les adultes. À l'inverse, chez les enfants en bas âge les manifestations temporelles et spécifiques de la pathologie sont différentes. Chez les enfants plus âgés et les adultes, le reflux tend à être récurrent, en effet, le reflux est qualifié de chronique chez 50% de ces patients. Les symptômes associés à l'œsophagite de reflux sont plus souvent le pyrosis, la dysphagie, une bulbite épigastrique et l'hématémèse.

Un reflux gastro-œsophagien non compliqué du nourrisson a pour seules manifestations des régurgitations plus fréquentes en période post-prandiale ou au moment des rots, associées parfois à des vomissements, mais sans aucun retentissement sur la courbe de poids/taille de l'enfant, ni sur son comportement qui reste tout à fait normal tant le jour que la nuit. Avec le temps et les modifications du régime les choses semblent s'améliorer. Ceci est la situation heureusement la plus fréquemment rencontrée.

Par contre s'il existe des manifestations telles que des régurgitations excessives, un refus alimentaire ou une perte d'appétit, des symptômes respiratoires, des pleurs et une agitation pendant ou après les biberons, un mauvais gain de poids ou une perte de poids, des rejets de glaires et/ou de sang, une pâleur cutanéomuqueuse et une hyperextension du torse, le reflux peut être qualifié de pathologique.

## 4.3 EXPLORATION

Les moyens diagnostiques de RGO pathologique incluent la pH-métrie, qui consiste à l'enregistrement prolongé du pH dans l'œsophage. Les résultats sont exprimés à partir des données recueillies: pourcentage du temps passé au-dessous de pH 4, durée moyenne des épisodes de RGO, durée du reflux le plus long, nombre total d'épisodes de plus de 5 minutes. L'existence d'un RGO pathologique est déterminée sur des données quantitatives en référence à des valeurs "normales" recueillies chez des témoins sains. Un pourcentage de plus de 10% avant l'âge de un an et plus de 6% après cet âge est considéré comme pathologique. La sensibilité et la spécificité sont de 90-95 % sur

24 heures. Les enregistrements de longue durée permettent de rechercher le reflux dans toutes les circonstances physiologiques (repas, sommeil, différentes positions). La pH-métrie nocturne ou sur 24 heures revêt une importance majeure dans l'exploration des RGO à manifestations respiratoires chroniques ou à l'origine des malaises.

L'endoscopie et la biopsie œsophagienne distale permettent d'affirmer la présence d'une œsophagite (érosive voire ulcérée), d'une anomalie cardio-tubérositaire ou d'une complication (sténose, endobrachy œsophage), selon les normes acceptées par un groupe d'experts (8). En effet, l'endoscopie haute flexible est l'outil le plus sensible pour détecter des maladies des muqueuses chez les patients ayant des symptômes de RGO. Les indications d'une endoscopie varient chez les gastro-entérologues mais incluent majoritairement : (a) des évidences flagrantes suggérant une œsophagite, tel que l'hématémèse; (b) des difficultés alimentaires; (c) un échec ou une rechute après un traitement empirique visant à supprimer l'acide; ou (d) chez l'enfant plus âgé ayant des brûlure épigastrique (pyrosis) ou de la difficulté à avaler (dysphagie).

#### 4.4 TRAITEMENT

Les buts du traitement sont de reconstituer la compétence du système anti-reflux, de neutraliser le reflux acide et d'augmenter la résistance de la muqueuse œsophagienne.

Lorsque le diagnostic du médecin met en évidence un RGO pathologique, la première étape du traitement implique une explication aux parents, indiquant que le reflux est un phénomène normal chez les nourrissons. Ensuite, des mesures diététiques simples comme une alimentation plus fréquente avec des portions plus petites et plus consistantes peuvent être utiles. De plus, des mesures de positionnement peuvent aussi aider, par ceci on entend une élévation de la tête et/ou un positionnement à 30°. Pour des enfants qui ont des complications de reflux plus grave qui ne répond pas à des mesures simples, un traitement médicamenteux peut être nécessaire. Celui-ci consiste généralement, comme première étape, en un agent procinétique, tel la domperidone ou le métoclopramide. Lorsque les patients ne répondent pas positivement à ces dernières mesures la deuxième étape médicamenteuse implique un agent bloqueurs H<sub>2</sub> tel la

cimétidine ou la ranitidine. Dans le cas de patients ne répondant pas bien à aucune de ces mesures, la guérison nécessitera peut-être une suppression de l'acidité plus forte à l'aide d'un inhibiteur de la pompe à proton tel que l'oméprazole. La chirurgie sera considérée dans les cas compliqués ou le RGO est persistant (8).

## 5.0 L'OMÉPRAZOLE: INHIBITEUR DE LA POMPE À PROTONS

### 5.1 LA POMPE A PROTON

La pompe à protons est l'enzyme responsable de la dernière étape de la production d'acide chlorhydrique dans l'estomac. Il y a trois mécanismes menant à la production d'acide par la cellule pariétale, ce sont ceux qui impliquent : le récepteur muscarinique de type 2 et 3 à l'acétylcholine, le récepteur à la gastrine et le récepteur de type 2 à l'histamine (9). Ces trois mécanismes d'action interagissent et se recoupent de façon significative. La vue, la senteur et le goût de la nourriture sont des stimuli qui induisent la sécrétion de l'acétylcholine. De façon similaire, la présence de nourriture dans l'estomac induit la sécrétion de la gastrine et de l'histamine. Le mécanisme menant à la production d'acide dans l'estomac est initié lorsque ces molécules se lient à leurs récepteurs situés sur la paroi de la cellule (Figure 1).

La vue, l'odeur et le goût de la nourriture sont responsables de la salivation et de la stimulation du nerf vague ce qui conduit à la libération d'acétylcholine. Lorsque l'acétylcholine se lie à son récepteur, la perméabilité aux ions calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) de la cellule pariétale est modifiée pour laisser entrer les ions. L'augmentation du nombre d'ions  $\text{Ca}^{++}$  à l'intérieur de la cellule a pour effet d'activer la phosphokinase intracellulaire. Lorsque la pompe à proton ( $\text{H}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ ) est inactivée, elle est située dans des vésicules tubulaires présents dans le cytoplasme de la cellule pariétale près du canalicule sécrétoire. L'accroissement de l'activité de la phosphokinase a pour effet d'activer la pompe à proton. Après stimulation, la pompe à proton activée migrera et se fusionnera avec la membrane apicale, augmentant de ce fait le nombre de microvillosités sur la paroi du canalicule sécrétoire exposée aux ions potassium ( $\text{K}^+$ ). La pompe à proton échange donc un ion potassium contre un ion hydrogène ( $\text{H}^+$ ). Les ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) vont diffuser à travers la cellule pariétale à partir de la circulation

sanguine vers le canalicule sécrétoire où ils se combinent avec les ions  $H^+$  pour former l'acide chlorhydrique (HCl).

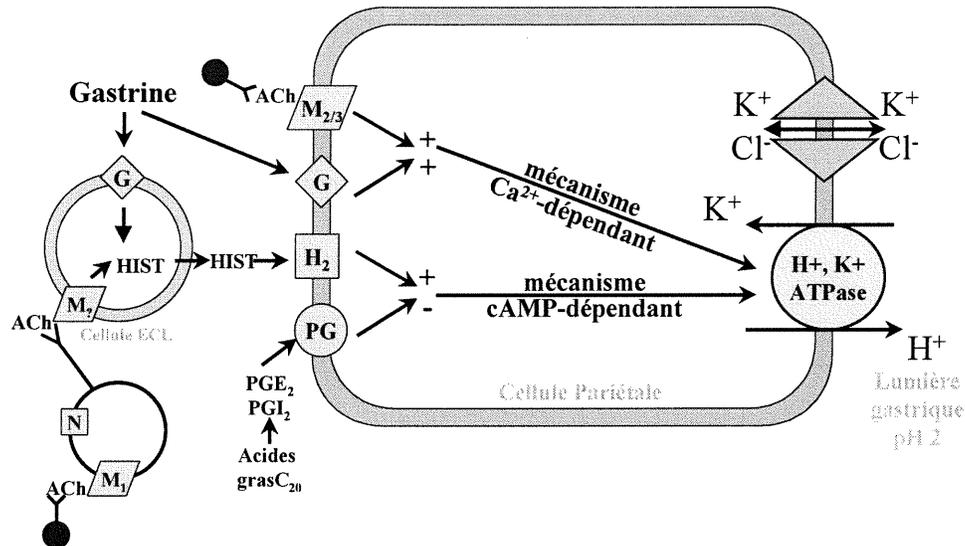


Figure 1 : Sécrétion d'acide gastrique par la cellule pariétale gastrique.  
 $M_{2/3}$  : récepteur muscarinique de type 2 ou 3; G: récepteur à la gastrine;  
 $H_2$  : récepteur à l'histamine de type 2.

La gastrine est un autre agent stimulant de la sécrétion d'acide gastrique par l'ATPase ( $H^+$ ,  $K^+$ ). En effet, la digestion stimule chimiquement la libération de gastrine provenant de la cellule G située dans l'estomac. La distension de l'estomac cause la libération d'acétylcholine par le nerf vague et ceci stimule la cellule G à produire davantage de gastrine. La gastrine est véhiculée par la circulation sanguine et se lie au récepteur à la gastrine sur la cellule pariétale gastrique. Lorsque la gastrine se lie à son récepteur, la perméabilité aux ions calcium ( $Ca^{++}$ ) de la cellule pariétale est modifiée pour laisser entrer les ions. Une augmentation de la concentration en ions  $Ca^{++}$  à l'intérieur de la cellule a pour effet d'activer la phosphokinase intracellulaire, qui à son tour, activera la pompe à proton pour produire de l'acide chlorhydrique.

La présence d'acétylcholine et de gastrine libérées lors de la digestion a également pour effet de stimuler la cellule ECL (enterochromaffin-like cell) pour lui faire libérer de l'histamine. De façon similaire, lorsque l'histamine se lie à son récepteur sur la paroi de

la cellule pariétale, la perméabilité aux ions calcium est augmentée et le même mécanisme final produit l'acide chlorhydrique dans le lumen de l'estomac.

## 5.2 MÉCANISME D'ACTION DE L'OMÉPRAZOLE

Puisque l'oméprazole est une base faible avec un pKa de 8.8, cette molécule aura tendance à se concentrer dans les compartiments acides, tel le canalicule sécrétoire de la cellule pariétale où le pH est inférieur à 4. Au pH physiologique, l'oméprazole peut facilement traverser les membranes biologiques. Cependant, dans les compartiments acides de la cellule pariétale, il gagnera un proton ce qui le rend plus polaire et, par le fait même, il ne pourra pas retraverser la membrane biologique. À l'intérieur du canalicule sécrétoire de la cellule pariétale, le pH est d'environ 1 et l'oméprazole pourra donc s'y concentrer par un facteur de 1000. Dans un tel environnement acide, l'oméprazole subira un réarrangement intramoléculaire qui le transformera en un sulfynamide. Cette nouvelle molécule réagira rapidement avec un groupement sulfhydryl (Cys 813 ou 822 et Cys 892) de la pompe à proton ( $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase) qui se rend accessible via le lumen lorsqu'elle est activée (10). Un pont disulfure est formé entre l'inhibiteur et l'enzyme, donnant lieu à une inhibition prolongée de la pompe à protons (voir Figure 2). Il a été prouvé que l'environnement acide était essentiel à l'effet inhibiteur de l'oméprazole. En effet, l'oméprazole est efficace seulement dans les conditions où l'acide s'est accumulé dans le lumen vésiculaire (10).

Deux facteurs importants contribuent à la sélectivité d'action de l'oméprazole sur la pompe à proton : (1) ses propriétés physico-chimiques intrinsèques qui font qu'il sera piégé à l'intérieur du compartiment acide de la cellule et donnera lieu à la formation subséquente de l'inhibiteur actif ; (2) le positionnement restreint de l'enzyme ciblé, la pompe à proton, à la membrane apicale de la cellule pariétale, qui se retrouve à proximité de la formation de l'inhibiteur actif.

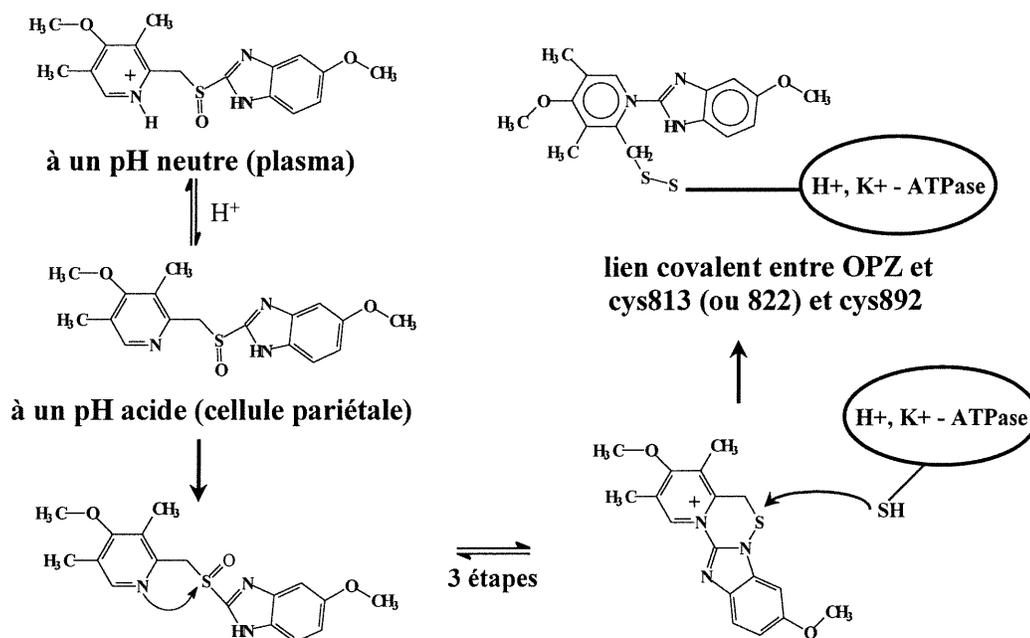


Figure 2: Devenir de l'oméprazole dans l'organisme. Protonation du médicament à un pH acide, suivi d'une transformation intramoléculaire en 3 étapes pour générer un dérivé sulfénamide qui se liera de façon covalente par un pont disulfure à un résidu cystéine de la pompe à protons.

### 5.3 PHARMACOCINÉTIQUE CHEZ L'ADULTE

L'oméprazole est sensible à la dégradation en milieu acide. Il est donc administré en formulations visant à éviter le contact de l'acide présent dans l'estomac, ce qui diminuait considérablement sa biodisponibilité. Il existe sous forme de capsules ou de comprimés composés de granules enrobés qui se solubilisent seulement à pH = 6 (duodénum). Avec cette formulation, l'oméprazole a une biodisponibilité d'environ 40% pour une dose unique et qui augmente jusqu'à 65% environ pour des doses répétées, ce qui indique que la suppression de l'acide gastrique réduit la dégradation du médicament avant son absorption. Il est rapidement absorbé avec un pic plasmatique normalement compris entre 1 et 3 heures après l'ingestion. La liaison aux protéines plasmatiques est très forte (95%). Il subit un métabolisme de premier passage quantitativement important au niveau du foie par les isoenzymes CYP2C19 et CYP3A4, ce qui lui confère sa courte demi-vie plasmatique de 40 à 60 minutes. Son métabolisme dans le foie donne le 5'-hydroxyoméprazole (par CYP2C19) et l'oméprazole sulfone (CYP3A4)

qui ne sont ni l'un ni l'autre actif pharmacologiquement. Puisque le lien formé entre l'inhibiteur et l'enzyme est un lien covalent stable, la durée d'action de l'oméprazole sera prolongée, de 24h environ, malgré sa courte demi-vie. L'effet antisécrétoire de cette molécule ne dépend donc pas de sa concentration maximale plasmatique mais est directement relié à l'aire sous la courbe de la concentration plasmatique. L'élimination est principalement rénale, et environ 70 - 80% des métabolites primaires et/ou secondaires sont retrouvés dans les urines et 20 - 30% dans les fèces.

#### 5.4 PHARMACOCINÉTIQUE CHEZ L'ENFANT

Les connaissances de la pharmacocinétique de l'oméprazole en pédiatrie sont encore très fragmentaires. Jusqu'à présent, seulement 3 publications rapportent des données de pharmacocinétique dans cette population.

En 1992, Kato et al. (4) ont étudié les paramètres de pharmacocinétique aux jours 1 et 7 chez deux enfants (patient 1: garçon âgé de 4 ans et patient 2: garçon âgé de 10 ans) recevant 10 mg et 20 mg per os par jour respectivement. Ils ont observé une absence d'accumulation de l'oméprazole entre les jours 1 et 7. De plus, une augmentation des valeurs d'AUC entre ces deux jours était notable sans que les valeurs de concentration maximale,  $t_{max}$  et  $t_{1/2}$  soit affectées de façon significative après 7 jours de traitement. Au septième jour, les concentrations plasmatiques maximales étaient de 361 et 1815 ng/mL, le  $t_{max}$  était de 1.5 h pour les deux patients, l'AUC de 921 et 3668 ng·h/mL et le temps de demi-vie de 1.1 et 1.4 h respectivement.

Une étude portant sur la pharmacocinétique de l'oméprazole par voie intraveineuse a été conduite en 1994 (5) chez 13 enfants âgés de 4 mois à 19 ans. Les paramètres pharmacocinétiques chez ces enfants, exprimés par la médiane (écart-type), étaient les suivants : ASC: 4.86 (5.30) ng·h/mL; clairance systémique : 0.23 (0.32) l/kg·h; volume de distribution : 0.45 (0.17) l/kg; temps de demi-vie: 0.86 (0.88) h. Une grande variabilité interindividuelle a été observée et aucune corrélation entre l'âge ou la dose et la clairance ou le volume de distribution n'a pu être établie dans cette population. Il a été aussi rapporté que la dose administrée, les variations de fonctions hépatiques et

rénales et les différentes thérapies qui sont associées chez ces patients pouvaient contribuer à ces différences interindividuelles. Cette étude démontre néanmoins que les paramètres obtenus à partir des doses utilisées sont similaires à ceux obtenus dans les populations adultes.

Par ailleurs, Kato et al. ont étudié sept enfants entre les jours 7 et 30 de traitement et ont obtenu les paramètres suivants: concentration maximale à  $851 \pm 265$  ng/mL, temps maximale à  $1,5 \pm 0,1$  h, une aire sous la courbe de  $1864 \pm 675$  ng·h/mL et le temps de demi-vie de  $0,9 \pm 0,1$  h (6).

## 6.0 OMÉPRAZOLE ET LES CYTOCHROMES P450

### 6.1 ROLE DES CYTOCHROMES P450

Il est commun de différencier deux types de réactions métaboliques impliquées lors de la biotransformation des xénobiotiques. Le métabolisme de phase I correspond essentiellement à des réactions d'oxydo-réduction, à des transferts de groupements et à des réactions d'hydrolyse. Les réactions de phase II sont des réactions synthétiques. Au cours de ces réactions, la molécule parent (si elle possède les groupements fonctionnels nécessaires: OH, R-NH<sub>2</sub>, etc.) ou les métabolites issus de la phase I, seront conjugués avec des entités polaires, comme l'acide glycuronique, l'ion sulfate, les acides aminés ou le glutathion pour former des conjugués encore plus polaires. Dans la grande majorité des cas, les métabolites sont des composés moins actifs ou inactifs comparativement au composé parent. Ils seront plus hydrophiles et par le fait même, plus facilement excrétés par voie rénale ou biliaire.

Les enzymes de la super famille des CYP450 sont impliqués dans les réactions de phase I du métabolisme des médicaments. Ils représentent une super famille d'enzymes appartenant à la classe des hémoprotéines et, jusqu'à présent, 13 familles différentes ont été rapportées chez les humains. Chaque famille comprend une ou plusieurs sous-familles (22 au total), et chaque sous-famille contient une ou plusieurs isoforme CYP spécifique (plus de 60 au total). Chaque isoforme démontre une spécificité de substrat particulier. En effet, des substrats différent chimiquement et appartenant à des classes

pharmacologiques différentes peuvent être métabolisés par la même enzyme ce qui démontre une spécificité de substrats assez large pour chacune des isoformes. La similitude dans les séquences d'acides aminés de la protéine détermine à quelle famille ou sous-familles elles appartiennent. Les protéines appartiennent à une même famille lorsque au moins 40% de leur enchaînement d'acides aminés sont identiques. Les protéines appartiennent à une même sous-famille lorsque au moins 55% de leur enchaînement d'acides aminés sont identiques. En terme de nomenclature, les familles sont identifiées par des nombres, les sous-familles par des lettres majuscules.

En plus de leur implication dans le métabolisme des médicaments, les CYP participent également au métabolisme de certaines substances endogènes tels des stéroïdes, des acides gras et des prostaglandines ; ce métabolisme étant probablement la fonction originale de ces enzymes. Néanmoins, pour ce qui a trait au métabolisme des médicaments, 3 familles (CYP1, CYP2 et CYP3) et, plus précisément, 6 isoformes différent (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4) sont majoritairement impliquées. Dans tous les cas, il est possible de prédire, avec un bon degré de confiance, si deux médicaments risquent ou non d'interagir entre eux au niveau des CYP en sachant : (a) quelle(s) enzyme(s) est(sont) principalement responsable(s) du métabolisme des médicaments; (b) la contribution relative de ces enzymes au métabolisme total des médicaments; (c) l'affinité relative de ces médicaments pour les CYP en question; et (d) la concentration relative des médicaments aux sites de métabolisation. Si deux médicaments sont métabolisés par le même CYP, une inhibition compétitive est à prévoir et le métabolisme de la molécule ayant une plus petite affinité pour le CYP en question risque d'être inhibé.

La variabilité interindividuelle du métabolisme des médicaments est un facteur crucial de la pharmacothérapie. Le facteur génétique contribue particulièrement à cette variabilité interindividuelle. Des mutations sur les gènes des enzymes qui métabolisent les médicaments peuvent donner lieu à l'expression d'enzymes ayant une activité métabolique soit plus grande, soit moindre ou nulle. Certaines enzymes de la superfamille CYP, tel le CYP2C19 et le CYP2D6, montrent un polymorphisme génétique. Le polymorphisme génétique s'explique par la présence, chez certains

individus, de gènes différents qui codent pour des protéines différentes. Ces protéines, similaires à celles du CYP450 connu, à l'exception de certaines mutations, peuvent avoir des activités différentes. En effet, à cause de certaines mutations sur le gène, l'activité de l'enzyme peut être supérieure, inférieure ou nulle comparativement à celle du CYP450.

La plupart des isoformes du CYP450 sont inductibles, ce qui a pour effet d'augmenter la vitesse du métabolisme des substrats de l'enzyme. Finalement, le fait qu'un substrat soit métabolisé par une certaine isoforme de CYP n'exclut pas complètement la possibilité que ce substrat puisse inhiber ou induire un autre enzyme CYP, qui n'est pas impliquée dans son métabolisme. Rappelons que l'induction consiste en une néosynthèse protéique en réponse à l'exposition de l'organisme à un agent chimique particulier.

## 6.2 L'IMPLICATION DU CYTOCHROME P450 2C19

Comme mentionné plus haut, l'oméprazole subit un métabolisme de premier passage important, et plusieurs études ont été menées sur le sujet. L'enzyme majoritairement responsable du métabolisme est le CYP2C19, une enzyme à laquelle un polymorphisme génétique important est associé. Ceci veut également dire qu'à l'intérieur d'une même population, certains individus vont métaboliser l'oméprazole plus rapidement, les métaboliseurs rapides (MR), que d'autres, les métaboliseurs lents (ML). Ces ML auront des concentrations plasmatiques et des ASC nettement supérieures, de l'ordre de 5 fois supérieur à celles des MR (11). De plus, le temps de demi-vie sera généralement 3 fois plus grand pour les ML que pour l'individu appartenant à la population des métaboliseurs intermédiaires (11). L'incidence des ML du CYP2C19 chez les Caucasiens est assez rare (3 à 5 %), chez les sujets d'origine asiatique, tels les Japonais, les Chinois et les Coréens, l'incidence est nettement plus élevée, elle se situe entre 15 et 17% de l'effectif de ces populations. (12, 13)

La 4-hydroxylation de la *S*-méphénytoïne a été utilisée pour distinguer les phénotypes ML et MR. Bien que la méphénytoïne ait été la première molécule utilisée comme sonde pour étudier le polymorphisme du CYP2C19 et que son utilisation soit encore très

répandue, son utilisation est limitée par ses effets secondaires, en particulier la sédation qu'elle cause chez les ML, les enfants et les gens âgés. Puisque l'oméprazole est un substrat spécifique pour le CYP2C19, il pourrait être également utilisé comme sonde métabolique pour déterminer l'activité du CYP2C19. L'oméprazole peut donc remplacer la *S*-méphénytoïne comme sonde pour le phénotypage du CYP2C19 (14).

### 6.3 L'IMPLICATION DU CYTOCHROME P450 3A4

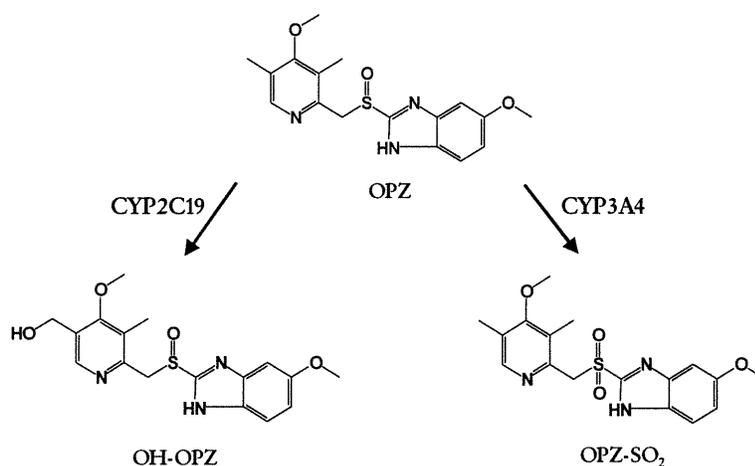


Figure 3: Schéma métabolique de l'oméprazole.

La formation du métabolite primaire majeur de l'oméprazole, le 5'-hydroxyoméprazole, est dépendant de l'activité du CYP2C19, alors que la formation de l'oméprazole sulfone, un autre métabolite primaire, dépend du CYP3A4 (15) (figure 3). Cependant, l'affinité de l'oméprazole pour le CYP3A4 est approximativement 4 fois moins grande que pour le CYP2C19. Ceci signifie que l'oméprazole peut potentiellement interagir avec le métabolisme d'autres substrats du CYP2C19 mais pas avec des substrats du CYP3A4. En effet, le CYP3A4 est l'isoforme du CYP qui est probablement la plus impliquée dans le métabolisme des médicaments parce qu'environ 60% des médicaments utilisés à l'heure actuelle, sont métabolisés par ce CYP. De plus, il possède une spécificité de substrats très large, c'est l'isoforme la plus exprimée dans le foie, il est induit par plusieurs médicaments d'usage commun et il est exprimé aussi, de façon significative,

dans l'intestin. Plusieurs études ont été menées pour déterminer l'effet de l'oméprazole sur l'expression de ce CYP et les résultats démontrent que l'oméprazole n'a aucun effet sur le métabolisme des substrats du CYP3A4.

#### 6.4 L'IMPLICATION DU CYTOCHROME P450 1A2

Si les CYP450 peuvent être sujets à des phénomènes d'inhibition (compétitives ou non), la plupart d'entre eux peuvent également être induits par une variété d'agents. L'induction d'une enzyme CYP450 est un processus lent et régulé qui a comme effet de réduire la concentration plasmatique des médicaments métabolisés par ces enzymes et par le fait même peut en compromettre l'efficacité à long terme. Le mécanisme d'induction du CYP1A est un des seuls mécanismes qui soit complètement compris. Dans le cas du CYP1A, l'agent inducteur se lie avec le récepteur d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (récepteur Ah) dans le cytosol avant de migrer vers le noyau. Le processus de transcription comprend à une série d'événements menant à la production de l'ARNm approprié et à la translation de la protéine correspondante (16).

L'induction du métabolisme des médicaments par une telle enzyme peut devenir préoccupante en ce qui concerne les répercussions cliniques. Premièrement, l'induction réduira l'effet pharmacologique de certains médicaments par l'augmentation de leur métabolisme. Ensuite, l'induction peut créer un déséquilibre indésirable entre les mécanismes d'activation et de détoxification liés au métabolisme.

La première étude sur l'effet inducteur de l'oméprazole sur le CYP1A a été conduite *in vitro* par Diaz et al. en 1990 (17). Les auteurs ont démontré que l'oméprazole est un inducteur des CYP1A dans une culture d'hépatocytes humains. En plus de démontrer que l'oméprazole n'avait aucun effet sur la demi-vie du CYP1A2, ils ont montré que l'oméprazole augmente la synthèse *de novo* de la protéine. Ces observations ont été appuyées par une étude chez cinq patients traités avec l'oméprazole.

Cette première étude a créé beaucoup d'intérêt et posé plusieurs questions auxquelles plusieurs chercheurs ont voulu répondre. En effet, à la suite de cette publication, un

éditorial a paru dans le journal *Gastroenterology* faisant le bilan des conséquences d'une telle induction. Les auteurs en viennent à la conclusion que les implications biologiques de cette induction dépendront de l'ampleur de l'exposition environnementale à certains produits chimiques ainsi qu'à l'ampleur de l'induction individuelle des patients traités avec l'oméprazole (18). En réponse à cet éditorial, Parkinson et Hurwitz ont écrit une lettre rapportant qu'il est exagéré de craindre qu'un traitement prolongé à l'oméprazole puisse causer un risque de malignité. Selon eux, aucune étude n'appuie cette crainte. Au contraire, ils disent avoir raison de croire que l'induction de la famille du CYP1A apporte une protection contre la carcinogenèse par les produits chimiques (19). Deux autres lettres vont ensuite paraître dans le journal *Gastroenterology* (20, 21). Ces articles critiquent le travail de Diaz et al. en stipulant que la distribution du CYP1A2 dans le foie n'est pas uniforme et donc que les deux échantillons de tissus hépatique, obtenus par deux techniques différents, aurait été pris à des endroits différents.

Ensuite, Andersson et al. ont montré, en utilisant les rapports métaboliques urinaires de la caféine comme indice de l'activité du CYP1A2, que l'oméprazole n'affectait aucunement le métabolisme de la caféine. Ils ont mis en oeuvre une étude clinique randomisée en chassé croisé, contrôlée par un placebo, à double insu chez 10 sujets sains. Chaque sujet recevait un traitement de une semaine avec 20 mg d'oméprazole par jour et une semaine de traitement avec un placebo. Ces deux périodes étaient séparées par une période d'abstinence thérapeutique de 2 à 3 semaines. Des échantillons d'urine ont été collectés aux jours 6 et 7 de chaque période de traitement (22). À l'opposé, McDonnell et al. ont prouvé l'induction de la famille du CYP1A par l'oméprazole dans le tractus digestif chez l'humain (23).

À la suite de ces premières études, Daujat et al. ont vérifié que l'oméprazole, inducteur de la famille CYP1A, n'est pas un ligand du récepteur Ah (24). Une autre étude a également démontré que l'oméprazole avait un pouvoir d'induction sur le CYP1A1 (25).

Rost et al. ont confirmé que l'oméprazole administré à des adultes à raison de 40 mg par jour avait un effet inducteur sur l'activité du CYP1A2 chez les ML de la *S*-méphénytoïne, tandis que l'effet était mineur chez les MR de la *S*-méphénytoïne. Ces

chercheurs utilisaient le TRC avec la  $^{13}\text{C}$ -[*N*-3-méthyl]-caféine comme indice de l'activité du CYP1A2. Suite à cette étude, le même groupe a confirmé ces résultats en utilisant les rapports métaboliques urinaires, qui coïncidaient avec la clairance plasmatique de la caféine et le TRC (26). De plus, ces auteurs ont mis en évidence que des doses de 120 mg par jour d'oméprazole induisent l'activité du CYP1A2 de façon significative (25,0% à 32,1%) chez les métaboliseurs lents de la *S*-méphénytoïne. Puisque certains auteurs ont critiqué ces premières études surtout à cause du fait qu'aucun groupe contrôle n'avait été utilisé, (21), le groupe de Nousbaum et al. a mis en place une étude clinique avec 13 sujets traités avec oméprazole 20 mg par jour pendant 28 jours et 13 sujets servant de groupe contrôle. En utilisant les rapports métaboliques plasmatiques, ces auteurs ont pu prouver que l'oméprazole induisait de façon significative l'activité du CYP1A2 chez les patients après 28 jours de traitement. Aucun changement significatif dans l'activité du CYP1A2 dans le groupe contrôle n'a été trouvé (27).

Par la suite, d'autres groupes de chercheurs ont trouvé des résultats qui étaient en contradiction avec les études précédentes. La première étant réalisée en 1994 sur 10 sujets adultes sains, utilisait la cinétique de la phénacétine comme marqueur de l'activité du CYP1A2. Les résultats ont montré qu'un traitement de 8 jours avec 20 mg d'oméprazole pris au coucher n'affectait pas la vitesse de conversion de la phénacétine en paracétamol (réaction catalysée par le CYP1A2) (28).

Une autre étude démontre qu'un traitement de 1 ou 3 semaines à l'oméprazole à raison de 20 mg par jour n'affectait pas de façon significative le métabolisme de la caféine chez 12 adultes sains (29). Plus récemment, le groupe de recherche et développement clinique de Astra en Suède a également démontré qu'un traitement de 7 jours avec 20 mg d'oméprazole par jour n'affectait pas le métabolisme de la caféine chez les ML et les MR. Ils ont utilisé le TRC et les rapports métaboliques urinaires de la caféine (30). De plus, Dilger et al. ont montré l'absence d'interaction entre les IPP, oméprazole, lansoprazole et pantoprazole, et le métabolisme de la théophylline selon leur protocole (31).

La plus récente étude à paraître sur le sujet est celle de Rost et al en 1999. Ils rapportent que l'oméprazole est un faible inhibiteur de l'activité du CYP1A2. Leur protocole utilise un groupe recevant une seule dose de 40 mg d'oméprazole et un groupe contrôle recevant un placebo, administré 30 minutes avant une dose de 3 mg/kg de caféine. Des échantillons sanguins, pour déterminer la concentration d'oméprazole et de caféine, sont prélevés avant l'administration de la dose et jusqu'à 12 heures après. Les paramètres de pharmacocinétique des ces sujets ont été comparés entre eux (32).

Comme les différents résultats des études l'indiquent, l'effet inducteur de l'oméprazole sur l'activité du CYP1A2 est très controversé. De plus, l'implication clinique d'une induction de l'activité de cette isoforme du CYP est également très controversée. Certains auteurs n'associent aucune pertinence clinique tandis que d'autres y associent un risque de carcinogénèse plus élevé.

Le CYP1A2, avec le CYP1A1, était préalablement désigné sous le nom cytochrome P448. Le CYP1A2 est induit chez les fumeurs par les hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans la fumée de cigarette. Il peut également être induit chez les consommateurs de viandes grillées au charbon de bois et par une grande consommation de légumes de la famille des cruciféracées. Il a été démontré *in vitro* que les CYP1A convertissent des pré-carcinogènes en carcinogènes actifs, et, par le fait même, l'opinion sur le fait que l'induction des CYP1A pourrait entraîner un risque accru de développer un cancer, est controversé depuis plusieurs années. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines et amides aromatiques sont quelques substrats connus des CYP1A1 et CYP1A2 respectivement. De telles biotransformations peuvent résulter en une désactivation, mais également à la formation de carcinogènes ultimes qui se sont montrés expérimentalement responsables de l'induction de certaines tumeurs. En pratique, le résultat d'une induction du CYP1A est difficile à évaluer ; il dépendra d'une multitude de facteurs externes tel que le statut métabolique et les facteurs environnementaux.

## 7.0 TEST RESPIRATOIRE À LA CAFÉINE $^{13}\text{C}$

### 7.1 APERÇU MÉTHODOLOGIQUE ET MÉTABOLIQUE

Cette méthode consiste à mesurer l'évolution en fonction du temps, du rapport  $\text{CO}_2$  marqué/ $\text{CO}_2$  non marqué, qui apparaît dans le gaz expiré après administration de caféine marquée avec l'isotope stable du carbone, le  $^{13}\text{C}$ . En effet la caféine marquée est métabolisée (déméthylation) par le CYP1A2 lors de son passage au niveau hépatique. Au cours de cette réaction enzymatique, il se forme du formaldéhyde qui est lui-même oxydé en acide formique puis dioxyde de carbone. Le  $\text{CO}_2$  marqué ainsi produit s'équilibre avec le pool de bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) avant de se mélanger au  $\text{CO}_2$  total normalement produit puis éliminé par expiration. La figure 4 représente les trois voies principales de la déméthylation de la caféine (aux positions 1, 3 et 7). En réalité, le métabolisme est beaucoup plus complexe car la théobromine, la théophylline et la paraxanthine sont à leur tour déméthylées et génèrent du  $\text{CO}_2$  (Figure 5). La molécule de caféine produit ainsi 3 molécules de  $^{13}\text{CO}_2$ . Il en résulte un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  total expiré, et le taux de formation du  $^{13}\text{CO}_2$  reflète par conséquent le taux de *N*-déméthylation du substrat. Le TRC permet de déterminer l'activité de CYP1A2 puisque la *N*-déméthylation aux positions 1, 3 et 7 de la molécule administrée, la  $^{13}\text{C}$ -[*N*-1,3,7-méthyl]-caféine, est catalysée de façon spécifique (à 90%) par le CYP1A2. La  $^{13}\text{C}$ -[*N*-1,3,7-méthyl]-caféine est donc une sonde métabolique spécifique du CYP1A2 (7, 33).

La caféine est généralement administrée en solution aqueuse et les doses sont habituellement adaptées au poids du patient (3mg/kg). De cette façon, la caféine est rapidement absorbée à travers la muqueuse digestive et la biodisponibilité de cette solution est égale à 1. L'enrichissement isotopique du  $\text{CO}_2$  expiré est observé rapidement (15 minutes) et continue à augmenter pendant la première heure suivant la prise de la dose de substrat marqué. L'enrichissement observé reste ensuite pratiquement stable pendant 5 heures (34). Ceci tient compte de la saturation des sites enzymatiques par le substrat. Un des avantages du TRC est que la caféine a été largement étudiée. Il a été démontré qu'elle est sans danger lorsqu'elle est administrée en faibles doses chez l'humain quel que soit l'âge.

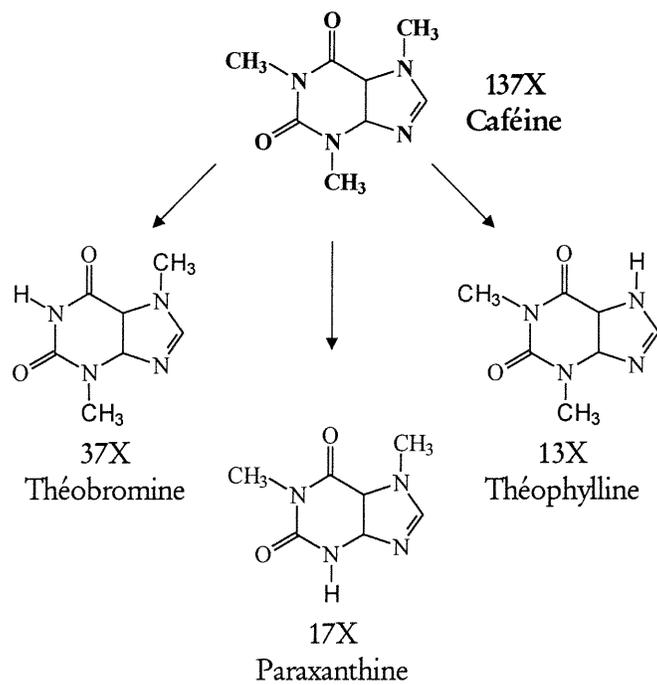


Figure 4: Déméthylation de la caféine aux positions 1, 3 et 7.

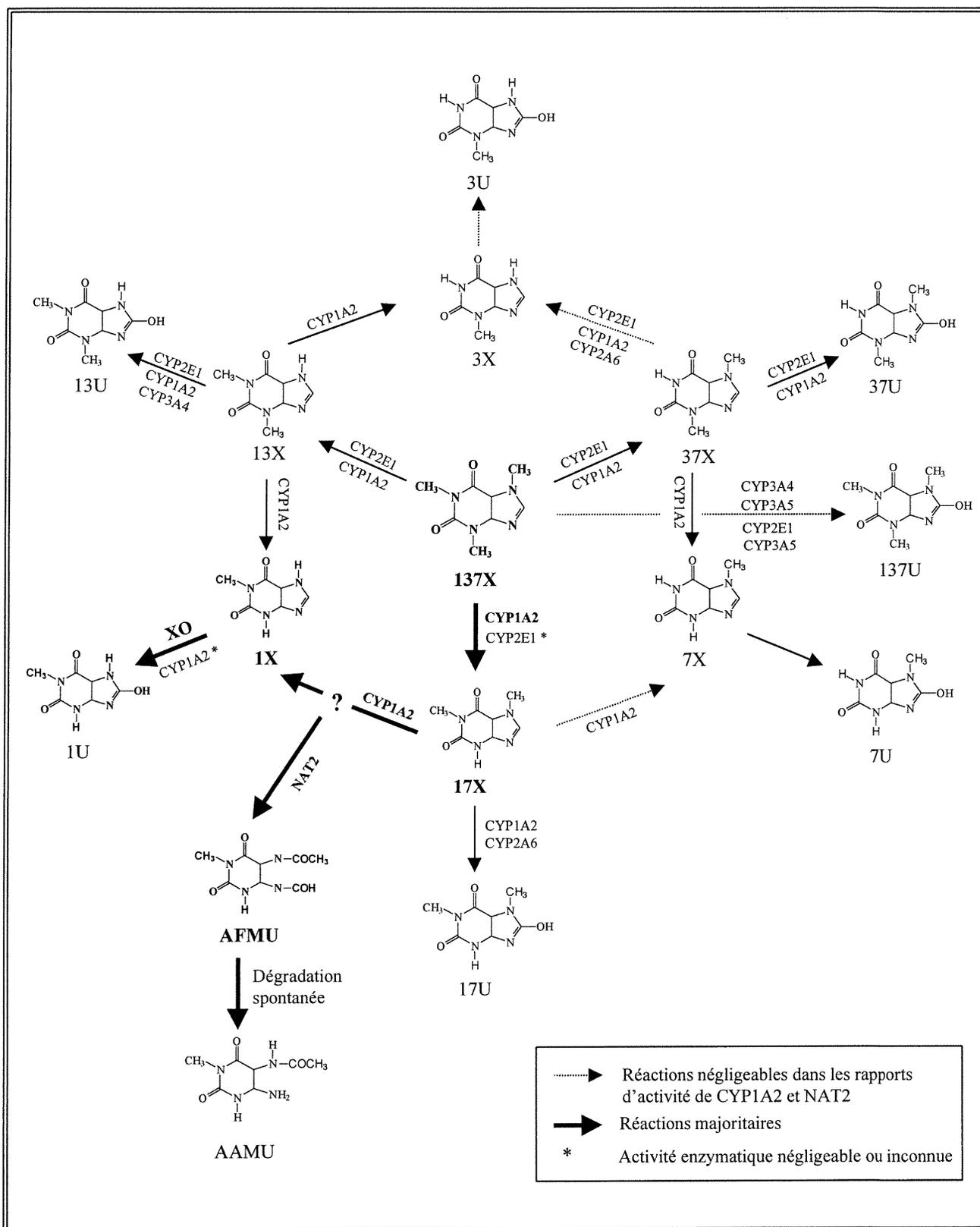


Figure 5: Schéma métabolique complet de la caféine

De plus, le TRC est un test qui peut très bien être effectué chez des enfants (34). Lambert H. et al. ont démontré que le score du TRC, exprimé en termes de  $^{13}\text{CO}_2$  cumulé sur 2h, générerait des résultats comparables à ceux obtenus dans une population adulte. Ils ont montré que la dose de caféine (3mg/kg) était bien tolérée par tous les sujets et ne modifiait pas de façon significative leur signes vitaux. Finalement, ils ont conclu que le TRC peut être un outil de recherche utile dans le domaine de la pharmacologie et toxicologie pédiatrique puisque ce test ne comporte pratiquement aucun risque. Il est vrai que le TRC, permettant le phénotypage de l'activité du CYP1A2 chez les enfants, combine les avantages d'un test non invasif, non radioactif, non toxique, facile à conduire avec une méthode de mesure spécifique, rapide, précise et exacte.

## 7.2 MESURE DE L'ABONDANCE ISOTOPIQUE DU $\text{CO}_2$

L'abondance isotopique du  $\text{CO}_2$  se mesure par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse isotopique (GC-IRMS). Cet appareil exploite le fait que les isotopes ont des masses atomiques différentes. En plus du carbone 12 ( $^{12}\text{C}$ ) qui représente 98,892% du carbone, le carbone possède un isotope stable, le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) qui est présent à 1,108% dans la nature. L'oxygène possède trois isotopes stables, l'oxygène 16 ( $^{16}\text{O}$ ), l'oxygène 17 ( $^{17}\text{O}$ ) et l'oxygène 18 ( $^{18}\text{O}$ ) ont des abondances respectives de 99,7585%, 0,0374% et 0,2039%. En tenant compte de ces isotopes, la combinaison d'un atome de carbone avec deux atomes d'oxygène donne lieu à l'existence de plusieurs d'isotopomères.

Masse 44	$^{16}\text{O}$	$^{12}\text{C}$	$^{16}\text{O}$
Masse 45	$^{16}\text{O}$	$^{13}\text{C}$	$^{16}\text{O}$
	$^{17}\text{O}$	$^{12}\text{C}$	$^{16}\text{O}$
Masse 46	$^{16}\text{O}$	$^{13}\text{C}$	$^{17}\text{O}$
	$^{16}\text{O}$	$^{12}\text{C}$	$^{18}\text{O}$
	$^{17}\text{O}$	$^{12}\text{C}$	$^{17}\text{O}$

Le spectromètre de masse permet de quantifier les molécules de masses 44, 45 et 46. La correction de Craig, permet d'exprimer les résultats par rapport à la contribution totale du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{12}\text{C}$ .

Les échantillons d'air expiré, contenus dans les tubes de 10 mL, contiennent un mélange de gaz ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CO}_2$ ) où le  $\text{CO}_2$  représente 3-4% du contenu. L'IRMS ne permet pas de mesurer des mélanges, il faut donc séparer les composants du mélange pour introduire le  $\text{CO}_2$  pur dans le spectromètre de masse. Une petite aliquote de l'échantillon de gaz expiré est introduit dans l'appareil. L'humidité de l'échantillon est d'abord éliminée en passant à travers une membrane en Nafion<sup>®</sup>. Le  $\text{CO}_2$  est ensuite séparé du  $\text{N}_2$  et du  $\text{O}_2$  par chromatographie en phase gazeuse. Le  $\text{CO}_2$  est introduit dans le spectromètre de masse puis ionisé par bombardement électronique. Ensuite les ions possédant les trois masses adjacentes (44, 45 et 46) sont séparées grâce à un champ magnétique et recueillis dans des cages de Faraday. L'abondance isotopique d'un  $\text{CO}_2$  de référence est mesurée après chaque échantillon de gaz expiré (figure 6). Les résultats sont exprimés en  $\delta$  ‰ par rapport au standard international, PDB (Pee Dee Belemnite Limestones) et calculés de la façon suivante :

$$\delta \text{ ‰} = 1000 \cdot \left\{ \left[ \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{échantillon}} - \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{référence}} \right] / \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{référence}} \right\}$$

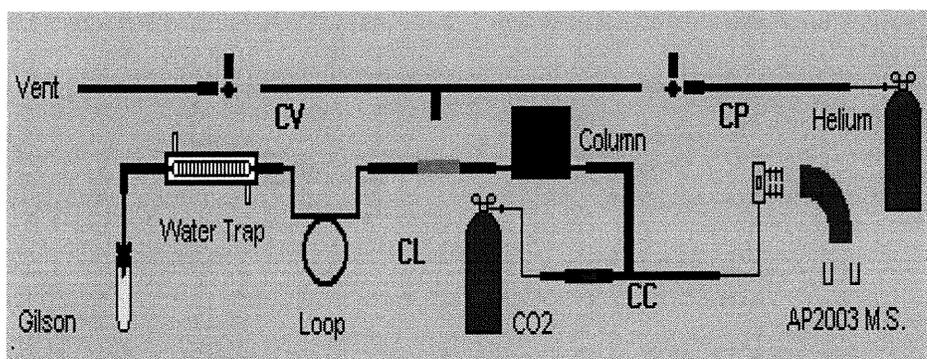


Figure 6 : Schéma de l'appareil analytique ; chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse isotopique (GC-IRMS)

Suite à l'administration de la caféine marquée au temps considéré comme  $t=0$ , des prélèvements de gaz expiré sont collectés aux temps 30, 45, 60, 90 et 120 minutes.

Chacun des échantillons est analysé de la façon décrite précédemment. Le résultat total du TRC est exprimé en % de la dose de  $^{13}\text{C}$  expiré pendant la durée du test. L'enrichissement isotopique de  $\text{CO}_2$  est calculé en soustrayant l'abondance isotopique à chaque temps par l'abondance isotopique avant la prise de la dose de caféine. L'enrichissement isotopique cumulé sur une période de 2 heures après l'administration de la caféine marquée ( $\Delta \delta \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{cum}}$ ), exprimée en  $\delta \text{ } \text{‰}$ , est calculé selon la méthode des trapézoïdes, jusqu'au dernier prélèvement. Le résultat est converti en pourcentage de la dose récupéré sous forme de  $^{13}\text{C}$  expiré selon la méthode décrite par Scholler et al. (35):

$$\% \text{ dose } ^{13}\text{C} \text{ récupéré} = \frac{\Delta \delta \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{cum}} \cdot (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}} \cdot \text{production-CO}_2}{\text{mM } ^{13}\text{C} \text{ administré} \cdot 10}$$

où  $\text{production-CO}_2 = (\text{BSA}) \cdot 300\text{mM m}^{-2} \text{ hr}^{-1} \cdot 2 \text{ hr}$

et  $\text{mM } ^{13}\text{C} \text{ administré} = m \cdot n \cdot P \cdot W / M$

$(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}} = 0.011273$ ; BSA = body surface area en  $\text{m}^2$ ; m = dose de caféine en  $\text{mg/kg}$ ; n = nombre de  $^{13}\text{C}$  par molécule de caféine; P = pureté isotopique  $^{13}\text{C}$  de la molécule; W = poids du patient en  $\text{kg}$ ; M = poids moléculaire de la caféine en  $\text{g/mol}$ . Le "body surface area" à été calculé selon la méthode décrite par Haycock et al. (36). Cette formule calcule le BSA à partir du poids et de la taille des patients. Il a été montré que cette formule est valable autant chez les adultes que chez les nourrissons.

## DEUXIÈME CHAPITRE : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Pour atteindre les objectifs de l'étude, nous avons mis en place la méthodologie suivante.

- Définition des pré-requis
- Étude de l'induction du CYP1A2 par l'oméprazole
- Mise en place de la méthode de dosage de l'oméprazole et de ses métabolites par chromatographie liquide
- Étude pharmacocinétique de l'oméprazole

### PARTIE 1 : DÉFINITION DES PRÉ-REQUIS

Comme mentionné précédemment, les TR mesurent l'enrichissement isotopique du CO<sub>2</sub> avant et après l'ingestion d'une substance marquée par l'isotope stable et non radioactif du carbone, le <sup>13</sup>C. La mesure au temps zéro, avant l'administration de la substance marquée, permet de déterminer le niveau basal de l'abondance isotopique. Les mesures subséquentes, effectués après l'administration du marqueur, permettent de déterminer la quantité de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> produit par le métabolisme de cette substance. Le choix de la substance marquée avec le <sup>13</sup>C est déterminé par l'enzyme qu'il convient d'explorer. Dans notre cas, la caféine (<sup>13</sup>C) permet de mesurer l'activité des CYP1A2 puisque ceux-ci sont responsables de la déméthylation de cette molécule et produisent le CO<sub>2</sub> éliminé par expiration.

Le TR mesure donc l'enrichissement du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> au-dessus du niveau basal. Or, pour pouvoir mesurer un tel enrichissement, il est bien important d'avoir un niveau basal de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> expiré constant. Il faudra donc exercer un certain contrôle chez les sujets au niveau de l'activité physique et de l'alimentation puisque ce sont deux facteurs qui peuvent influencer l'abondance isotopique du CO<sub>2</sub> expiré. La restriction de l'activité physique, avant et pendant le test ne pose généralement pas de problème. Cependant, le jeûne de 8 heures qui est normalement requis, peu causer des inconforts surtout lorsque ces tests sont réalisés chez des femmes enceintes ou des enfants.

Le métabolisme des sucres produit du  $\text{CO}_2$  qui est éliminé par expiration. Ceci étant dit, si l'abondance en  $^{13}\text{C}$  des sucres ingérés est élevée, l'abondance en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  expiré sera également élevée pendant la digestion de ces sucres. Dans le schéma principal de photosynthèse, le cycle en  $\text{C}_3$  (Cycle de Calvin), un effet isotopique important est remarqué au niveau de l'incorporation du  $\text{CO}_2$  atmosphérique dans le cycle. Par conséquent, les sucres contenus dans les plantes dont la photosynthèse se fait selon le cycle en  $\text{C}_3$  sont plus pauvres en  $^{13}\text{C}$  que celles dont la photosynthèse se fait en  $\text{C}_4$  (Cycle de Hatch-Shalk). Dans cette dernière voie, l'effet isotopique est beaucoup moins important et par le fait même les sucres issus de ces plantes sont plus riches en  $^{13}\text{C}$ . Cela explique que l'alimentation peut avoir un effet sur l'abondance isotopique basal du  $\text{CO}_2$  expiré.

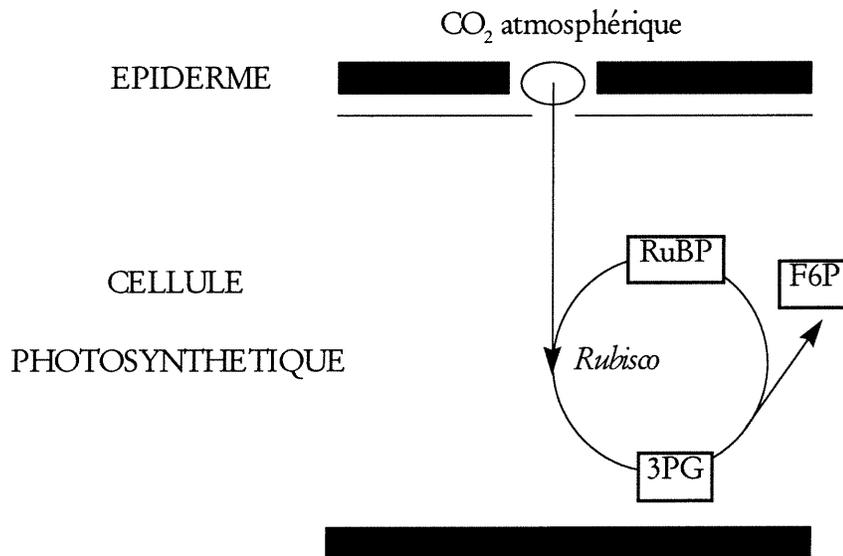


Figure 1: Schéma du cycle de Calvin (cycle en  $\text{C}_3$ )

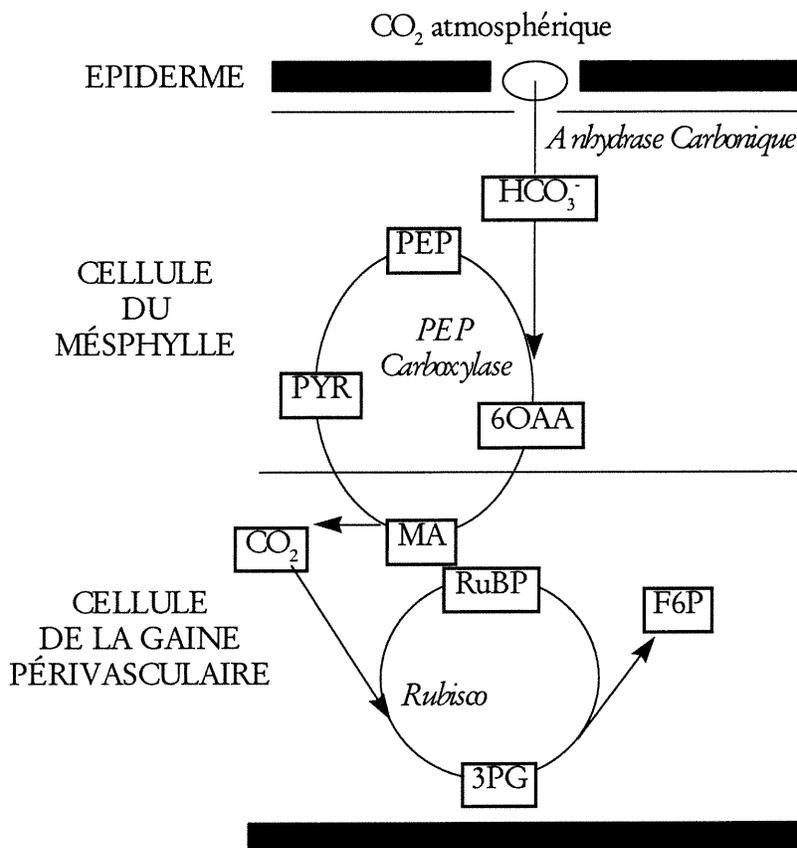


Figure 2 : Cycle de Hatch-Shalk (Cycle en C<sub>4</sub>)

Nous avons donc mis en place un protocole en trois parties dans le but de déterminer des pré-requis qui permettront de maintenir la ligne de base de l'enrichissement isotopique du CO<sub>2</sub> expiré, stable pendant au moins 3 heures. Dans la première partie, l'enrichissement isotopique basal du CO<sub>2</sub> expiré de 15 sujets sains, a été mesuré sur une période de une journée. Ceci a permis d'établir l'amplitude de la variation du niveau basal du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> dans le gaz expiré lors d'une journée normale, alors qu'aucune restrictions n'étaient établies. Dans la seconde partie, l'influence de certains aliments et breuvages sur l'enrichissement isotopique basal du CO<sub>2</sub> expiré a été étudié chez 10 sujets sains. L'effet sur l'abondance isotopique du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> contenu dans le gaz expiré après l'ingestion de céréales de grain de riz (*Rice Krispies*<sup>®</sup>) et de céréales de flocons de maïs (*Com Flakes*<sup>®</sup>) a été évalué. De plus, l'effet de trois boissons gazeuses sucrées, soit

*Coca-Cola*<sup>®</sup>, *Pepsi*<sup>®</sup> et *Seven Up*<sup>®</sup>, et de deux boissons gazeuses sucrées artificiellement avec de l'aspartame, soit *Coke Diète*<sup>®</sup> et *Pepsi Diète*<sup>®</sup> sur le niveau basal de  $^{13}\text{CO}_2$  a été évalué. Ceci a permis de mettre en évidence les contributions des différents sucres sur le taux de  $^{13}\text{CO}_2$  expiré. Dans la troisième partie, l'enrichissement isotopique du  $\text{CO}_2$  expiré avant et après un petit déjeuner sans contrôle a été comparé à l'enrichissement isotopique du  $\text{CO}_2$  expiré avant et après un petit déjeuner standardisé composé d'aliments provenant de plantes en C3 (riz et orange) et de lait. Cette dernière partie visait à valider l'utilisation du déjeuner standardisé lors des tests respiratoires tout en maintenant le niveau basal de  $^{13}\text{CO}_2$  expiré stable.

Les résultats de ces trois parties, présentés sous forme d'article publié dans le journal *"Isotopes in Environmental and Health Studies"*, nous ont permis de conclure que les sujets qui subissent un test respiratoire doivent rester en position assise ou couchée pour minimiser les variations du  $^{13}\text{CO}_2$  basal induites par l'activité physique. De plus, les sujets doivent éviter toute ingestion de produits contenant des sucres de plantes en C4 avant et pendant le test. Finalement, nous avons validé l'utilisation d'un petit déjeuner test, composé de céréales de grain de riz servis avec du lait et d'une portion de jus d'orange, qui peut être pris le matin avant un test respiratoire. Ce petit déjeuner standard ne fait pas varier la ligne de base de l'abondance en  $^{13}\text{CO}_2$  du gaz expiré de façon significative.

## ARTICLE 1

### **<sup>13</sup>C BASAL ABUNDANCE OF EXPIRED CO<sub>2</sub> - DEFINITION OF PRE-REQUISITES FOR KINETIC BREATH TESTS**

(Publié dans : *Isotopes in Environmental and Health Studies* 2000, Vol. 36, pp. 177-188)

#### **RÉSUMÉ ARTICLE 1**

Les tests respiratoires mesurent une variation de l'abondance isotopique du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> expiré. Puisque le carbone 13 est un isotope stable et présent dans la nature à 1,1%, il est important de s'assurer un niveau basal de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> expiré constant tout au long du test. Le but de ce projet était de définir des conditions préalables aux tests respiratoires permettant de maintenir un niveau basal de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> expiré constant. Un protocole en 3 parties a été mis en place. En premier lieu, une étude des variations nyctémérales du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> expiré chez 10 patients a montré que les variations de l'abondance isotopique du CO<sub>2</sub> sont immanentes lorsque aucunes précautions ne sont respectées. En deuxième lieu, une étude de la variation de l'abondance isotopique du CO<sub>2</sub> après ingestion de certains breuvages et céréales a montré que le métabolisme des sucres contenus dans les plantes en C<sub>4</sub> induit une augmentation significative de l'abondance isotopique. Finalement, un déjeuner test, contenant des céréales de grains de riz, du lait et du jus d'orange, a été mis en place. Il a été démontré que ce petit déjeuner n'induisait pas de variations significatives sur l'abondance du <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> expiré. Ce nouveau déjeuner test permet d'éviter la période de jeûne de 8 heures normalement requise avant un test respiratoire. Ce jeûne pouvait représenter un véritable inconvénient, notamment pour les enfants et les femmes enceintes.

# $^{13}\text{C}$ BASAL ABUNDANCE OF EXPIRED $\text{CO}_2$ – DEFINITION OF PRE-REQUISITES FOR KINETIC BREATH TESTS

M.-C. DUBUC\*, H. SÉBASTIEN, J.-L. BRAZIER

*Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Chaire Médicament et Grossesse,  
Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, QC-Canada.*

*(Received 30 August 1999; In final form 4 April 2000)*

## 1.0 ABSTRACT

A sufficiently stable rate of  $^{13}\text{CO}_2$  exhalation is necessary when the diagnostic  $^{13}\text{CO}_2$  breath tests are performed in healthy subjects and patients. The aim of the research was to define prerequisite conditions for kinetic breath tests in order to ensure a stable  $^{13}\text{CO}_2$  background. A 3-part protocol was developed. Part I: a study of the one-day variation of  $^{13}\text{C}$  abundance in expired  $\text{CO}_2$ , confirmed that shifts of the basal  $^{13}\text{C}$  abundance in breath are inherent in nature. Part II: a study of the variations of  $^{13}\text{C}$  enrichment after the ingestion of different meals and beverages showed that ingestion of food items containing  $\text{C}_4$  plant sugars, such as maize, induces a significant increase in isotopic abundance. Part III: a new test breakfast containing rice grain cereal, milk and orange juice was tested. This test meal induces no significant change on the basal  $^{13}\text{CO}_2$  abundance in healthy subjects. This new finding allows to avoid the fasting period normally required prior to a breath test which is sometimes difficult for children and pregnant women.

*Keywords:* Breath test; Carbon 13; GC-IRMS; Metabolism; Methodology; Test meal.

---

\* Address for correspondence: Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, CP 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, (Qc) Canada H3C 3J7.

## 2.0 INTRODUCTION

Breath tests, using stable isotopes, are increasingly used in diagnostic studies and in drug metabolism studies. These tests measure the isotopic ratio of  $^{13}\text{CO}_2$  to  $^{12}\text{CO}_2$  in expired air, prior to the administration of a  $^{13}\text{C}$ -labelled substrate, and at fixed intervals thereafter. The enzyme to be studied dictates the choice of the substrate administered. Among the commonly used breath tests, the  $^{13}\text{C}$ -urea breath test, which is used for the diagnosis of gastric *Helicobacter pylori* infection, is the most widespread [1 - 3]. The  $^{13}\text{C}$ -caffeine breath test [4, 5], used as an indicator of the activity of CYP1A2 is also common, along with the aminopyrine breath test [6, 7], the methacetin breath test [8, 9], the galactose breath test [10], the mixed triglyceride breath test [11, 12] and the octanoic acid breath test [13, 14]. This method of diagnosis is gaining popularity, because it is non-invasive, non-radioactive, very easy to carry out, and sample analysis is performed in only a few minutes. Furthermore, the use of non-invasive breath tests using stable isotopes is recommended for children [15] and pregnant women.

Breath tests exploit the fact that the oxidation of a labelled substrate produces labelled  $\text{CO}_2$  that is eliminated by exhalation. Unlike  $^{14}\text{C}$  tests,  $^{13}\text{C}$  breath tests are performed against a large background of natural abundance. The  $^{13}\text{C}$  abundance measured during a breath test is the total of the  $^{13}\text{C}$  arising from the oxidation of the labelled substrate along with the  $^{13}\text{C}$  produced from the oxidation of natural compounds containing between 1,06 to 1,12% of  $^{13}\text{C}$ . The test signal, which is the  $^{13}\text{CO}_2$  produced in excess to the basal  $^{13}\text{CO}_2$  abundance, will be calculated by subtracting the initial or basal  $^{13}\text{CO}_2$  abundance from the measured  $^{13}\text{CO}_2$  abundance of expired  $\text{CO}_2$ . This calculation is correct only if the background of natural  $^{13}\text{CO}_2$  abundance is constant throughout the test. If there were a variation in the background  $^{13}\text{C}$  abundance, the results would be influenced because the consequent test signal would either be decreased or increased accordingly. Increasing the dosage of labelled compounds in order to be able to neglect such background shifts would be a solution if the high cost and the toxicity of certain compounds would not compel to keep the doses at tracer levels.

One way of minimising shifts in the baseline is to perform the breath test after a fast of several hours, and when the subject is lying or sitting down. These requirements, however, are not always desirable, especially when the subjects are children or pregnant women. The fast period is normally introduced because it will have the effect of minimising the variations in expired  $^{13}\text{CO}_2$ . This effect is believed to be due to the metabolism of well-mixed endogenous fuel source [16], which produces a practically stable  $^{13}\text{CO}_2$  abundance over time. If another fuel of varying  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  abundance is introduced, it could be responsible for a shift in the expired  $^{13}\text{CO}_2$  abundance. This is due to the fact that different natural products may have different  $^{13}\text{C}$  abundance because of a more or less important fractionation by isotopic effect during the incorporation of atmospheric  $\text{CO}_2$  into the photosynthetic process. In the principal photosynthetic pathway, the  $\text{C}_3$  cycle or the Calvin cycle, a fractionation by isotopic effect is noticed. Depletion in  $^{13}\text{C}$  abundance of these sugars compared to that of atmospheric  $\text{CO}_2$  is observed as a result of this fractionation [17] (in the region of -22 to -36 ‰ PDB). For the  $\text{C}_4$  cycle or the Hatch-Shalck cycle, isotopic discrimination in these plants depends on the fractionation occurring during  $\text{CO}_2$  diffusion into the leaf and fractionation arising during the first carboxylation step [17]. Plants such as cane and maize, using this photosynthetic pathway, have higher  $^{13}\text{C}$  abundance than  $\text{C}_3$  plants (in the region of -10 to -16 ‰ PDB).

The metabolism of sugars results in the production of  $\text{CO}_2$  that is expired as we breathe. Thus, if the  $^{13}\text{C}$  abundance in the sugars that are ingested is high, the  $^{13}\text{C}$  abundance in the  $\text{CO}_2$  of breath is also expected to be elevated [18].

This study was designed to evaluate the influence of food on the basal  $^{13}\text{C}$  composition of  $\text{CO}_2$  in expired air, and to put together a meal (breakfast) which could be given to subjects while keeping the basal  $^{13}\text{C}$  abundance in  $\text{CO}_2$  constant. It is well known that physical activity has a direct effect on the  $^{13}\text{C}$  abundance in the  $\text{CO}_2$  breath [19]. This, however, is not the focus of this study as it is always possible to minimise physical activity in subjects undergoing breath tests.

The aim of this research was to define prerequisite conditions for kinetic breath tests in order to ensure a stable  $^{13}\text{C}$  enrichment for at least 3 hours. We developed a three-part protocol containing (i) a study of the 24-hour variations of  $^{13}\text{C}$  abundance, (ii) a study of the effect of different meals and beverages on the basal  $^{13}\text{C}$  abundance in breath and (iii) the validation of a new test breakfast that will not induce any variations on the basal  $\text{CO}_2$  isotopic abundance.

### 3.0 MATERIAL AND METHODS

#### 3.1 BREATH TESTS

Breath samples were collected in either 10-mL vacutainers or 10-mL exetainer tubes. After removing the septum of a sample container, the subject blows through a plastic straw into the base of a 10 mL sample container until the walls of the vessel show water condensation.

Isotope ratio measurements were carried out using Analytical Precision's breath analyser AP 2003 GC-IRMS (Analytical Precision, Norhtwich, UK; overall instrument precision  $\pm 0.20 \delta \text{‰}$ ). The  $\delta^{13}\text{C}$  and  $^{18}\text{O}$  calibration on this apparatus are done using an on-line internally calibrated  $\text{CO}_2$  reference gas, which is measured immediately after each breath  $\text{CO}_2$  sample. The values of the isotopic enrichments are expressed as  $\delta \text{‰}$ , with respect to Pee Dee Belemnite Limestone (PDB), and calculated as follows:

$$\delta \text{‰} = 1000 \cdot \left\{ \left[ \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{sample}} - \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{ref.}} \right] / \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{ref.}} \right\}$$

#### 3.2 ONE-DAY BASAL $^{13}\text{CO}_2$ VARIATION

The one-day basal  $^{13}\text{CO}_2$  variation breath tests were performed on fifteen healthy subjects, male ( $n=8$ ) and female ( $n=7$ ) aged between 18 and 55 years. They were asked to collect breath samples at least every hour, during one day, and to note the exact time at which the samples were taken along with the time and composition of every meal,

and the activities they were involved in that day. The first breath sample was to be collected as soon as the subject woke up in the morning, and the last sample just before the subject went to bed at night.

### 3.3 INFLUENCE OF MEALS AND BEVERAGES ON BASAL $^{13}\text{CO}_2$

The variation of basal  $^{13}\text{CO}_2$  in expired air was measured after ingestion of two types of cereals and five types of soft drinks. The effects of Corn Flakes<sup>®</sup> (A) and Rice Krispies<sup>®</sup> (B), and that of Coca-Cola<sup>®</sup> (M), Diet Coca-Cola<sup>®</sup> (N), Pepsi<sup>®</sup> (O), Diet Pepsi<sup>®</sup> (P) and Seven Up<sup>®</sup> (Q), on the abundance of  $^{13}\text{CO}_2$  in expired air were evaluated in ten healthy subjects, male (n=5) and female (n=5), aged between 18 and 55 years. Breath samples (n=6) were collected 10 minutes and 30 seconds prior to ingestion of the cereal or soft drink and at 15 minutes intervals thereafter for a duration of 60 minutes. The tests were performed, in the morning, at breakfast time after an overnight fast, for the cereal, and at anytime during the day, after a fast of at least 3 hours, for the soft drinks. All subjects were asked to remain sitting down throughout the sampling period.

### 3.4 TEST BREAKFAST

This part of the study was done over a period of 2 days. The first day, ten healthy subjects, male (n=5) and female (n=5) aged between 18 and 55 years, were asked to take breath samples as they woke up in the morning at 7:30 and at 30 minutes intervals thereafter for a duration of 90 minutes (n=4). At 9:00 and for a duration of 45 minutes, the subjects were permitted to eat the breakfast of their choice. They were then asked to collect breath samples at 9:45 and at 15 minutes intervals thereafter for a duration of 60 minutes (n=5). On the second day, the test was performed in the same manner, the only difference being that the breakfast was the same for every subject. It consisted of a portion (55 g) of rice grain cereal (B) served with 2% milk (250 mL) and a portion of orange juice (250 mL) (445 kcal, 13.9g protein, 5.7g fat and 85.0g carbohydrate, in total). All subjects were asked to remain sitting down throughout the sampling period.

## 4.0 RESULTS & DISCUSSION

### 4.1 ONE-DAY BASAL $^{13}\text{CO}_2$ VARIATION

Figure 1 shows the variation of the  $^{13}\text{C}$  abundance in expired air for the 15 subjects. It can be seen, that there is a large inter-individual variation and longitudinal variations over time. The isotopic enrichment of the breath is found anywhere between  $-18 \text{‰}$  and  $-27 \text{‰}$ . This confirms that the mean  $^{13}\text{C}$  depends mainly on the individual diet. The subject with the highest  $^{13}\text{C}$  level was a high consumer of soft drinks (more than 12 cans a day). As expected, peak variations were noticed particularly when subjects performed physical activities or when they ingested foods naturally rich in  $^{13}\text{C}$  such as corn or other  $\text{C}_4$  plant sugars (Fig. 2)

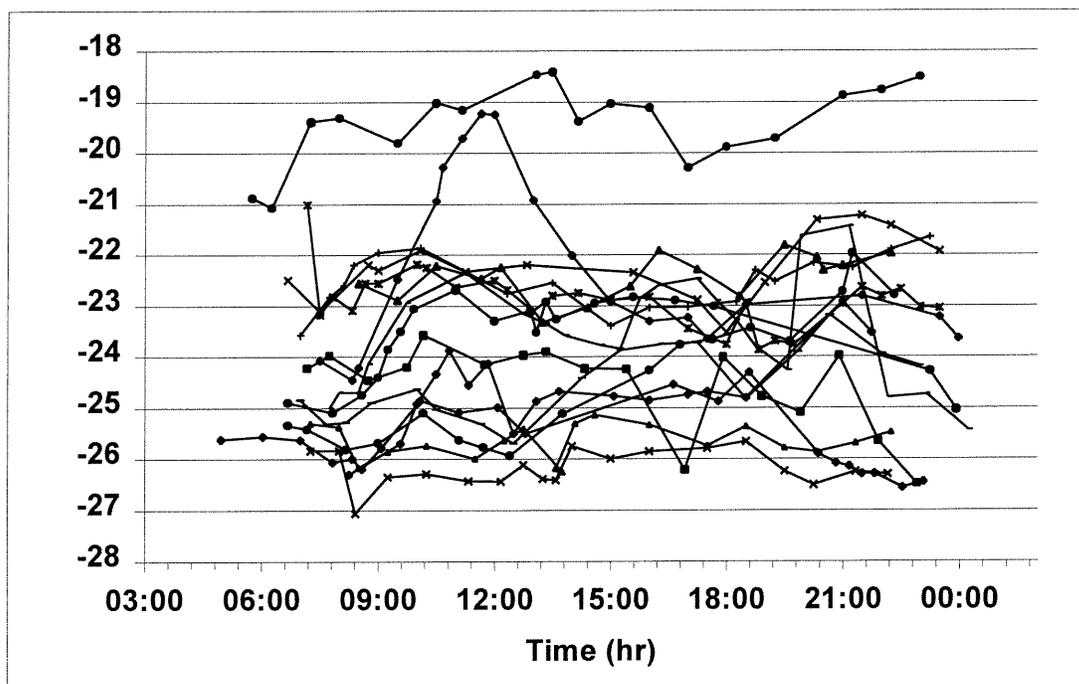


FIGURE 1  $^{13}\text{CO}_2$  abundance in breath for fifteen healthy subjects over a one-day period.

These results show that breath tests cannot be performed under these conditions because the basal variations are sometimes greater than those expected for the enrichment from the labelled substrate. In fact, in Figure 2 the value of  $AUC_{0-3}$  (area under the  $\delta\text{‰} = f(t)$  curve calculated by the trapezoidal rule over the three hours between point (b) and point (c) which represents the total  $^{13}\text{CO}_2$  amount produced by this subject, is  $355.7 \delta\text{‰} \cdot \text{min}$ . Knowing that the average value of the  $AUC_{0-3}$  (also calculated by the trapezoidal rule) of a  $^{13}\text{C}$ -caffeine breath test performed on 25 healthy subjects is  $727.1 \delta\text{‰} \cdot \text{min}$ , it is clear that a shift in  $^{13}\text{C}$  basal abundance such as that seen on Figure 2 could potentially induce large errors on the test results. Therefore, these significant and non-negligible shifts in  $^{13}\text{C}$  basal abundance of expired  $\text{CO}_2$  must be eliminated in order to perform a breath test adequately.

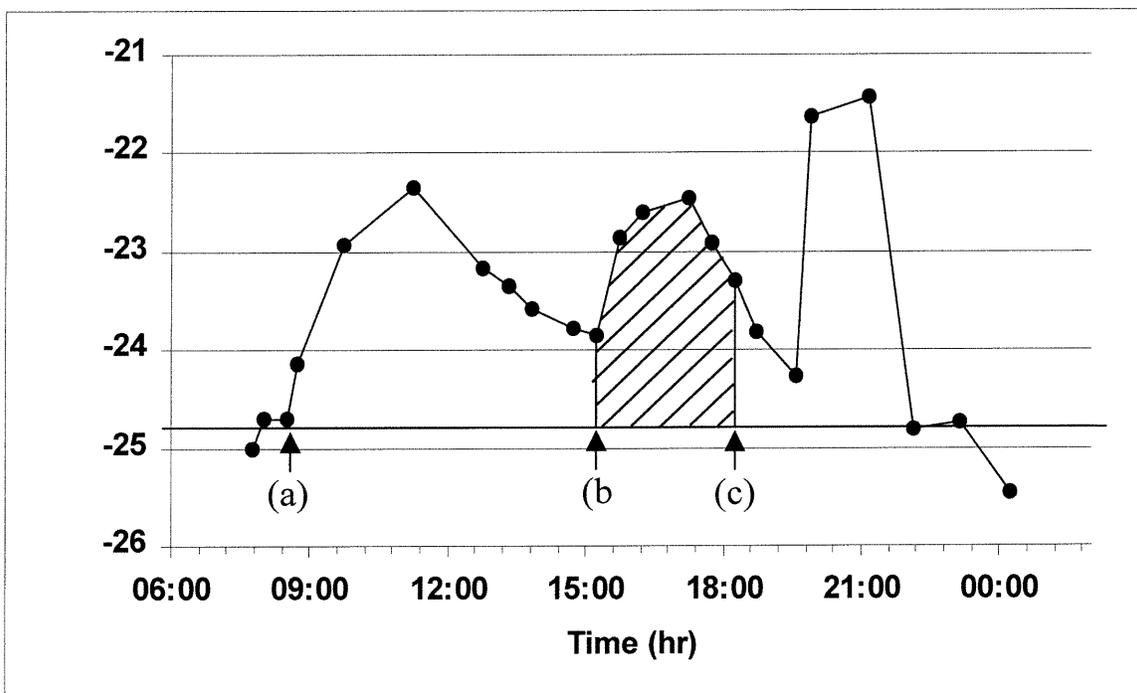


FIGURE 2  $^{13}\text{CO}_2$  abundance for one subject over a one-day period. Basal  $^{13}\text{CO}_2$  abundance prior to outside contributions such as food and physical activity calculated as an average of the first three samples taken in the morning before breakfast. (a) Ingestion of a corn cereal ( $\text{C}_4$  plant); (b) Ingestion of a sweetened soft drink; (c) Start of a physical activity (cycling). Hatched region indicates area used for calculation of  $AUC_{0-3}$ .

#### 4.2 INFLUENCE OF MEALS AND BEVERAGES ON BASAL $^{13}\text{CO}_2$

Figure 3 illustrates the difference in  $^{13}\text{C}$  abundance in expired air, over a period of 1 hour, measured after ingestion of a rice grain cereal (B) and a corn grain cereal (A). A  $^{13}\text{CO}_2$ -abundance increase of  $0.77 \pm 0.38 \delta\text{‰}$  was measured as an average in the ten subjects, one hour after ingestion of cereal A. The same experiment performed with cereal B maintained the basal  $^{13}\text{CO}_2$  abundance at values no higher than  $0.13 \pm 0.30 \delta\text{‰}$  of the initial basal abundance (average of samples taken at times  $T = -10$  minutes and  $T = -30$  seconds). This last value is smaller than the analytical error of IRMS, which is  $0.20 \delta\text{‰}$ . From these results, it is clear that  $\text{C}_3$  plants, such as rice, have no significant effect on the  $^{13}\text{CO}_2$  abundance. On the other hand,  $\text{C}_4$  plants, such as maize, result in a significant increase of  $^{13}\text{CO}_2$  abundance after only 60 minutes. It was previously shown that the peak  $^{13}\text{CO}_2$  excretion (% dose/h) from glucose and other sugars is observed after 4 hours [16]. After 1 hour, however, a significant increase was also noted. Thus, because the corn grain cereal induces a pronounced  $^{13}\text{CO}_2$ -response increase after only one hour, this cereal type could not be admitted prior to a breath test. In fact, all products containing  $\text{C}_4$  plant sugars must be prohibited before and during a  $^{13}\text{C}$  labelled substrate breath test.

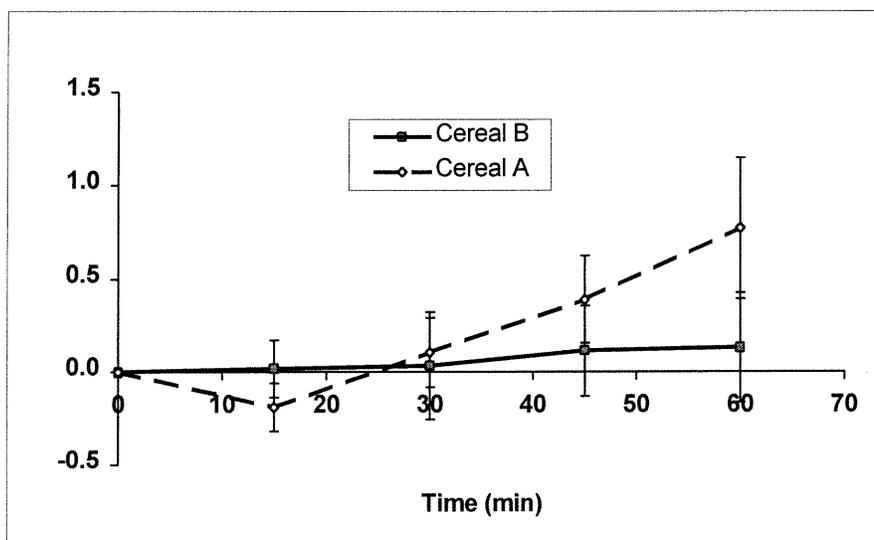


FIGURE 3 Difference in  $^{13}\text{CO}_2$  abundance in breath after ingestion of two different cereals, as an average for 10 subject ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

Figure 4 shows the average variation in basal  $^{13}\text{CO}_2$  abundance after ingestion of 5 different soft drinks. From this figure, it can be concluded that the sugars contained in drink M, O and Q originate from a  $\text{C}_4$  plant source. In fact, these three soft drinks were responsible for increases of  $1.26 \pm 0.36 \text{ ‰}$ ,  $1.31 \pm 0.33 \text{ ‰}$  and  $1.26 \pm 0.48 \text{ ‰}$ , respectively, of the initial  $^{13}\text{C}$  abundance in expired air, after a period of one hour, as an average for the ten subjects.

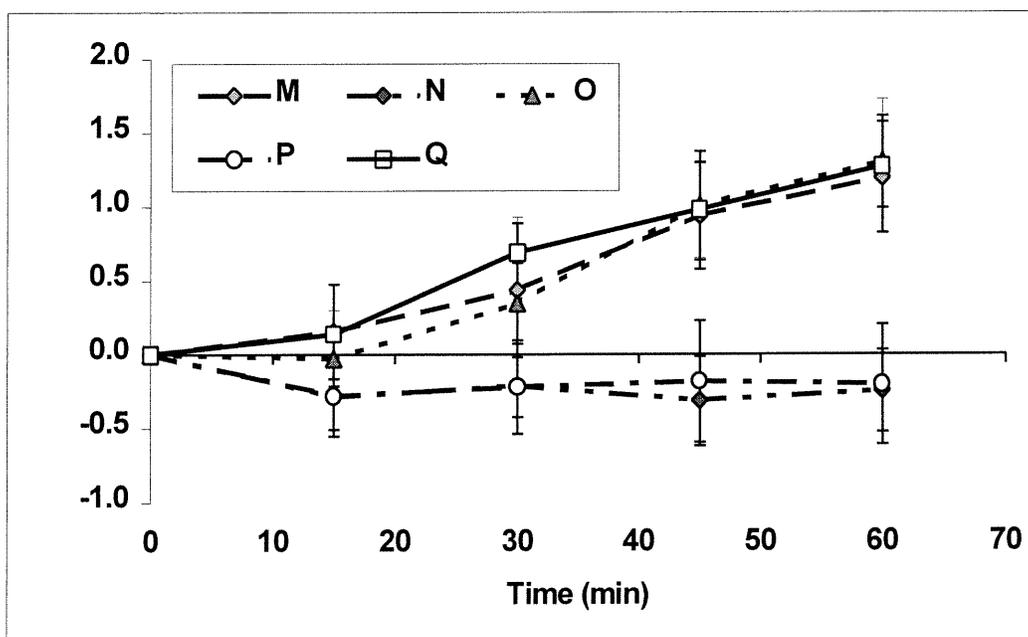


FIGURE 4 Difference in  $^{13}\text{CO}_2$  abundance in breath after ingestion of five different soft drinks, as an average for 10 subject ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).

The two diet soft drinks artificially sweetened with aspartame were responsible for a slight decrease of the initial  $^{13}\text{C}$  abundance in expired air, after a period of one hour, as an average for the ten subjects. The peak difference in  $^{13}\text{C}$  abundance was evaluated after 45 minutes for drink N ( $-0.31 \pm 0.32 \text{ ‰}$ ). The results for drink P shows a peak decrease of  $-0.24 \pm 0.48 \text{ ‰}$  after one hour. This observed decrease could be mainly due to the dissolved  $\text{CO}_2$  in these beverages which has a very low  $^{13}\text{C}$  content (values ranging from  $-34$  to  $-44 \text{ ‰ PDB}$ ).

### 4.3 TEST BREAKFAST

No significant variation was noted in the  $^{13}\text{C}$  basal abundance for the ten subjects before the meal of their choice. However, figure 5 clearly shows that a significant variation in the  $^{13}\text{CO}_2$  abundance in breath is observed when there is no control over the composition of the breakfast meal. In fact, the variation of the  $^{13}\text{C}$  abundance is important and is not kept within the analytical error value of the IRMS method. The standard deviations on  $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$  abundance in breath for this observation reached values of  $0.75 \delta\text{‰}$  for one subject.

Results for the test meal are shown in figure 6. The post-breakfast isotopic breath  $\text{CO}_2$  enrichments are, as expected, kept within a minimal range of variation. The average of standard deviations on  $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$  isotopic abundance is of  $0.16 \delta\text{‰}$  in this population.

This standardised meal composed of food from a  $\text{C}_3$  plant source (rice and orange juice) and milk was validated. This breakfast does not induce any variation of the  $\text{CO}_2$  isotopic abundance and reduces the intra-individual variation of the  $^{13}\text{C}$  abundance.

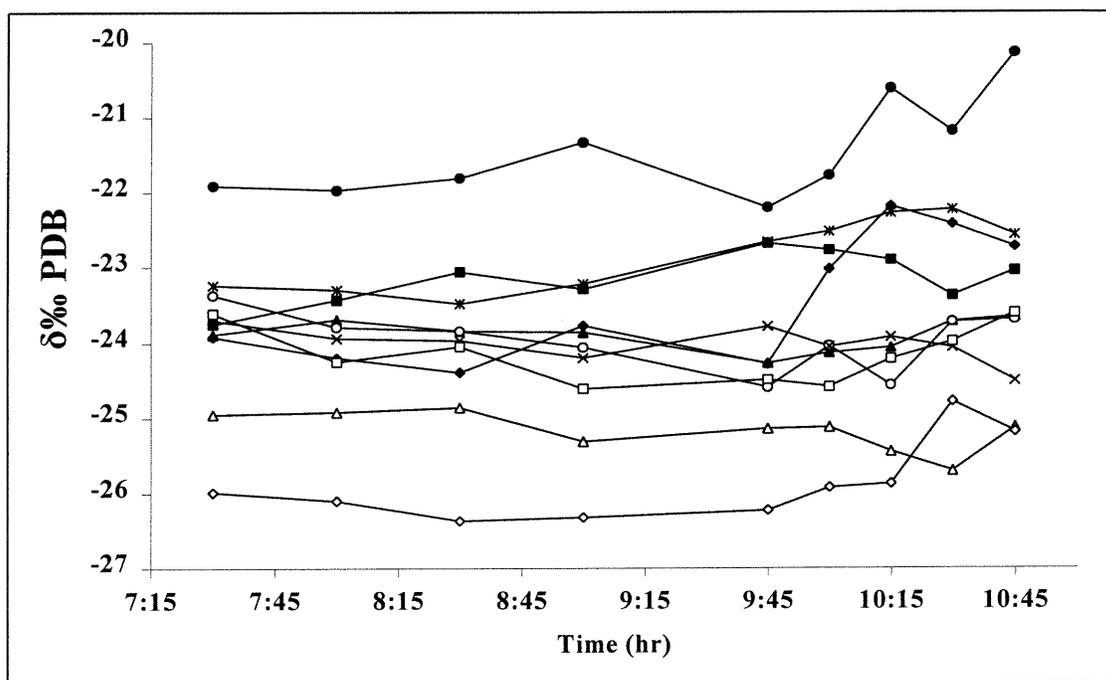


FIGURE 5  $^{13}\text{CO}_2$  abundance in breath in ten patients before and after a non-controlled breakfast taken at 9:00 hours.

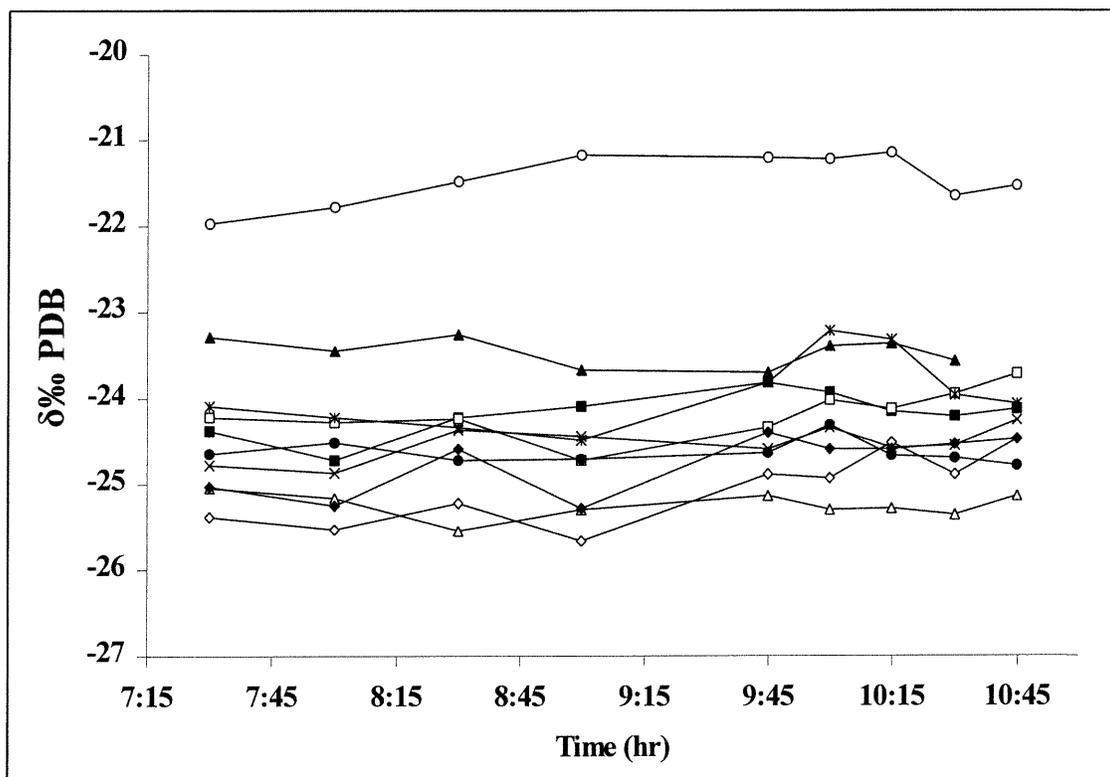


FIGURE 6  $^{13}\text{CO}_2$  abundance in breath in ten patients before and after a standardised breakfast taken at 9:00 hours.

## 5.0 CONCLUSION

This study confirms that the mean  $^{13}\text{C}$  level of the expired  $\text{CO}_2$  is quite variable from one subject to another and mainly depends on its diet. It also confirms that this level is not constant during the day and that significant variations are induced by physical activity and food intake. Food and beverages containing sugars with high  $^{13}\text{C}$  content from plants with a  $\text{C}_4$  photosynthetic pathway like maize and cane cause the highest variations of the  $^{13}\text{C}$  level. Breath tests which use stable isotopically labelled substrates are designed to measure with precision and accuracy small enrichments of the expired  $^{13}\text{CO}_2$  specifically generated by the metabolism of these labelled substrates. In order to avoid the modification of the metabolic pools, and because these substrates generally have high costs, the amounts of labelled substrates administered for a breath test must be kept at a minimum. This condition imposes the use of sensitive methods of measurement and above all the stability of the  $^{13}\text{C}$ -background level of the  $\text{CO}_2$  expired

by the subject. Therefore, the definition of prerequisite conditions is important. Patients must be resting during the trial and in the optimal conditions they must be fasting in order to avoid the endogenous production of CO<sub>2</sub> with a variable isotopic level likely to induce shifts in the basal <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> abundance. The last condition can be difficult to comply with for some patients, particularly children and pregnant women. Thus, in order to properly carry out a breath test, it is necessary to allow the absorption of a normalised meal under strict conditions and control. This normalised meal has to be composed of food and beverage unable to significantly modify the <sup>13</sup>C-background level of the expired CO<sub>2</sub>. The test meal developed here from rice, milk and orange juice allows to reach this objective and does not significantly modify the <sup>13</sup>C background level. In conclusion, the results of this study are prerequisites to be observed before carrying out a breath test and may be useful to any clinician that would like to use <sup>13</sup>C breath tests for diagnosis or for clinical trials.

## 6.0 REFERENCES

1. Kalach N. Benhamou PH. Briet F. Raymond J. Dupont C. The  $^{13}\text{C}$ -Urea breath test in Helicobacter pylori gastric infection in children. *Archives de Pédiatrie* 1998; **5**(12): 1359-65.
2. Delvin EE. Brazier JL. Deslandres C. Alvarez F. Russo P. Seidman E. Accuracy of the  $^{13}\text{C}$ -Urea breath test in diagnosing Helicobacter pylori gastritis in pediatric patients. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 1999; **28**(1): 59-62.
3. Logan RP. Urea breath tests in the management of Helicobacter pylori infection. *Gut* 1998; **43**(Suppl 1): S47-S50.
4. Parker AC. Pritchard P. Preston T. Choonara I. Induction of CYP1A2 activity by carbamazepine in children using the caffeine breath test. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1998; **45**(2): 176-8.
5. Rost KL. Brosicke H. Brockmoller J. Scheffler M. Helge H. Roots I. Increase of cytochrome P4501A2 activity by omeprazole: evidence by the  $^{13}\text{C}$ -(N-3-methyl)-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephynetoïn. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1992; **52**(2): 170-80.
6. Perri F. Pastore M. Annese V. Andriulli A. The aminopyrine breath test. *Italian Journal of Gastroenterology* 1994; **26**(6): 306-17.
7. Mion F. Queneau PE. Rousseau M. Brazier JL. Paliard P. Minaire Y. Aminopyrine breath test: development of a  $^{13}\text{C}$ -breath test for quantitative assessment of liver function in humans. *Hepato-Gastroenterology* 1995; **42**(6): 931-8.
8. Krumbiegel P. Günther K. Faust H. Möbius G. Hirschberg K. Schneider G.: Nuclear medicine liver function tests for pregnant women and children. 1. Breath tests with  $^{14}\text{C}$ -methacetin and  $^{13}\text{C}$ -methacetin. *Europ. J. Nucl. Med.* 1985; **10**: 129-133.
9. Klatt S. Taut C. Mayer D. Adler G. Beckh K. Evaluation of the  $^{13}\text{C}$ -methacetin breath test for quantitative liver function testing. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 1997; **35**(8): 609-14.
10. Berry GT. Nissim I. Gibson JB. Mazur AT. Lin Z. Elsas LJ. Singh RH. Klein PD. Segal S. Quantitative assessment of whole body galactose metabolism in galactosemic patients. *European Journal of Pediatrics* 1997; **156** (Suppl 1): S43-9.

11. Weaver LT. Amarri S. Swart GR.  $^{13}\text{C}$  mixed triglyceride breath test. *Gut* 1998; **43** (Suppl 3): S13-9.
12. Loser C. Brauer C. Aygen S. Hennemann O. Folsch UR. Comparative clinical evaluation of the  $^{13}\text{C}$ -mixed triglyceride breath test as an indirect pancreatic function test. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1998; **33**(3): 327-34.
13. Schommartz B. Ziegler D. Schadewaldt P. Significance of diagnostic parameters in ( $^{13}\text{C}$ )octanoic acid gastric emptying breath tests. *Isotopes in Environmental & Health Studies* 1998; **34**(1-2): 134-43.
14. Perri F. Clemente R. Festa V. Quitadamo M. Niro G. Andriulli A.  $^{13}\text{C}$ -octanoic acid breath test: a reliable tool for measuring gastric emptying. *Italian Journal of Gastroenterology & Hepatology* 1998; **30**(2): 211-7.
15. Koletzko B. Demmelmair H. Hartl W. Kindermann A. Koletzko S. Sauerwald T. Szitanyi P. The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Human Development* 1998; **53**(Suppl S): S77-97.
16. Schoeller DA, Klein PD, Watkins JB, Hein T and MacLean WC Jr.  $^{13}\text{C}$  abundances of nutrients and the effect of variations in  $^{13}\text{C}$  isotopic abundances of test meals formulated for  $^{13}\text{CO}_2$  breath tests. *American Journal of Clinical Nutrition* 1980; **33**(11): 2375-85.
17. Brazier JL. Use of isotope ratios in forensic analysis. In: Forensic applications of mass spectrometry, editor Jehuda Yinon, 1995.
18. Metges C. Kempe K. Schmidt HL. Dependence of the carbon-isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the delta  $^{13}\text{C}$  value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition* 1990; **63**(2): 187-96.
19. Gautier JF. Pirnay F. Lacroix M. Mosora F. Scheen AJ. Cathelineau G. Lefebvre PJ. Changes in  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  during exercise of different intensities. *Journal of Applied Physiology* 1996; **81**(3): 1096-102.

## PARTIE 2 : ÉTUDE DE L'INDUCTION DU CYP1A2 PAR L'OMÉPRAZOLE

Pour étudier l'effet inducteur de l'oméprazole, nous avons mis en place un protocole clinique visant à étudier l'effet d'un traitement avec l'oméprazole sur le métabolisme de la caféine, utilisée comme sonde métabolique du CYP1A2. La chronologie de l'étude prévoit des tests respiratoires à la caféine  $^{13}\text{C}$  le jour précédant le début du traitement, ainsi qu'aux semaines 2, 4, 8, et 12 d'un traitement de 8 semaines à l'oméprazole. Cela doit permettre d'évaluer l'activité des CYP1A2 avant le traitement, pendant le traitement et après le traitement. Le test au jour 1, avant le traitement, permettra d'évaluer l'activité des CYP1A2 avant l'influence potentielle de l'IPP. Cette valeur servira de référence. C'est par rapport à elle que l'on comparera les résultats aux semaines subséquentes. De cette façon, chaque sujet est son propre témoin. Le test respiratoire effectué à la semaine 12 servira à évaluer la régression de l'activité des CYP1A2 après le traitement, si induction il y a.

Le protocole prévoit donc cinq tests respiratoires d'une durée d'environ 2h10 chacun. Chacun des tests respiratoires se déroule comme suit : Un premier échantillon de gaz expiré est récolté 10 minutes avant l'ingestion d'une solution de caféine  $^{13}\text{C}$ . Ce premier prélèvement servira à évaluer le niveau basal de  $^{13}\text{CO}_2$  contenu dans le gaz expiré et cette valeur sera la référence avec laquelle les mesures subséquentes seront comparées. Au temps considéré comme  $t=0$ , un volume (correspondant à la dose de 3mg/kg) d'une solution aqueuse à 6mg/mL de caféine  $^{13}\text{C}$  préparée par la pharmacie de l'hôpital Sainte-Justine sera administré par voie orale. Par la suite, des prélèvements de gaz expiré seront recueillis aux temps  $t+30$  min,  $t+45$  min,  $t+60$  min,  $t+90$  min et  $t+120$  minutes. Les prélèvements sont réalisés par simple expiration dans un tube Vacutainer à l'aide d'une petite tubulure en plastique seule ou reliée à un masque pour les plus petits enfants. Le sujet doit souffler lentement dans le tube jusqu'à ce que de la buée en recouvre la surface interne. Pour les enfants incapables de souffler de façon satisfaisante, un petit masque est placé devant leur bouche et nez et le gaz expiré est prélevé à l'aide d'une seringue de 20mL reliée au masque. Les prélèvements sont effectués en double à chaque temps. Ces échantillons sont ensuite analysés par GC-IRMS dans le but de déterminer l'abondance isotopique du  $\text{CO}_2$  présent. Ces valeurs

permettront de calculer une  $ASC_{0.2}$  (aire sous la courbe d'enrichissement en fonction du temps, calculée sur une période de deux heures) de l'enrichissement isotopique du  $CO_2$  expiré. La valeur de l' $ASC_{0.2}$  sera représentative de l'activité enzymatique du CYP1A2. Ainsi, la comparaison des résultats obtenus avant, pendant et après le traitement permettra de tirer des conclusions quant à l'induction de cette enzyme par l'oméprazole prescrit chez ces enfants.

## ARTICLE 2:

### OMEPRAZOLE IS AN INDUCER OF CYP1A2 UNDER CONVENTIONAL THERAPEUTIC CONDITIONS IN CHILDREN

(Soumis au : *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*)

#### RÉSUMÉ ARTICLE 2

**Objectif:** L'oméprazole est de plus en plus prescrit aux enfants souffrant de reflux gastro esophagien (RGO). Plusieurs études ont été conduites dans des populations adultes dans le but de vérifier l'effet de l'oméprazole sur le métabolisme de la caféine, un substrat du CYP1A2. Les résultats de ces études sont très contradictoires et controversés, puisque l'isoforme CYP1A2 est entre autre responsable de l'activation de pré carcinogènes en carcinogènes actifs. Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de l'oméprazole sur le métabolisme de la caféine chez des enfants traitée pour le RGO.

**Méthode:** La population de l'étude était composée de 26 enfants traités avec l'oméprazole à raison de 0,5 à 1,4 mg/kg par jour pour une durée de 8 semaines. Chez ces patients, l'oméprazole était indiqué pour des troubles de reflux gastro-œsophagien, tel que prouvé par un pH-métrie sur 24 heures et/ou par une endoscopie haute. Les patients ont accepté de passer des tests respiratoires à la <sup>13</sup>C-caféine avant le début du traitement ainsi qu'aux semaines 2, 4, 8 et 12.

**Résultats:** L'activité du CYP1A2 est corrélée au pourcentage de la dose de <sup>13</sup>C expiré sur une période de 2 heures. Le % de la dose <sup>13</sup>C expiré, exprimé par la moyenne de la population (écart-type), au pré-traitement, ainsi qu'aux semaines 2, 4, 8, et 12 sont de 2,83 (1,39) ; 3,47 (1,68) ; 4,04 (1,77) ; 3,68 (1,69) et 3,13 (1,32) respectivement.

**Discussion:** Les résultats de cette étude démontrent que l'oméprazole a pour effet d'augmenter le métabolisme de la caféine chez les enfants. Par conséquent, l'oméprazole peut être considéré comme un inducteur modéré de l'activité du CYP1A2 dans cette population.

ARTICLE 2:

OMEPRAZOLE IS AN INDUCER OF CYP1A2 UNDER CONVENTIONAL  
THERAPEUTIC CONDITIONS IN CHILDREN

Marie-Claude Dubuc<sup>1\*</sup>, Eric Drouin<sup>2</sup>, Fernando Alvarez<sup>2</sup> and Jean-Louis Brazier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pharmacy Department,

<sup>2</sup> Division of Gastroenterology-Nutrition, Department of Pediatrics,  
Sainte-Justine Hospital, University of Montreal, Montreal, Qc, Canada

1.0 ABSTRACT

**Objective:** Several studies have been conducted in adult populations to ascertain the effect of omeprazole on the metabolism of caffeine, a substrate for CYP1A2. As CYP1A enzymes are involved in the activation of procarcinogens to carcinogens, the results of these trials are very contradictory and controversial. Omeprazole is increasingly prescribed for children suffering from gastroesophageal reflux disease (GERD). The aim of this study was to evaluate whether omeprazole induces the metabolism of caffeine in children under conventional therapeutic conditions for GERD.

**Study design:** Twenty-six children who were treated with omeprazole, 0.5 to 1.4 mg/kg daily for 8 weeks, for GERD proven by 24-hours oesophageal pH-probe monitoring and/or upper endoscopy, were included in the trial. They underwent a <sup>13</sup>C-caffeine breath test prior to the treatment, 2, 4 and 8 weeks during the treatment and 4 weeks post treatment (week 12).

**Results:** CYP1A2 enzyme activity is correlated to the % of <sup>13</sup>C dose eliminated by exhalation, after administration of 3mg/kg <sup>13</sup>C-[N-1,3,7-methyl]-caffeine, over a 2h period. The corresponding values, mean (SD), for pre-treatment, weeks 2, 4, 8 and 12 are 2.83 (1.39), 3.47 (1.68), 3.68 (1.69) and 3.13 (1.32) respectively. These results demonstrate a significant increase in CYP1A2 activity after 2, 4 and 8 weeks of treatment (student's paired *t*-test).

**Conclusion:** These results demonstrate that omeprazole increases the metabolism of caffeine in children. Consequently, it can be considered as a moderate inducer of hepatic CYP1A2 in this population.

---

\* Address for correspondance: Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, CP 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, (Qc) Canada H3C 3J7.

## 2.0 INTRODUCTION

Omeprazole, a substituted benzimidazole, is widely used as a proton pump inhibitor. In the pediatric population, it is generally reserved for patients refractory to more conventional treatments such as nutritional and positional measures and H<sub>2</sub>-antagonists (1). Nevertheless, its use in children is becoming more widespread.

Many studies have been conducted to ascertain the interaction of omeprazole with the metabolism of caffeine, mediated by the CYP1A2 enzyme. The results of these studies have been controversial mainly because CYP1A enzymes are involved in the activation of procarcinogens to carcinogens. Furthermore, contradictory results have been reported. *In vitro* and *in vivo* research have either demonstrated that omeprazole is an inducer of CYP1A2 activity (2-6), had no significant effect on CYP1A2 activity (7-11) or more recently that it had an inhibiting effect on CYP1A2 activity (12). All the *in vivo* studies have been conducted in adult populations. It has previously been shown that omeprazole doses required to heal erosive esophagitis in children are much higher than those required for adults (13). As enzyme induction is often concentration dependent, the induction effect could be more significant in the pediatric population, under conventional therapeutic conditions.

Because the *N*-demethylations of caffeine are specifically catalysed by CYP1A2 enzymes, caffeine metabolism can be taken as an *in vivo* marker of CYP1A2 activity. Blood sampling, which is usually required for the study of drug interaction, is undesirable when subjects are children. For this reason, in order to determine CYP1A2 activity in young subjects, we have chosen to utilise the <sup>13</sup>C-[*N*-1,3,7-methyl]-caffeine breath test (CBT). Furthermore, the CBT has previously been shown to be well tolerated in children (14). The CBT utilises isotopically labelled caffeine, given as an oral solution. Metabolism, via CYP1A2, removes the three labelled methyl groups which are converted to formaldehyde, formic acid, bicarbonate and carbon dioxide. The end product of this reaction, <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, is eliminated by exhalation. Therefore, the <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> enrichment of expired breath can be measured and correlated to CYP1A2 activity.

The aim of this study was to determine the effect of omeprazole treatment on the metabolism of caffeine, a substrate for CYP1A2, because CYP1A2 is involved in the activation of procarcinogens. This trial determines the effect of omeprazole under conventional therapeutic conditions in children suffering from GERD.

### 3.0 METHODS

#### 3.1 STUDY POPULATION

The study, which was approved by the local ethics committee, was carried out at Sainte-Justine Hospital, Montreal, Canada. Informed consent was obtained from every patient and/or parent before their inclusion in the trial. Twenty-six children (15 female and 11 male) aged between 5 months and 17 years (median 8 years) were included in the trial. In all of these children an 8 week treatment with omeprazole, 0.5 to 1.4 mg/kg daily, was indicated for GERD, proven by an abnormal 24-hour esophageal pHmetry and/or by upper endoscopy. Omeprazole was administered as enteric coated tablets or as enteric coated granules dispensed in hard gelatine capsules. For the children unable to swallow the medication whole, the granules were mixed in fruit puree, yoghurt or orange juice. None of the subjects had taken omeprazole in the 4 weeks preceding the trial. Patients who were treated with concomitant medication such as cimetidine, ciprofloxacin, carbamazepine, stirpentol, phenytoin, diazepam or warfarin, having a possible effect on CYP1A2 or CYP2C19, were not included in the trial. All patients were non-smokers and none had impaired hepatic functions.

#### 3.2 CAFFEINE BREATH TEST

A first CBT was conducted on the first day, just prior to the beginning of the treatment with omeprazole. Subsequent CBTs were performed on week 2, week 4 and week 8 of the treatment. In some cases, one last CBT was performed on week 12, 4 weeks after the treatment was stopped. All subjects took their daily dose of omeprazole in the morning, 15 minutes before their breakfast.

A 6 mg/mL aqueous caffeine solution was prepared by the hospital pharmacy. The caffeine dose (3 mg/kg equivalent to 0.5 mL/kg aqueous solution) was given orally, followed by the same volume of water to rinse the container. A first breath sample was obtained before the caffeine solution and at fixed intervals (30, 45, 60, 90 and 120 minutes) thereafter. Duplicate samples were taken at all times. All subjects were asked to stay seated throughout the sampling period in order to minimise physical activity, which has been shown to alter the isotopic abundance of expired CO<sub>2</sub> (15). Breath samples were collected in 10 mL non-silicone coated vials (Vacutainer®). The children blew through a plastic straw into the bottom of the vial until the walls of the tube showed water condensation. Breath samples for younger children unable to blow through a straw, were collected by placing a plastic mask, to which a 10mL syringe was attached, in front of their nose and mouth. Expired air was drawn into the syringe and transferred into the evacuated vial. The samples were kept at room temperature until analysis.

Isotope ratio measurements (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) of each sample, in duplicate, were carried out using Analytical Precision's breath analyser AP 2003 gas chromatography - isotope ratio mass spectrometer (GC-IRMS) (Analytical Precision, Norwich, UK: overall instrument precision ± 0.20 ‰). The δ <sup>13</sup>C and <sup>18</sup>O calibration on this apparatus are done using an on-line internally calibrated CO<sub>2</sub> reference gas, which is measured immediately after each breath CO<sub>2</sub> sample. The values of isotopic enrichments are expressed as ‰, with respect to Pee Dee Belemnite Limestones (PDB), and calculated as follows:

$$\delta \text{ ‰} = 1000 \cdot \left\{ \left[ \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{sample}} - \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{ref.}} \right] / \left( \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{ref.}} \right\}$$

### 3.3 CALCULATIONS AND STATISTICAL ANALYSIS

The <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> enrichment over the baseline values were calculated by subtracting the average pre-dose measurements to the average values obtained at 30, 45, 60, 90 and 120 minutes. The 2 hours cumulative <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> expired after administration of the <sup>13</sup>C-labelled substrate (Δ δ <sup>13</sup>C<sub>cum</sub>), expressed as ‰, was calculated according to the trapezoidal rule up to the last time point. The result was converted to the percentage recovery by

exhalation of the  $^{13}\text{C}$  dose administered according to the method described by Scholler et al. (16).

$$\% \text{ } ^{13}\text{C} \text{ dose recovered} = \frac{\Delta \delta \text{ } ^{13}\text{C}_{\text{cum}} \cdot (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}} \cdot \text{CO}_2\text{-production}}{\text{mM } ^{13}\text{C} \text{ administered} \cdot 10}$$

where  $\text{CO}_2 \text{ production} = (\text{BSA}) \cdot 300 \text{mM m}^{-2} \text{ hr}^{-1} \cdot 2 \text{ hr}$

and  $\text{mM } ^{13}\text{C} \text{ administered} = m \cdot n \cdot P \cdot W / M$

$(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{PDB}} = 0.011273$ ; BSA = body surface area in  $\text{m}^2$ ;  $m$  = caffeine dose in  $\text{mg/kg}$ ;  $n$  = number of  $^{13}\text{C}$  per caffeine molecule;  $P$  =  $^{13}\text{C}$  isotopic purity of the compound;  $W$  = patient weight in  $\text{kg}$ ;  $M$  = molecular weight of caffeine in  $\text{g/mol}$ . The body surface area was calculated according to Haycock et al. (17). This formula calculates the body surface area from the height and the weight of a patient and it has been reported to be valid for patients from infants to adults.

Student's paired  $t$ -test was used to compare the data before, during and after the omeprazole treatment. The results obtained on weeks 2, 4, 8 and 12 were compared to the pre-treatment results. According to this procedure, 4 comparisons are made, and in order to maintain a confidence interval of 95% on each comparison, a Bonferroni correction was applied. Consequently, the alpha level was lowered for each test to 0.012 to bring the overall alpha level back to 0.05.

#### 4.0 RESULTS

According to this study design, each patients served as their own control with pre-treatment CBT result values representing constitutive CYP1A2 activity and those obtained after omeprazole treatment representing induced activity. Figure 1 shows typical  $^{13}\text{CO}_2$  enrichment in expired breath, over a two-hour period, after  $^{13}\text{C}$ -caffeine administration in one 5-year-old child at the 4 test days. This figure shows that the caffeine dose ( $3\text{mg/kg}$ ) was sufficient to saturate the CYP1A2 enzyme demethylation sites as the  $^{13}\text{C}$  exhalation increases rapidly during the first 30 minutes and is kept

relatively constant thereafter. Table 1 displays the results for the % of  $^{13}\text{C}$  dose eliminated by exhalation as  $^{13}\text{CO}_2$  over a 2-hour period at pre-treatment, at weeks 2, 4 and 8 of the treatment and at week 12, 4 weeks post-treatment. The mean value of  $^{13}\text{CO}_2$  enrichment over the 2-hour period was significantly increased after 2, 4 and 8 weeks of treatment. The value then decreased 4 weeks post-treatment to a value that was not significantly different from the pre-treatment value (figure 2). These results show that an 8-week treatment with omeprazole is sufficient to significantly alter the activity of CYP1A2 enzymes in children. These findings support the fact that omeprazole is an inducer of CYP1A2.

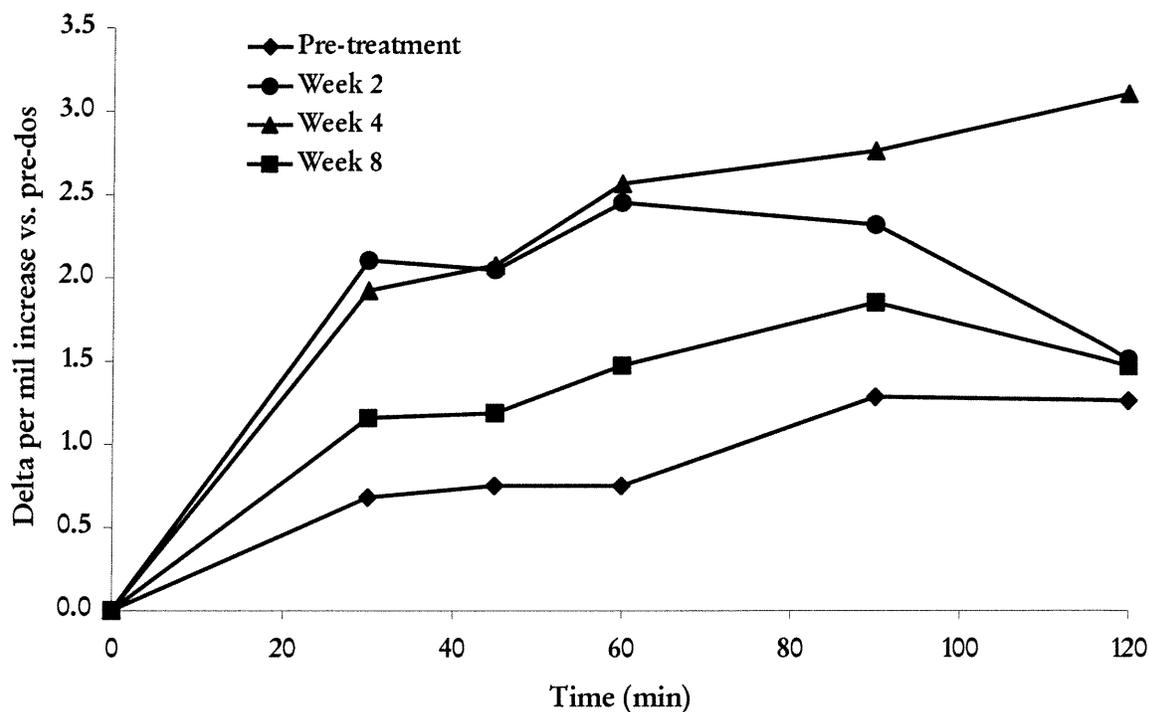
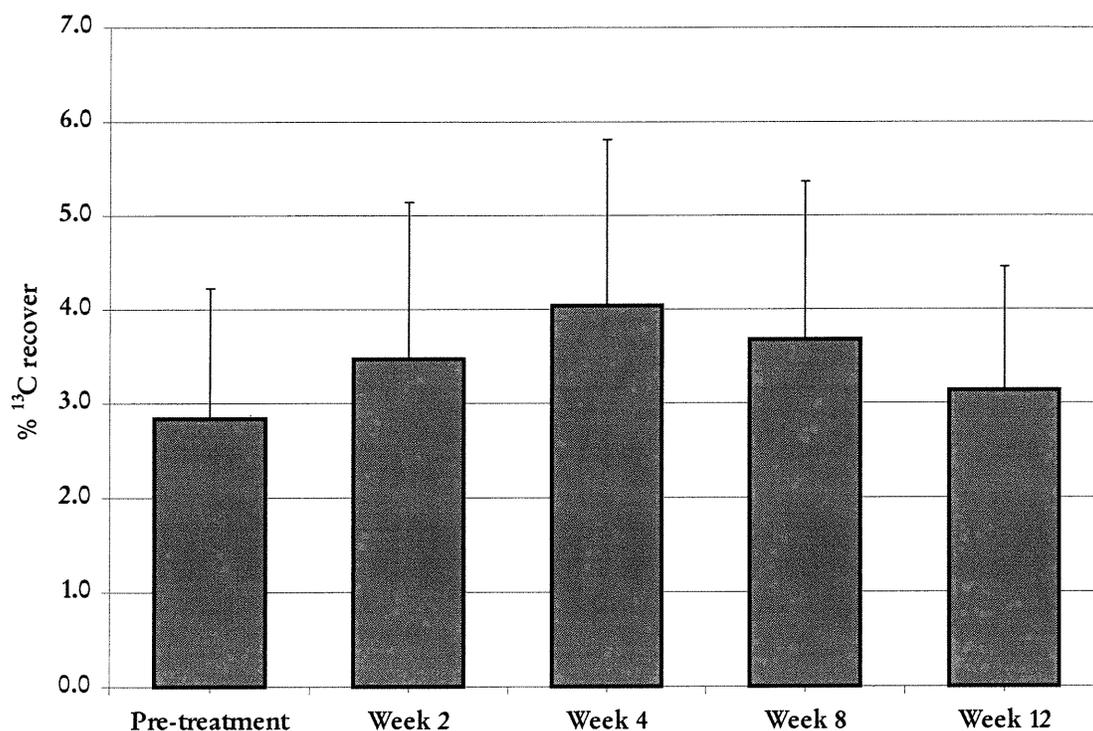


Figure 1. Enrichment of isotopic abundance of expired  $^{13}\text{CO}_2$  over a 2h period after administration of 3mg/kg of  $^{13}\text{C}$ -[1,3,7 N-methyl]-caffeine. Evolution of caffeine metabolism during an 8 week treatment with 10mg omeprazole in a 5 year old child (patient 16).



**Figure 2. Mean <sup>13</sup>C recovery evolution during an 8-week treatment with omeprazole and after 4 week post-treatment in children (n=26). Significantly different from pre-treatment value, \* P ≤ 0.01; \*\* P ≤ 0.001.**

## 5.0 DISCUSSION

As demonstrated by an increase in caffeine metabolism, an 8-week treatment with omeprazole was sufficient to significantly induce CYP1A2 enzyme activity in a population of 26 children. The results of the caffeine breath tests show that a significant increase in CYP1A2 activity is apparent after only 2 weeks of treatment for this population. At weeks 4 and 8 of the treatment, CYP1A2 enzymes activity remains significantly higher compared to the pre treatment values. 4 weeks after the end of the treatment (weeks 12) the caffeine metabolism is similar to that reported before the treatment (non-significant test). Furthermore, it is important to notice that the peak increase in CYP1A2 activity is observed at week 4.

**Table 1. Demographic data of patients and effect of 8-week omeprazole treatment on the <sup>13</sup>C-caffeine breath test.**

Patient	Sex	Age (year)	Weight (kg)	dosage (mg)	% of <sup>13</sup> C dose eliminated by exhalation				
					Day 1	Week 2	Week 4	Week 8	Week 12
1	M	3	16.8	10	4.96	3.08	5.42	4.71	3.59
2	F	13	62.0	40	4.06	6.22	4.21	4.34	4.76
3	M	3	15.8	10	4.72	4.02	6.25	3.96	4.98
4	F	8	22.0	20	3.42	4.19	4.10	3.63	3.43
5	M	9	32.5	20	2.65	4.00	7.48	4.69	4.96
8	F	0.5	6.7	5	1.22	1.45	1.62	1.76	1.35
10	F	9	30.0	40	3.22	NA	7.19	5.50	NA
11	M	14	51.0	40	1.25	1.82	2.93	0.51	0.67
13	F	15	48.0	20	1.58	3.68	3.82	2.52	3.19
14	F	17	59.0	40	2.01	2.52	2.20	2.19	1.15
15	F	0.4	6.5	5	1.32	1.80	2.33	6.44	NA
16	M	5	13.5	10	1.14	2.54	2.95	1.74	NA
18	M	12	31.0	20	3.03	3.12	2.01	2.52	2.96
19	M	16	75.0	40	3.88	NA	4.61	2.27	NA
20	M	12	26.0	20	4.65	8.61	6.18	6.63	3.26
21	M	13	31.2	20	3.54	4.07	5.92	5.87	4.93
22	F	5	20	15	4.67	2.67	4.24	3.80	3.49
25	F	2	9	10	1.06	1.28	1.23	NA	NA
26	F	17	67.5	40	1.01	1.69	3.24	1.62	1.61
27	F	0.4	7.2	5	0.50	1.69	NA	1.71	NA
28	F	2	14	10	2.55	3.93	4.35	4.23	2.95
29	F	5	17	10	4.24	5.11	6.56	3.64	2.40
31	M	8	24.1	20	3.25	5.06	2.65	3.07	3.80
32	F	11	33.4	20	4.54	3.98	2.70	6.27	NA
33	F	8	33.2	20	3.02	3.28	3.30	4.91	NA
34	M	8	24.0	20	2.17	3.42	3.40	3.34	2.89
Mean					2.83	3.47 *	4.04 **	3.68 *	3.13
SD					1.39	1.68	1.77	1.69	1.32

Day 1, Pre-treatment; weeks 2, 4 and 8, during treatment; week 12, 4-week washout period. NA, not available. Significantly different from pre-treatment value, \* P ≤ 0.01; \*\* P ≤ 0.001.

Thus, according to our protocol, omeprazole is an inducer of cytochrome P4501A2 activity in as much as caffeine is a specific substrate for CYP1A2. Previous studies have been conducted to ascertain the effect of omeprazole on the activity of CYP1A2 enzymes. The results and interpretations are very disapproving and debated. The first study to report such an interaction was conducted *in vitro* by Diaz et al. (2). They have shown that omeprazole produced a time- and concentration-dependant increase in CYP1A2 accumulation in primary cultures of human hepatocytes. The authors confirmed this effect by conducting an *in vivo* study on liver microsomes from five patients for whom hepatic biopsy specimens were available before and after administration of omeprazole (20 mg/day for 4 days). The results of this *in vivo* study demonstrated an increase in CYP1A2 activity. This first study, creating an interest in

the matter (18, 19), was nevertheless criticised (20, 21). The two biopsy specimens were obtained by different techniques (needle and wedge biopsies), and, the nonuniform distribution of CYP1A2 in liver could be solely responsible for the 2-fold increase in CYP1A2 activity. Then, a study conducted by Astra Hassle, demonstrated that a one week treatment with 20 mg omeprazole had no significant effect on the metabolism of caffeine, as demonstrated by caffeine urinary metabolite ratio, indicating that omeprazole treatment had no influence on CYP1A2 activity in the clinical situation (7). McDonnell et al. showed an induction of CYP1A genes by omeprazole in the alimentary tract. In this trial, endoscopic biopsy specimens were obtained from buccal mucosa, esophagus, gastric body, antrum, duodenum and colon of 6 healthy volunteers before and 1 week after taking 20 mg of omeprazole daily.

Following this work, two more conflicting *in vitro* studies were performed. Daujat et al. demonstrated that omeprazole is not a ligand for the Ah receptor (22), while Quattrochi et al. showed a nuclear uptake of the Ah receptor in response to omeprazole (4).

Rost et al. (5, 23) then confirmed that 40 mg omeprazole daily significantly induced the metabolism of caffeine in poor metabolisers only, while 120 mg doses were sufficient to induce CYP1A2 activity in extensive metabolisers. CYP1A2 activity, measured before and after a 7-day treatment with omeprazole, was correlated to caffeine urinary metabolite ratios, plasma clearance and breath test. The validity of these trials were questioned because they failed to include control groups (21). Following this criticism, Nousbaum et al. implemented a trial including a control group of 13 healthy volunteers, to evaluate the possible intra-individual variability of caffeine metabolism (6). They showed, using total plasma caffeine metabolites, that 20 mg omeprazole for 28 days had an inducing effect on CYP1A2 activity, without any change in the control group. This paper was criticised for a poor study design and incorrect statistical analysis by Andersson et al.(24). The authors chose to respond to this criticism (25).

Four more study using an 8 day or a 1 to 3 week treatment with 20 or 40 mg omeprazole demonstrated that it failed to alter CYP1A2 activity, using the kinetics and

metabolism of phenacetin (8), caffeine urinary metabolite ratios (9), omeprazole pharmacokinetics and the rate of caffeine metabolism (10) and theophylline pharmacokinetics (11), as CYP1A2 activity probes.

More recently, Rost et al. conducted a study in which a potential inhibitory effect of a single dose of omeprazole on caffeine metabolism was examined. The authors conclude that omeprazole exerts a weak and without clinical relevance concentration-dependant inhibition of CYP1A2 activity in man (12).

All these cited studies are heterogeneous in that their protocols vary by the duration of the treatment, the omeprazole doses administered and the methodology used to determine CYP1A2 activity. According to all this gathered information, it seems that the induction incurred by omeprazole treatment is proportional to the exposure to the drug. In fact, the trials using low doses (20 mg in adult subjects) for a short period of time (7 or 8 days) showed that the effect of omeprazole on CYP1A2 activity was non significant. However, high doses (40 mg in adult subjects) for a longer period was sufficient to induce its activity. We believe that the time factor is important because an enzymatic induction is a slow regulatory process (26). Furthermore, *in vitro* studies have shown a time- and concentration-dependant increase of CYP1A2 activity by omeprazole (2). Therefore, we have chosen to apply a study protocol in which a longitudinal design is ideal in order to observe a long-term response. Further, the omeprazole doses and treatment period we have chosen to study correspond to the conventional therapeutic conditions for GERD therapy in this population (13).

Others have previously proven the effect of omeprazole treatment on the caffeine metabolism in an adult population and we have demonstrated that it also holds for the pediatric population. However, we have also proven that, in this population, the induction effect of omeprazole is transient. Consequently, the trend of CYP1A2 enzyme activity has regressed to its pre-treatment value 4 weeks after the end of the 8 week treatment. Previous trials demonstrating the accelerated caffeine metabolism associated with omeprazole treatment have failed to show whether it had a long-term or a short-term effect on CYP1A2 activity. The hypothesis that induction of CYP1A2

entails accelerated activation of procarcinogens, which would therefore predict that the use of omeprazole is associated with a higher risk of malignancy, has not been proven. In fact, no such linkage has yet been shown in any population.

Further investigations need to be carried out on long-term use of this proton pump inhibitor in children. Moreover, the inducing effect of omeprazole associated with other environmental factors having an effect of CYP1A2 activity such as cigarette smoke, charcoal-broiled food and other polycyclic aromatic hydrocarbons should be investigated.

## 6.0 REFERENCES

1. Vandenplas Y, Belli D, Benhamou P, Cadranet S, Cezard J, Cucciara S, et al. A critical appraisal of current management practices for infant regurgitation - recommendations of a working party. *Eur J Pediatr* 1997;156:343-57.
2. Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint-Aubert B, Bories P, Michel H, et al. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 1990;99:737-47.
3. McDonnell WM, Scheiman JM, Traber PG. Induction of Cytochrome P4501A Genes (CYP1A) by Omeprazole in the Human Alimentary Tract. *Gastroenterology* 1992;103:1509-16.
4. Quattrochi L, Turkey R. Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: Transcriptional activation of the human CYP1A1 gene. *Mol Pharmacol* 1993;43:504-8.
5. Rost KL, Roots I. Accelerated caffeine metabolism after omeprazole treatment is indicated by urinary metabolite ratios: Coincidence with plasma clearance and breath test. *Clin Pharmacol Ther* 1994;55:402-11.
6. Noursbaum JB, Berthou F, Carlhant D, Riche C, Robaszkiewicz M, Gouerou H. Four-week treatment with omeprazole increases the metabolism of caffeine. *Am J Gastroenterol* 1994;89(3):371-175.
7. Andersson T, Bergstrand R, Cederberg C, Eriksson S, Lagerstrom P-O, Skanberg I. Omeprazole treatment does not affect the metabolism of caffeine. *Gastroenterology* 1991;101:943-7.
8. Xiaodong S, Gatti G, Bartoli A, Cipolla G, Crema F, Perucca E. Omeprazole does not enhance the metabolism of phenacetin, a marker of CYP1A2 activity, in healthy volunteers. *Ther Drug Monit* 1994;16:248-50.
9. Rizzo N, Padoin C, Palombo S, Scherrmann J-M, Girre S. Omeprazole and lansoprazole are not inducers of cytochrome P4501A2 under conventional therapeutic conditions. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;49:491-5.
10. Andersson T, Holmberg J, Rohss K, Walan A. Pharmacokinetics and effect on caffeine metabolism of the proton pump inhibitors, omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:369-75.
11. Dilger K, Zheng Z, Klotz U. Lack of interaction between omeprazole, lansoprazole, pantoprazole and theophylline. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:438-44.

12. Rost KL, Fuhr U, Thomsen T, Zaigler M, Brockmüller J, Bohnemeier H, et al. Omeprazole weakly inhibits CYP1A2 activity in man. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1999;37(11):567-74.
13. Hassall E, Israel D, Shepherd R, Radke M, Dalvag A, Skold B, et al. Omeprazole for treatment of chronic erosive esophagitis in children: A multicenter study of efficacy, safety, tolerability and dose requirements. *J Pediatr* 2000;137(6):800-7.
14. Lambert GH, Schoeller DA, Kotake AN, Flores C, Hay D. The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Dev Pharmacol Ther* 1986;9:375-88.
15. Gautier J, Pirnay F, Lacroix M, Mosora F, Scheen A, Cathelineau G, et al. Changes in  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  during exercise of different intensities. *J Appl Physiol* 1996;81(3):1096-102.
16. Schoeller D, Klein P, Watkins J, Heim T, Jr WM.  $^{13}\text{C}$  abundances of nutrients and effect of variations in  $^{13}\text{C}$  isotopic abundances of test meals formulated for  $^{13}\text{CO}_2$  breath tests. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2375-85.
17. Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH. Geometric method for measuring body surface area: A height-weight formula validated in infants, children and adults. *J Pediatr* 1978;93(1):62-6.
18. Farrell GC, Murray M. Human cytochrome P450 isoforms: Their genetic heterogeneity and induction by omeprazole (editorial). *Gastroenterology* 1990;99:885-9.
19. Parkinson A, Hurwitz A. Omeprazole and the induction of human cytochrome P-450: A response to concerns about potential adverse effects. *Gastroenterology* 1991;100(4):1157-64.
20. Wrighton SA, Watkins P. Nonuniform Distribution of cytochrome P4501A2 in liver. *Gastroenterology* 1991;100(5):1487-8.
21. Moldeus P, Berlin RG, Lu A, Castagnoli N, Carlsson E, Andersson T. P450/Losec. *Gastroenterology* 1991;100(5):1488-9.
22. Daujat M, Peryt B, Lesca P, Fourtanier G, Domergue J, Maurel P. Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188(2):820-5.
23. Rost KL, Brösicke H, Brockmüller J, Scheffler M, Helge H, Roots I. Increase of cytochrome P4501A2 activity by omeprazole : Evidence by the  $^{13}\text{C}$ -(N-3-methyl)-caffeine breath test in poor and extensive metabolisers of S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 1992;52(2):170-80.

24. Andersson T, Eriksson S, Walan A. Omeprazole and the metabolism of caffeine (letter to the editor). *Am J Gastroenterol* 1995;90(3):515-6.
25. Noursbaum JB, Berthou F, Carlhant D, Riche C, Robaszkiewicz M, Gouerou H. Response to Andersson et al. (letter to the editor). *Am J Gastroenterol* 1995;90(3):516-8.
26. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998;35(5):361-90.

### **PARTIE 3 : MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE ANALYTIQUE POUR LA SÉPARATION ET LA QUANTIFICATION DE L'OMÉPRAZOLE**

Pour être en mesure de déterminer les paramètres pharmacocinétique de l'oméprazole à partir d'échantillons plasmatiques, il faut d'abord mettre au point et valider une méthode analytique visant à quantifier l'oméprazole présent dans ces échantillons.

Les étapes du développement ont été les suivantes :

- Première étape: Détermination des conditions optimales (composition de la phase mobile, volume d'injection, gradient d'élution) avec lesquelles l'oméprazole, ses métabolites et l'étalon interne seront bien séparés tout en maintenant un temps d'analyse assez court.
- Deuxième étape: Mise au point d'une technique d'extraction qui permette d'extraire efficacement l'oméprazole, ses métabolites et l'étalon interne se trouvant dans les échantillons plasmatiques.
- Troisième étape : validation de la technique.

L'ensemble de ce travail est rapporté dans la publication suivante.

**ARTICLE 3:****A RAPID HPLC-DAD METHOD FOR SEPARATION AND DETERMINATION OF OMEPRAZOLE EXTRACTED FROM HUMAN PLASMA**

(Publié au: *Journal of liquid chromatography and related technologies*, Vol. 24, No 8, 2001)

**RÉSUMÉ ARTICLE 3**

Une nouvelle méthode analytique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été mise au point pour l'analyse de l'oméprazole dans le plasma. L'oméprazole et l'étalon interne (H168/24) ont été extraits d'échantillons plasmatiques en utilisant une méthode d'extraction en phase solide (SPE). L'oméprazole, ses métabolites et l'étalon interne ont été séparés par chromatographie à polarité de phases inversée à l'aide d'une colonne Eclipse XDB-C8 Rapid Resolution (4.6 x 50mm). La phase mobile, avec laquelle la colonne est conditionnée, est composée de 23% d'acétonitrile et 77% de tampon phosphate pH = 8,4 (30.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1.76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Un gradient d'élution fait varier la composition de la phase mobile, de façon linéaire pendant la première minute, jusqu'à 33% d'acétonitrile. L'absorbance est enregistrée à 302 nm pour l'oméprazole et ses métabolites et à 294 nm pour l'étalon interne. L'analyse est rapide (4 minutes). La limite de quantification inférieure est de 10 ng/mL et la fonction d'étalonnage est linéaire jusqu'à 2000 ng/mL. Cette méthode est applicable à l'étude des paramètres pharmacocinétique dans une population pédiatrique.

# A RAPID HPLC-DAD METHOD FOR SEPARATION AND DETERMINATION OF OMEPRAZOLE EXTRACTED FROM HUMAN PLASMA

M-C. DUBUC\*, C. HAMEL, M-S. CAUBET AND J-L. BRAZIER

*Chaire Pharmaceutique Famille Louis-Boivin, Médicaments, Grossesse et Allaitement  
Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada*

*(Submitted 27 September 2000)*

## 1.0 ABSTRACT

A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of omeprazole in human plasma is described. Omeprazole and the internal standard (H168/24) were extracted from plasma samples by solid phase extraction (SPE) using a polymeric sorbent-based cartridge. The separation was accomplished under reversed phase conditions using an Eclipse XDB-C8 Rapid Resolution (4.6 x 50mm) column. The mobile phase consisted of 23% acetonitrile and 77% of 30.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1.76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution, pH 8.4 in which a gradient elution was used to linearly change solvent composition to 33% acetonitrile and 67% phosphate buffer during the first minute. Absorbance was monitored at 302 nm for omeprazole and at 294 nm for the internal standard and the total analysis time was 4 minutes. The lower limit of quantification was 10 ng/mL and the calibration function is linear to 2000ng/mL. This method has been shown to be appropriate for pharmacokinetic studies involving children.

---

\* Address for correspondance: Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, CP 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, (Qc) Canada H3C 3J7.

## 2.0 INTRODUCTION

Omeprazole is a potent ( $H^+$ ,  $K^+$ )-ATPase (proton pump) inhibitor which has been demonstrated to be effective in the treatment of gastric acid related diseases; duodenal and gastric ulcers, reflux esophagitis and Zollinger-Ellison syndrome [1]. This drug is metabolised principally by CYP2C19 to generate 5'-hydroxy-omeprazole (OH-OPZ) [2], and a minor pathway, through CYP3A4 enzymes, generates omeprazole-sulphone (OPZ-SO<sub>2</sub>) [3]. CYP2C19 is known to present genetic polymorphism and individuals are classified as being either extensive metabolisers (EM) or poor metabolisers (PM). It has been demonstrated that the ratio of omeprazole to 5'-hydroxyomeprazole, determined in plasma samples 2h after the administration of the drug, could be used to assign this phenotype [4,5]. For this purpose, it is important to be able to simultaneously determine omeprazole and its major metabolite, 5'-hydroxyomeprazole, in plasma samples. Furthermore, the determination of omeprazole, and its major metabolites, OH-OPZ and OPZ-SO<sub>2</sub>, confers a maximum of information on the pharmacokinetics and metabolism of this drug.

Several HPLC methods have been reported for the determination of both omeprazole and 5'-hydroxyomeprazole in human plasma. However, in most of these studies, the liquid-liquid extraction is applied [6-9]. Liquid-liquid extractions are gradually being replaced by solid phase extraction (SPE) because this latter method is faster, more straight forward, solvent saving, avoids the manipulation of toxic solvents and is often more reproducible. One recent article describes a (SPE) method for the determination of both substances by HPLC-MS-MS [10]. Although the HPLC-MS-MS method generates good results, this apparatus is extremely expensive and is not widespread. A simple HPLC apparatus coupled with a diode array detector (DAD) is common in most laboratories and a technique developed on such a system could be of better use.

The purpose of this paper is to describe an HPLC method for the determination of OPZ in human plasma using a SPE technique, that is applied to a

DAD detector. The DAD enables to detect 2 wavelengths simultaneously. Therefore, the sensitivity of detection of the internal standard is not limited by its absorption at 302 nm (maximum absorbance of omeprazole).

### 3.0 EXPERIMENTAL

#### 3.1 EQUIPMENT

The method was developed on an 1100 Series HPLC System (Agilent Technologies, Kirkland, Qc, Canada). This system is composed of a quaternary pump, a vacuum degasser, a standard autosampler, a thermostatted column compartment and a diode array detector. The data analysis was performed using the HP ChemStation software, version A.06.03 (Hewlett Packard, Kirkland, Qc, Canada).

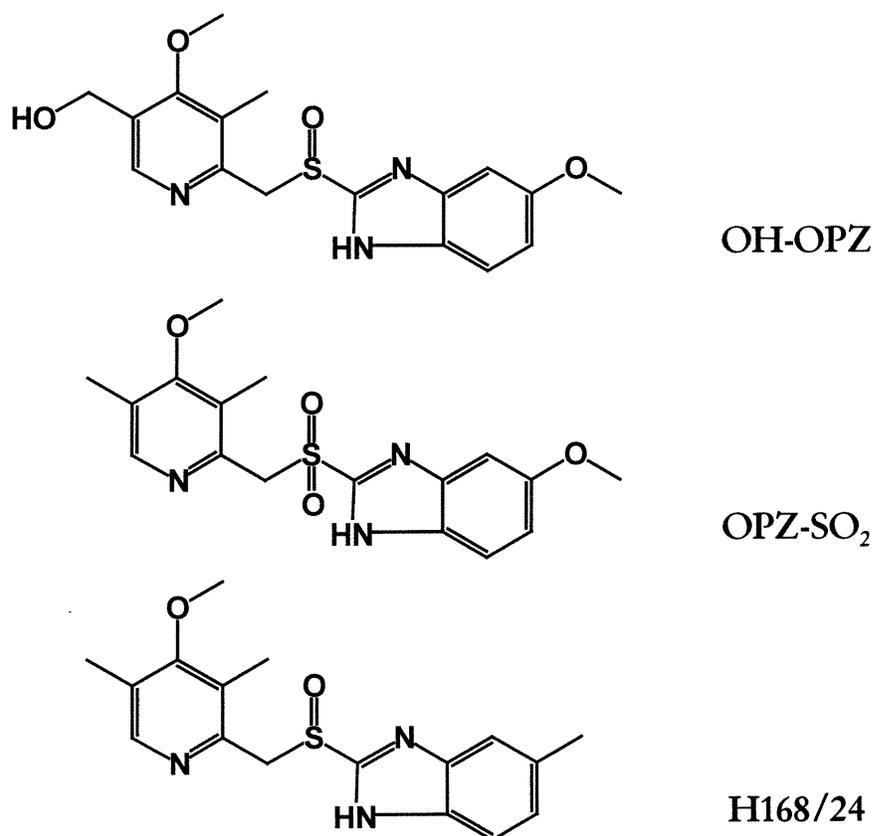


FIGURE 1: Structural formulae of omeprazole, 5'-hydroxyomeprazole, omeprazole sulfone and internal standard (H168/24)

### 3.2 REAGENTS

Omeprazole, 5'-hydroxyomeprazole and internal standard (H168/24) were provided by Astra Hässle (Mölnal, Sweden). For the mobile phase, acetonitrile was purchased from V.W.R. Scientific Ltee (Montreal, Quebec, Canada), HPLC water was from Moquin scientific Inc. (Lachenaie, Quebec, Canada), potassium dihydrogen orthophosphate and di-sodium hydrogen orthophosphate were from BDH (Toronto, On, Canada). Oasis SPE columns (60mg sorbent bed) were purchased from Waters (Milford, MA, USA). Solvents and chemicals were all of analytical grade.

### 3.3 CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

The mobile phase consisted of 23% acetonitrile and 77% phosphate buffer pH 8.4 (30.4mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 1.76mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aqueous solution), in which a gradient elution was used to linearly change solvent composition to 33% acetonitrile during the first minute. The composition was kept constant thereafter at 33% acetonitrile and 67% phosphate buffer. The system was allowed to stabilise at 23% acetonitrile for 3 minutes prior to each run. The mobile phase was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane from Gelma Sciences (Ann Arbor, Michigan, USA) and delivered at a flow rate of 1ml/min. Separation was carried out at 25°C on an Eclipse XDB-C8 Rapid Resolution 4.6 x 50mm, 3.5  $\mu\text{m}$  particle size column, coupled with a Zorbax XDB-C18 4.6 x 12.5mm, 3.5  $\mu\text{m}$  guard column (Hewlett Packard, Kirkland, Canada).

### 3.4 CALIBRATION AND REAGENT SOLUTIONS

A stock solution of omeprazole was prepared at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  by dissolving 20mg of omeprazole in 40 mL of methanol in a 200mL flask and by filling the flask to volume with carbonate buffer pH 11.4. Standards for calibration function in plasma (40, 10, 8, 4, 2, 1, 0.4 and 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were prepared by serial dilution of the 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$  stock solution. Solutions were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for several months without deterioration.

A single standard solution of 5'-hydroxyomeprazole was prepared in order to adequately identify its retention time and separate it from omeprazole. The quantification of this metabolite was not the aim of this study.

Analysis standards were prepared by adding  $25\ \mu\text{L}$  of each working standard, along with  $50\ \mu\text{L}$  of the internal standard solution ( $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), to  $500\ \mu\text{L}$  of drug-free plasma. These standards allowed to calculate a calibration function in a range of concentrations from 10 to 2000  $\text{ng}/\text{mL}$  for plasma concentrations.

### 3.5 SAMPLE PREPARATION: SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)

The frozen plasma was first allowed to thaw at room temperature and was mixed and centrifuged. An aliquot of  $500\ \mu\text{L}$  of the clinical plasma was transferred to a disposable glass culture tube. To this sample was first added  $50\ \mu\text{L}$  of the internal standard solution,  $25\ \mu\text{L}$  of carbonate buffer pH 11.4 and  $250\ \mu\text{L}$  of phosphate buffer pH 7.4. The samples were vortexed before being loaded onto an SPE column, which had previously been conditioned by passing 1 mL of methanol followed by 1 mL of water. The culture tubes and columns were washed with  $2 \times 375\ \mu\text{L}$  of 10% methanol in water. The columns were then dried under vacuum for 15 minutes after which 2 mL of methanol was added and allowed to pass through the column without vacuum. The eluate was recuperated in a clean glass culture tube and evaporated under a stream of nitrogen. Finally, the samples were reconstituted in  $250\ \mu\text{L}$  of phosphate buffer pH 7.4 and a  $75\ \mu\text{L}$  aliquot was injected into the HPLC system for analysis.

### 3.6 ANALYTICAL PARAMETERS

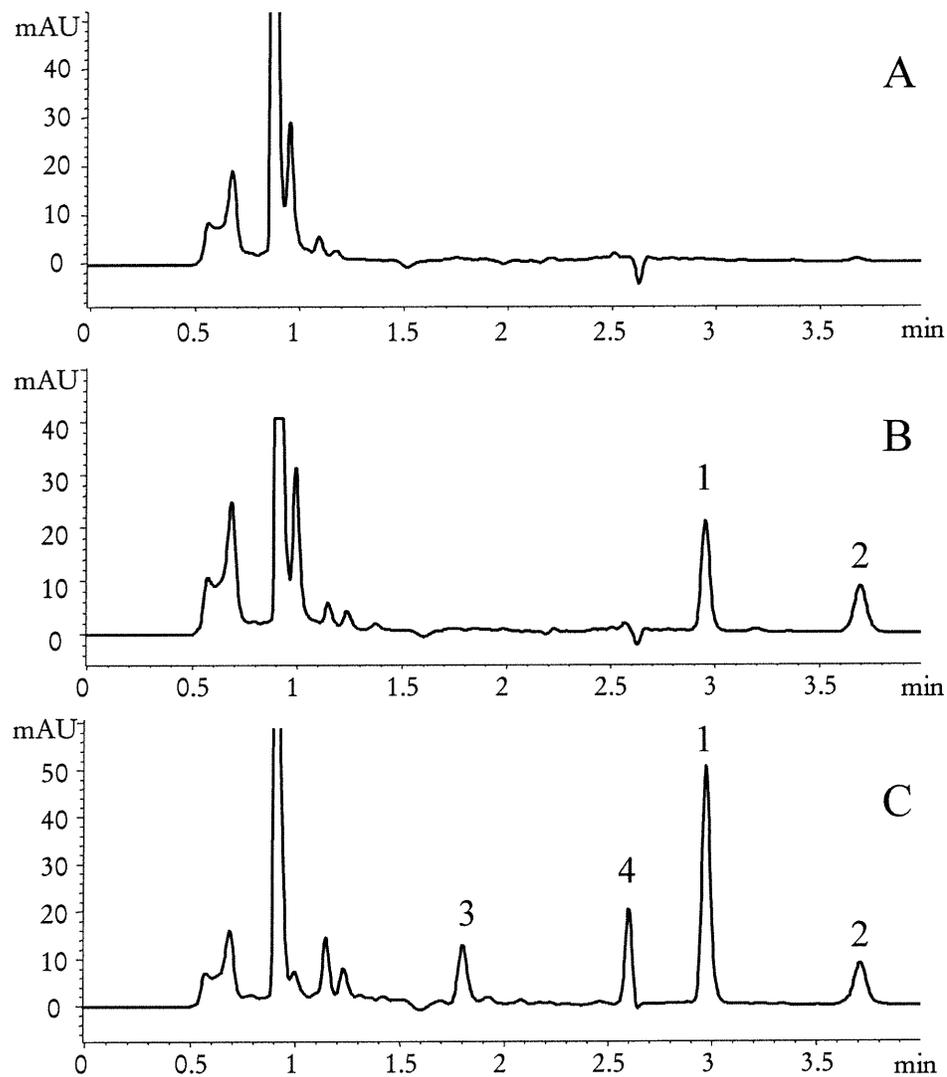
Extraction recoveries of omeprazole from plasma samples were evaluated by comparing peak area ratio (omeprazole/internal standard), with and without extraction. For the extracted sample, the internal standard was added after the extraction step.

Plasma standard samples (10, 20, 50, 100, 200, 400, 500, 2000 ng/mL) were analysed in triplicate on three separate days. The within-day variability and inter-day variability were determined from these data. Calibration curves were constructed by plotting peak area ratios (omeprazole/internal standard) versus standard concentrations and the best relationship was determined by linear least-squares regression analysis. Sequentially diluted solutions of omeprazole and the internal standard were injected onto the HPLC system to estimate the minimum amount detectable with a signal-to-noise ratio of 3 (limit of detection, LOD). The limit of quantification (LOQ) was set as the lowest concentration of the calibration function.

#### 4.0 RESULTS AND DISCUSSION

The analytical method was modified from that of Lagerström et al., Kobayashi et al. and Macek et al. as they used liquid-liquid extraction from 1 mL plasma samples. Furthermore, Amantea et al. and Mihaly et al. failed to identify the 5'-hydroxyomeprazole metabolite. Our method is the only one combining a solid-phase extraction and diode array detection for the determination of omeprazole and its separation from the major metabolites, 5'-hydroxy-omeprazole and omeprazole sulfone.

Representative chromatograms of extracts obtained from drug-free plasma, plasma spiked with 200 ng/mL each of omeprazole and the internal standard, and a subject's plasma sample in which omeprazole, its metabolites and the internal standard are apparent, are presented in figure 2. The total run time was 4 minutes and showed good resolution of omeprazole from its metabolites. Retention times for 5'-hydroxyomeprazole, omeprazole and the internal standard were 1.8 min, 2.98 min and 3.7 min respectively. The peak apparent at 2.6 min is identified as the sulfone metabolite of omeprazole; however, its quantification is not the concern of this article. The identification of this metabolite was based on its appearance as a quantitatively major metabolite product, as well as similarity of relative retention times to previously published reports in which reference standards of omeprazole sulfone were available [6,11].



**Figure 2: Chromatograms monitored at 302 nm of (A) blank pooled human plasma, (B) pooled human plasma spiked with omeprazole and internal standard at concentration of 200ng/mL and (C) subject's plasma 3h after oral administration of 20mg omeprazole. 1 = OPZ, 2 = H168/24, 3 = OH-OPZ and 4 = OPZ-SO<sub>2</sub>**

The calibration curve of omeprazole responded to the following equation:  $y = 0.0066x - 0.0168$  ( $R^2 = 0.999$ ). The detector response showed good linearity for quantification of omeprazole in the studied range of concentration. The LOD was evaluated at 3 ng/mL, while the LOQ was set at 10 ng/mL. For the within-day assay variability ( $n=3$ ), the coefficient of variation (C.V.%) was always lower than 1% over the entire range of concentrations. For the inter-day variability ( $n=3$ ), C.V.% was always lower than 5% over the entire range of concentration.

The recovery experiments demonstrated that the solid phase extraction is an efficient extraction procedure. Omeprazole was recovered, as an average over the entire concentration range, at  $94.5 \pm 5.1$  %. The efficacy of the recovery was not dependent of the OPZ concentration present in the samples. The accuracy of the assay was investigated using a 300 ng/mL standard. The mean  $\pm$  SD (C.V.%) was  $301.74 \pm 2.19$  (0.73%) for this spiked plasma sample.

#### 4.1 APPLICATION

This analytical method has been applied to clinical plasma samples collected from a pharmacokinetic study in 2 children receiving omeprazole daily. Plasma omeprazole concentrations versus time profiles from these subjects are presented in figure 3. Patient 1 was 10 years old and received a dose of 20mg omeprazole orally. Patient 2, a 5 years old, received 15mg omeprazole orally. 1mL blood samples were drawn before the drug was administered and 0.5, 1, 2, 3 and 5 hours after the dose was administered. Because only a small quantity of plasma ( $500\mu\text{L}$ ) is necessary for this method, it is applicable for studies in pediatric populations without difficulty.

This paper describes a sensitive, specific, rapid and solvent saving (SPE versus liquid-liquid extraction) HPLC-DAD method for the determination of omeprazole, 5'-hydroxyomeprazole and omeprazole sulfone, and for the quantification of omeprazole in human plasma samples. This method is applicable to the determination of omeprazole quantification in the case of pharmacokinetic studies.

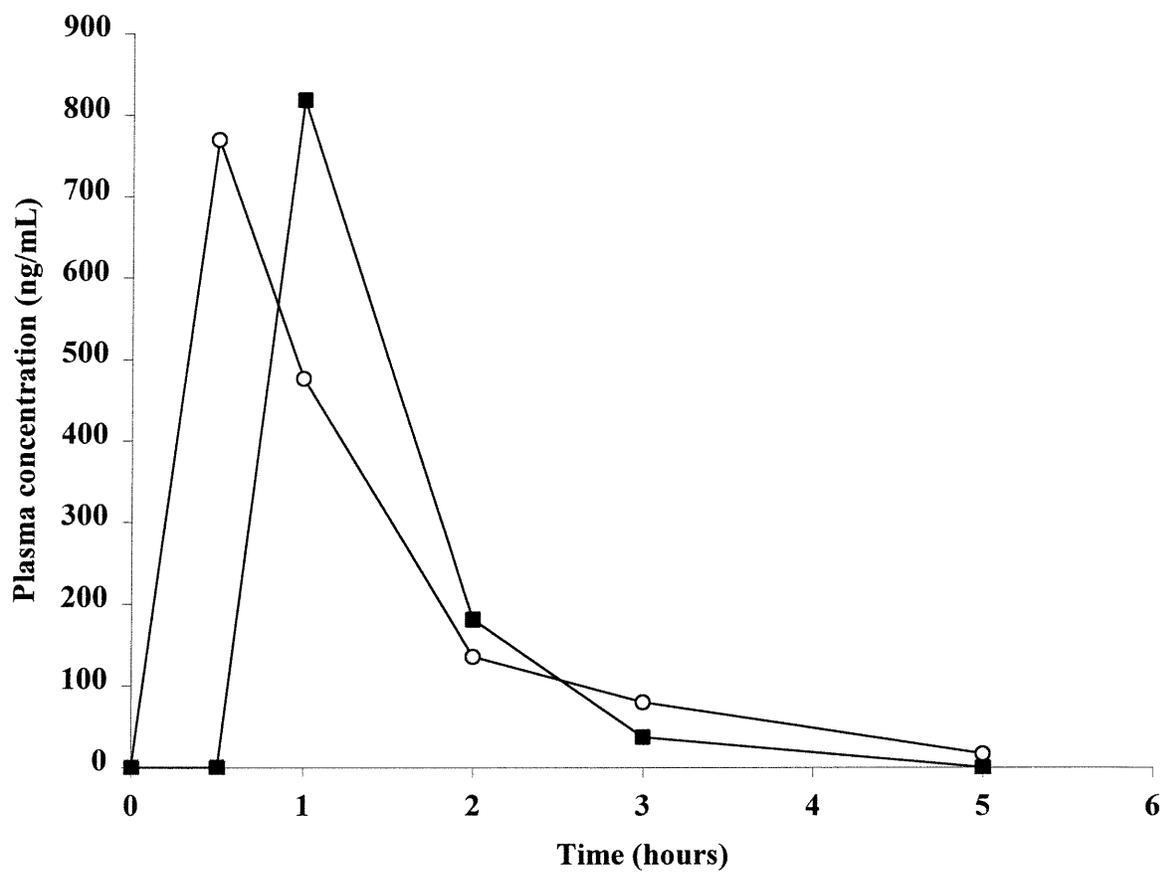


FIGURE 3: Plasma omeprazole concentration versus time profiles in 2 children after administration of 20mg and 15mg doses at steady state respectively. ■ = Patient 1, age 10; ○ = Patient 2, age 5.

## 5.0 REFERENCES

1. P. N. Maton. *N Eng J Med*, **324**, 965-975 (1991).
2. W. G. Karam, J. A. Goldstein, J. M. Lasker and B. I. Ghanayem. *Drug Metab Dispos*, **24**, 1081-1087 (1996).
3. H. Yamazaki, K. Inoue, P. M. Shaw, W. J. Checovich, F. P. Guengerich and T. Shimada. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**, 434-442 (1997).
4. J. D. Balian, N. Sukhova, J. W. Harris, J. Hewett, L. Pickle, J. A. Goldstein, R. L. Woosley and D. A. Flockhart. *Clin Pharmacol Ther*, **57**, 662-669 (1995).
5. S. Kortunay, N. E. Basci, A. Bozkurt, A. Isimer, A. Sayal and S. O. Kayaalp. *Eur J Clin Pharmacol*, **53**, 261-264 (1997).
6. P. O. Lagerström and B. A. Persson. *J Chromatogr*, **309**, 347-356 (1984).
7. M. A. Amantea and P. K. Narang. *J Chromatogr B Biomed Appl*, **426**, 216-222 (1988).
8. K. Kobayashi, K. Chiba, D. R. Sohn, Y. Kato and T. Ishizaki. *J Chromatogr*, **579**, 299-305 (1992).
9. J. Macek, P. Ptacek and J. Klima. *J Chromatogr B Biomed Appl*, **689**, 239-243 (1997).
10. E. J. Woolf and B. K. Matuszewski. *J Chromatogr A*, **828**, 229-238 (1998).
11. G. W. Mihaly, P. J. Prichard, R. A. Smallwood, N. D. Yeomans and W. J. Louis. *J Chromatogr*, **278**, 311-319 (1983).

#### **PARTIE 4 : DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES PHARMACOCINÉTIQUES DE L'OMÉPRAZOLE CHEZ LES ENFANTS**

L'épreuve de pharmacocinétique est réalisée à la quatrième semaine pour les patients qui ont accepté d'y participer. Cette épreuve est d'une durée d'environ 5h15. Elle prévoit une première prise de sang au temps t-15 minutes avant la prise de la dose quotidienne d'oméprazole. Cet échantillon sert de blanc pour la méthode analytique. Au temps considéré comme t=0, la dose d'oméprazole est administrée comme à l'habitude. Des prélèvements sanguins de 1mL chacun sont ensuite recueillis au temps t+30 min, t+1h, t+2h, t+3h et t+5h. L'analyse par HPLC de ces échantillons permet d'évaluer la concentration plasmatique d'oméprazole chez ces sujets. La courbe des concentrations plasmatiques de l'oméprazole en fonction du temps permet de déterminer la pharmacocinétique de l'oméprazole dans cette population. Les paramètres pharmacocinétiques seront d'abord évalués par une méthode compartimentale (Adapt-II). Les résultats de cette analyse permettront de faire une analyse de pharmacocinétique de population (IT2S).

**ARTICLE 4:****A POPULATION PHARMACOKINETIC ANALYSIS OF  
ORAL OMEPRAZOLE IN CHILDREN WITH  
GASTRO-OESOPHAGEAL REFLUX DISEASE**

(Soumis au journal: *Therapeutic Drug Monitoring*)

**RÉSUMÉ ARTICLE 4**

Les paramètres pharmacocinétiques de l'oméprazole ont été étudiés en profondeur chez les adultes, puisque son usage est très répandu dans cette population. Très peu d'études rapportent des résultats de pharmacocinétique de l'oméprazole chez des enfants. Le but de cette étude est de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de l'oméprazole dans une population d'enfants traités pour des symptômes de reflux gastro-oesophagien (RGO). Onze enfants (âge moyen : 5,7 ans) ont reçu 0.6 à 0.8 mg/kg par jour d'oméprazole pour une durée de 8 semaines. À la semaine 4, 6 échantillons sanguins ont été recueillis sur une période de 5 heures. Les concentrations plasmatiques de ces échantillons ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés en utilisant le maximum de vraisemblance (Adapt-II) et ceux-ci ont servi de paramètres initiaux pour l'analyse itérative à deux-stades (IT2S). Les concentrations plasmatiques ont été ajustés correctement en utilisant un modèle à deux compartiments avec un temps de latence pour l'absorption ( $r^2=0.996$ ). Les paramètres de population moyens (moyenne  $\pm$  écart-type) de  $V_{ss}/F$  ( $0.48 \pm 0.20$  L/h·kg),  $t_{1/2 \beta}$  ( $0.77 \pm 0.44$  h), et  $k_a$  ( $2.8 \pm 1.15$  hr<sup>-1</sup>) sont similaires à ceux obtenus chez les adultes. Par contre, la clairance ( $Cl/F = 0.65 \pm 0.510$  L/h/kg) est nettement supérieure à celle décrite dans la littérature. En effet, elle est deux fois plus importante que celle rapportée chez les adultes. Cette étude supporte l'hypothèse que les enfants ont une clairance systémique supérieure à celle des adultes.

# A POPULATION PHARMACOKINETIC ANALYSIS OF ORAL OMEPRAZOLE IN CHILDREN WITH GASTRO-OESOPHAGEAL REFLUX DISEASE

Marie-Claude Dubuc<sup>1</sup>, Jean-François Marier<sup>1</sup>, Eric Drouin<sup>2</sup>,  
Fernando Alvarez<sup>2</sup> and Jean-Louis Brazier<sup>1</sup>,

*(Submitted January 2001)*

## 1.0 ABSTRACT

The pharmacokinetics of omeprazole has been extensively studied in healthy adult patients, as its use is widespread in the population. The objective of this study was to determine the pharmacokinetic parameters of omeprazole in a pediatric population treated for gastro-oesophageal reflux disease. Eleven children (mean age: 5.7 years) received between 0.6 and 0.8 mg/kg of omeprazole every 24 h for 8 weeks. On week 4, 6 blood samples were collected and plasma omeprazole was assessed using HPLC. Pharmacokinetic parameters were derived using maximum likelihood (Adapt-II) and used as initial estimates in an iterative two-stage analysis (IT2S). Plasma concentrations were appropriately fitted using a two-compartment model with lag time for absorption. The quality of fit was very good ( $r^2=0.996$ ), and distribution of weighted residuals was homoscedastic. Mean fitted population parameters (mean  $\pm$  SD) of  $V_{ss}/F$  ( $0.48 \pm 0.20$  L/h·kg),  $t_{1/2\beta}$  ( $0.77 \pm 0.44$  h), and  $k_a$  ( $2.8 \pm 1.15$  hr<sup>-1</sup>) were similar to those found in the adult population. However, mean fitted  $Cl/F$  ( $0.65 \pm 0.510$  L/h/kg) is in sharp contrast with the literature as it is approximately 2-fold higher than results from an adult population. This study supports the hypothesis that children have a higher systemic clearance of omeprazole than adults do. Whether the increase in clearance is due to the fact that liver volume normalised for body weight is greater in children or that phase I metabolism is more efficient in pediatric liver remains to be determined. Key Words: Omeprazole – Population Pharmacokinetics – Children.

---

\* Address for correspondance: Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, CP 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, (Qc) Canada H3C 3J7.

## 2.0 INTRODUCTION

Omeprazole is a potent ( $H^+$ ,  $K^+$ )-ATPase (proton pump) inhibitor which has been demonstrated to be effective in the treatment of gastric acid related diseases; duodenal and gastric ulcers, reflux esophagitis and Zollinger-Ellison syndrome (1).  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase is the enzyme responsible for the last step of acid secretion by the parietal cell. Omeprazole, a substituted benzimidazole, is a weak base and will concentrate in the acidic compartment of the parietal cell (pH  $\sim$ 1), where it will be converted to its sulfinamide form and subsequently form a disulfide bond with accessible sulfhydryl groups on the  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase. The long duration of action is due to the prolonged irreversible binding between the inhibitor and the enzyme. In fact, the only way for the ATPase to regain its activity is by *de novo* synthesis of the  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase or by the scavenging effect of glutathione. Because the half-life of the proton pump is  $\sim$ 50h, 25% of the pumps are synthesised *de novo* after 24h (2). For this reason, the inhibitory effect on the gastric acid secretion is not directly related to the plasma concentration of omeprazole at any given time. Omeprazole, which is sensitive to degradation in an acidic environment, is administered as an enteric coated tablet, or enteric-coated granules dispensed in hard gelatine capsules.

The pharmacokinetics of oral omeprazole in adults has been investigated extensively as its use is widespread in this population(3-5). However, only a few studies have reported pharmacokinetics data in children. In 1992, Kato et al. (6) studied the pharmacokinetics of oral administration in 2 children age 4 and 10, on days 1 and 7. Subsequent to this study, Jacqz-Aigrain et al. (7) evaluated the pharmacokinetic parameters of intravenous omeprazole in 13 children presenting a variety of underlying diseases. In 1996, Kato et al. (8) investigated the pharmacokinetics of oral omeprazole in seven children aged between 3 and 18 years of age. To date, no study has reported results for the pharmacokinetics of oral omeprazole in children under 3 years of age. Omeprazole is increasingly used in the pediatric population and a better understanding of the pharmacokinetics in this population is of use. The aim of this study is to determine pharmacokinetic parameters of omeprazole at steady state in children treated for gastroesophageal reflux disease (GERD).

### 3.0 METHODS

#### 3.1 PATIENTS

The study was approved by the local Ethics Committee and each volunteer (child and/or guardian) gave written informed consent before the start of the study. Eleven children, treated at the gastroenterology and nutrition clinic of Sainte-Justine Hospital, were included in this trial. In these children, aged between 6 months and 12 years (mean, 5.7 years), omeprazole was indicated for GERD confirmed by an abnormal 24-hour esophageal pHmetry and/or by upper endoscopy. All patients were otherwise healthy. Omeprazole dosage was determined according to the patients' body weight. Omeprazole was administered as 20 mg enteric-coated capsules or as enteric coated granules mixed with orange juice, fruit purée or yoghurt for children unable to swallow the capsules. The demographic data and omeprazole dosage of this population are presented in Table 1.

#### 3.2 PHARMACOKINETIC STUDY

The pharmacokinetic study was performed at steady state, 4 weeks after the beginning of the 8-week treatment. The patients were asked to arrive at the hospital before 9:00 in the morning with an empty stomach. Upon their arrival, the research nurse installed a catheter in the subjects' arm in order to avoid multiple venipunctures. A first blood sample (1 ml) was collected before the administration of the drug. Fifteen minutes after the drug administration, the patients had breakfast. Subsequent blood samples were drawn at 0.5, 1, 2, 3 and 5 h after drug administration in heparinized tubes, which were kept at 4°C for a maximum of 1 hour and were then centrifuged. Plasma samples were conserved at -20°C until analysis. Omeprazole plasma concentrations were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) by a method adapted from that of Lagerström (9). The extraction of omeprazole from the matrix was performed by solid phase extraction (SPE) (10). The calibration function of omeprazole was linear from 10 to 2000 ng/ml.

### 3.3 COMPARTMENTAL PHARMACOKINETIC ANALYSIS

Pharmacokinetic analysis was performed using a compartmental method. Several models were investigated during the model build up process. The most appropriate one was chosen based on the law of parsimony (simplest model), the Akaike criterion test (AIC), coefficient of correlation ( $r^2$ ), inspection of weighted residuals versus the observed plasma concentrations, and by visually inspecting graphs of fitted concentrations. Initial values of pharmacokinetic parameters were obtained using maximum likelihood analysis with ADAPT-II (11). These parameters were used as initial estimates for the population pharmacokinetic analysis, which was performed using an iterative two-stage method analysis (IT2S) (12). Observed omeprazole plasma concentrations values (ng/ml) were fitted using a weighting factor of  $W_i=1/S_i^2$  where the variance  $S_i^2$  was calculated for each observations using the following equations:  $S_i^2 = [(a \cdot Y) + b]^2$ . In this equation, a, Y, and b are respectively the residual variability, the observed concentrations, and the standard deviations related to the limit of detection of the analytical assay. These last parameters were updated iteratively during the population analysis until they were estimated with robustness (VARUP10, IT2S).

**Table 1.** Demographic data and omeprazole dosage for patients included in the trial.

Patient ID	Gender	Race	Age (years)	Dose (mg)	Weight (kg)	Height (cm)
1	M	Caucasian	3	10	16.8	106.7
5	M	Caucasian	9	20	32.5	139.1
8	F	Caucasian	0.5	5	6.7	70.0
12	F	Caucasian	0.5	5	6.0	66.0
15	F	Caucasian	0.5	5	6.5	68.0
16	M	Caucasian	5	10	13.5	99.8
18	M	Caucasian	12	20	31.0	130.1
22	F	African	5	15	20.0	116.4
31	M	Caucasian	8	20	24.1	125.3
32	F	Caucasian	11	20	33.4	137.4
33	F	Caucasian	8	20	33.2	131.3
		Mean	5.7	13.6	20.34	108.19
		STDEV	4.23	6.74	11.199	28.477
		CV%	74.4	49.4	55.1	26.3
		Min	0.5	5	6.0	66.0
		Median	5	15	20.0	116.4
		Max	12	20	33.4	139.1

## 4.0 RESULTS

Demographic data of patients included in the trial are presented in Table 1. Omeprazole doses were administered at approximately 0.7 mg/kg for all children, the exact doses administered are also presented in Table 1. Individual omeprazole profiles on week 4 of treatment (day 27) are presented on a linear and a log-scale in Figure 1. Omeprazole plasma concentrations in pre-dose samples were all below the limit of quantification, which means that omeprazole was completely eliminated within 24 hours. Lag time for drug absorption was highly variable throughout the population. The first measurable plasma concentration ranged from 0.5 to 2 hours. For this reason, a one- and a two-compartment model with lag time for absorption were tested. The simplest model that best fitted omeprazole plasma concentrations was a two-compartment model with lag time for absorption, as confirmed by the AIC of  $-2.73$  compared with  $10.82$  for a one-compartment model with lag time.

**Table 2.** Individual population pharmacokinetic parameters of omeprazole in children.

Patient ID	Cl/F (L/h·kg)	Vc/F (L/kg)	Vss/F (L/h·kg)	AUC (ng/h·L)	Lag (hr)	ka (1/hr)	T1/2 $\alpha$ (hr)	T1/2 $\beta$ (hr)	r <sup>2</sup>
1	1.69	0.69	0.77	352	0.46	1.64	0.191	0.382	0.976
5	0.65	0.60	0.67	942	1.74	1.08	0.229	0.750	1.000
8	1.40	0.55	0.62	532	0.89	2.84	0.176	0.372	1.000
12	0.19	0.38	0.38	4461	0.29	1.86	0.249	1.417	0.995
15	0.81	0.49	0.49	955	0.01	1.86	0.249	0.424	0.993
16	0.28	0.27	0.35	2655	0.96	4.32	0.169	0.936	0.992
18	0.18	0.16	0.18	3642	0.00	4.04	0.203	0.710	1.000
22	0.72	0.44	0.56	1041	0.36	3.60	0.166	0.612	0.997
31	0.70	0.55	0.66	1191	0.20	2.00	0.199	0.718	0.999
32	0.36	0.22	0.23	1646	0.00	3.80	0.216	0.442	1.000
33	0.14	0.27	0.34	4266	0.42	3.80	0.185	1.734	1.000
Mean	0.65	0.42	0.48	1971	0.49	2.80	0.203	0.773	0.996
STDEV	0.51	0.17	0.19	1519	0.53	1.15	0.0297	0.441	0.007
CV%	78.8	40.8	40.8	77.1	108.8	41.0	14.6	57.1	0.7
Min	0.14	0.16	0.18	352	0.00	1.08	0.166	0.372	0.976
Median	0.65	0.44	0.49	1191	0.36	2.84	0.199	0.710	0.999
Max	1.69	0.69	0.77	4461	1.74	4.32	0.249	1.734	1.000

Cl/F, central clearance; Vc/F, central volume of distribution; Vss/F, total volume of distribution; AUC, area under curve; Lag; lag time for absorption; ka; rate constant of absorption; T1/2 $\alpha$ ; distribution half-life; T1/2 $\beta$ ; elimination half-life; r<sup>2</sup>, coefficient of correlation.

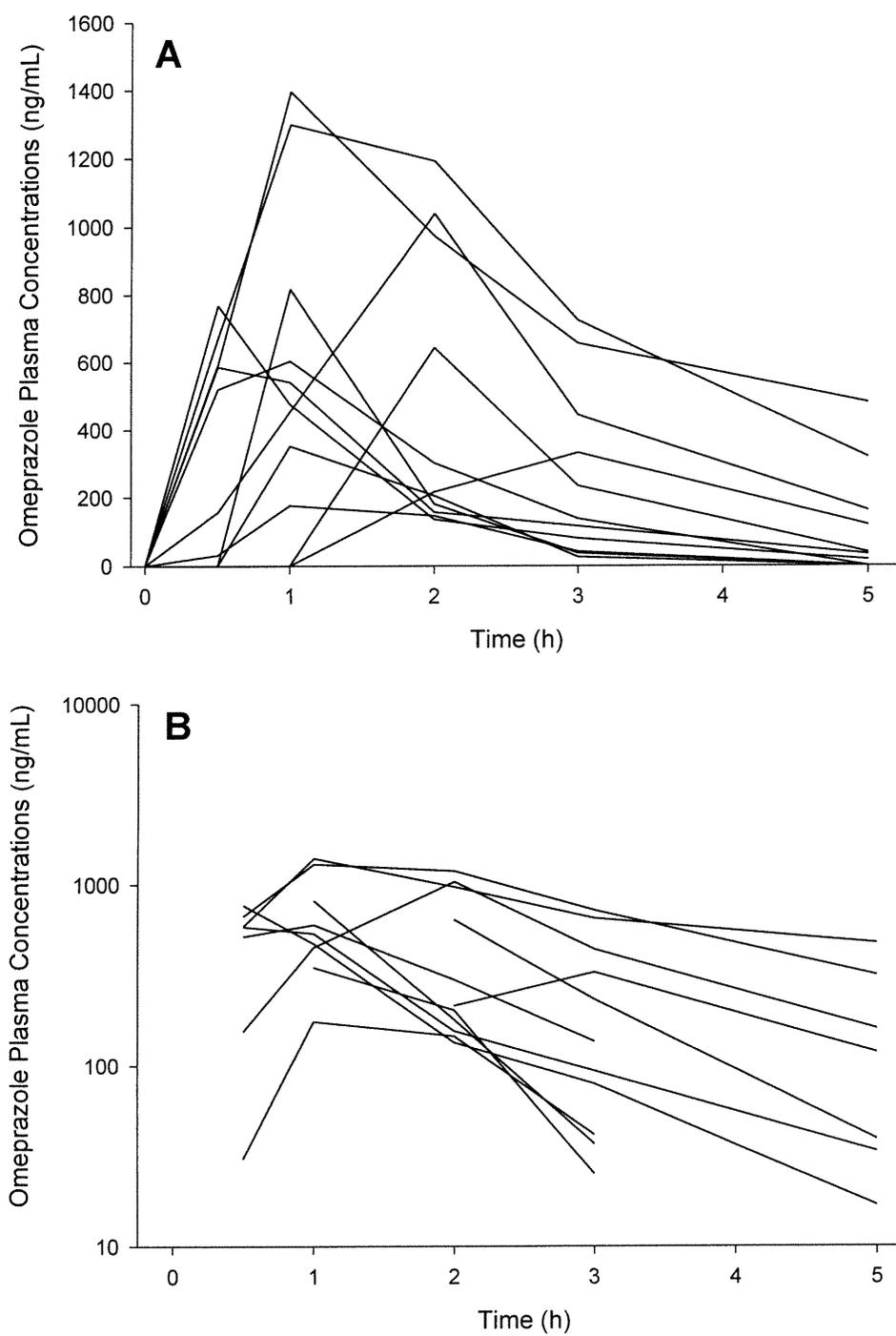
Of all the covariates used to correct the pharmacokinetic parameters, body weight was found to decrease significantly the inter-patient variability. An homoscedastic distribution of the weighted residuals confirmed the absence of bias and this was verified using the Wilcoxon rank test. Weighted residuals versus observed plasma concentration data are presented in Figure 2. Examples of fitted and observed omeprazole plasma concentrations in patients with 3, 4 and 5 data points are presented in Figure 3. The good quality of fit for all patients demonstrates that the number of data points available did not affect the quality of fit.

Individual population pharmacokinetic parameters and their associated inter-individual variability (CV%) are presented in Table 2. Average lag times are intrinsic to each subject and do not have a homogeneous distribution. For this reason, lag times are presented but should not be considered as population parameters.

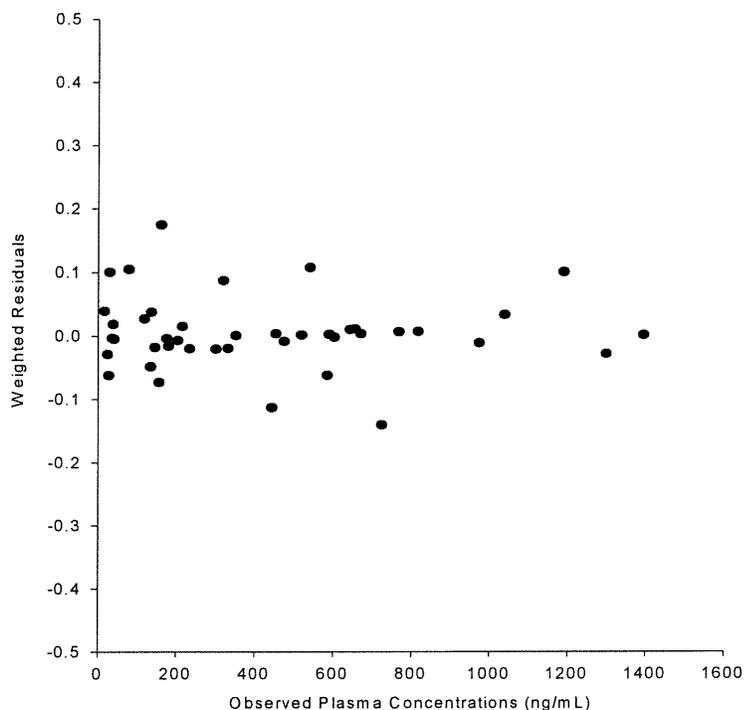
## 5.0 DISCUSSION

The population pharmacokinetic parameters of omeprazole were determined in eleven children with GERD for the first time. For the compartmental model discrimination process, one and two-compartment models with lag time for absorption were evaluated. Corrections for body weight (kg) decreased the intersubject variability significantly since the age range that was covered in this study was high. In effect, prior to this correction, the variability in clearance and volume of distribution was representative of the heterogeneous distribution of the young subjects' demographic data. Age and body weight values ranged from 0.5 - 12 years and 6.5 - 33.4 kg respectively. For this reason, all compartmental models tested included correction for body weight.

Since omeprazole is commercialised as an enteric-coated formulation (Losec®), a substantial delay in drug absorption is observed. This is representative of the transit time of the tablet or granules to reach the duodenum (pH 6) where the coating would be readily dissolved. For some patients, the first measurable plasma concentration was observed 2 hours after drug administration. However, once the granules are dissolved,

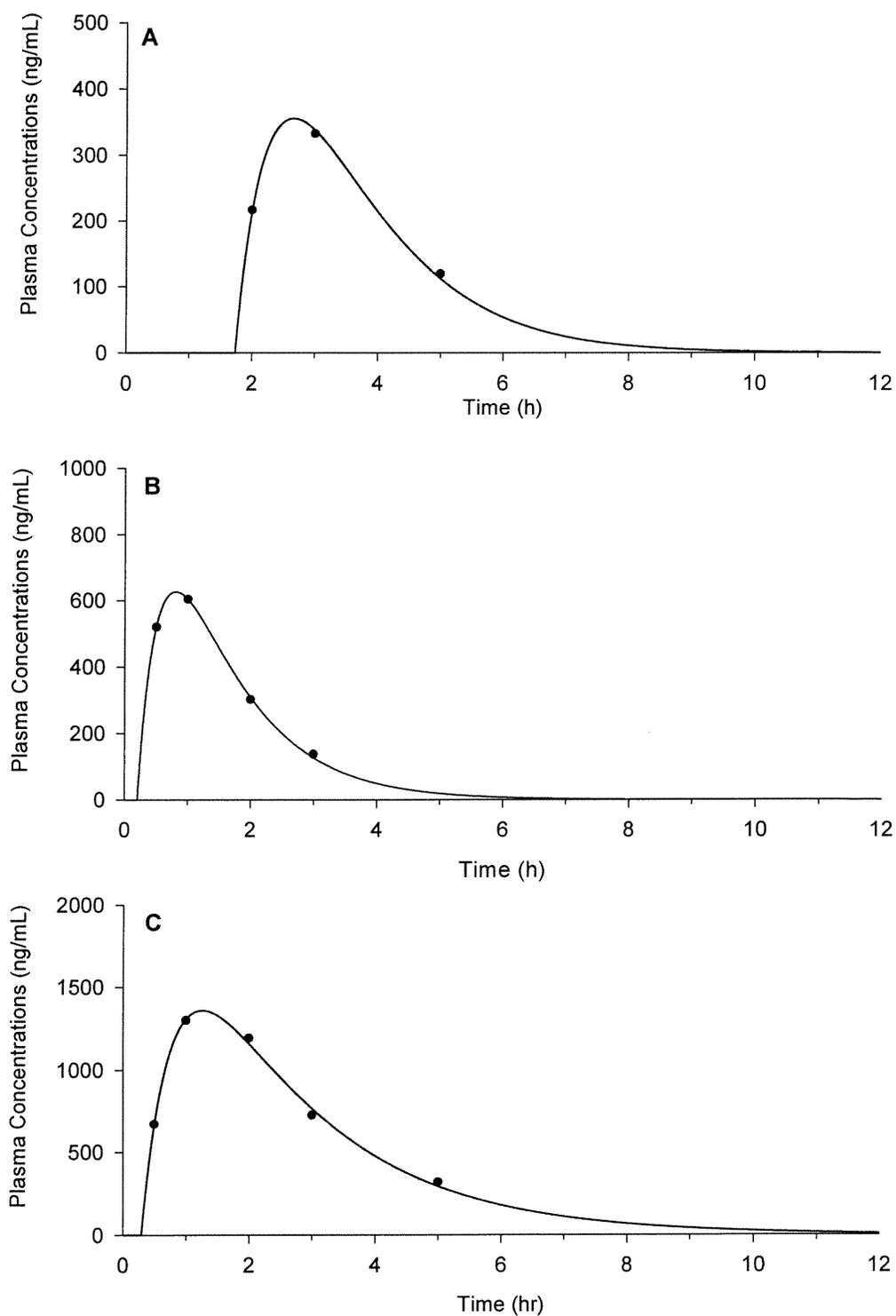


**Figure 1.** Individual profiles of plasma omeprazole on Day 27: **A:** linear scale, and **B:** log scale.



**Figure 2.** Weighted residuals versus observed plasma concentrations of omeprazole.

the rate constant of omeprazole absorption is very rapid, peaking to its maximum plasma concentrations within 30 minutes. Mean (CV%) population omeprazole rate constant of absorption was 2.8 (41.0%)  $\text{hr}^{-1}$ , meaning that approximately half the dose was absorbed in 15 minutes. Mean population volume of distribution ( $V_c/F$ ), total volume of distribution ( $V_{ss}/F$ ), distribution half-life ( $T_{1/2\alpha}$ ) and elimination half-life ( $t_{1/2\beta}$ ) were in the same range as those reported for the adult population (3, 13).



**Figure 3.** Graphical representation of observed (•) and fitted (—) plasma concentrations of omeprazole (ng/mL) on Day 27, where A, B and C represent quality of fit for 3 (ID#5), 4 (ID#31) and 5 (ID#12) measurable plasma concentrations, respectively.

Mean population clearance observed in the pediatric population was significantly higher than those reported for the adult population. A significant decreases in omeprazole clearance were reported following multiple administration in adults (3). All these observations are in sharp contrast with the results obtain in the pediatric population since omeprazole clearance after multiple administration was higher than those reported in the adult population after single or multiple-dose.

Since omeprazole is classified as an intermediate clearance drug, systemic clearance should be influenced primarily by the magnitude of its unbound intrinsic clearance. However, *in vitro* studies have shown that a higher P450 activity is unlikely to be responsible for the higher clearance observed in children (14). Other mechanism(s) must account for the higher clearance of omeprazole in the pediatric population. It was recently shown that liver volume normalised for body weight was greater in children than in adults (15). This could possibly explain the higher clearance observed in this study. It was suggested that transcellular uptake of oxygen, substrates or cofactors that facilitates phase I metabolism could be more efficient in pediatric liver(16). Also, factors that affect enzyme-substrate affinity or endoplasmic reticulum availability of either substrate or enzyme could vary as a consequence of age-related changes in the hepatocyte structure or enzyme conformation. This could be another mechanism explaining the present results.

In conclusion, this study supports the hypothesis that children have a higher systemic clearance of omeprazole than adults do. This was demonstrated using a robust population pharmacokinetic method. Whether the increase in clearance is due to the fact that liver volume normalized for body weight is greater in children or that phase I metabolism is more efficient in pediatric liver remains to be determined.

## 6.0 REFERENCES

1. Maton PN. Drug Therapy - Omeprazole. *N Eng J Med* 1991;324(14):965-75.
2. Lorentzon P, Bayati A, Lee H, Andersson K. Selective inhibition of the gastric H<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase by omeprazole and related compounds. *Ann N Y Acad Sci* 1997;834:592-9.
3. Andersson T, Andren K, Cederberg C, Lagerstrom P, Lundborg P, Skanberg I. Pharmacokinetics and bioavailability of omeprazole after single and repeated oral administration in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1990;29:557-63.
4. Andersson T, Cederberg C, Regardh C-G, Skanberg I. Pharmacokinetics of various single intravenous and oral doses of omeprazole. *Eur J Clin Pharmacol* 1990;39:195-7.
5. Cederberg C, Andersson T, Skanberg I. Omeprazole: Pharmacokinetics and metabolism in man. *Scand J Gastroenterol* 1989;24 (suppl 166):33-40.
6. Kato S, Shibuya H, Hayashi Y, Tseng S-W, Nakagawa H, Ohi R. Effectiveness and pharmacokinetics of omeprazole in children with refractory duodenal ulcer. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;15:184-8.
7. Jacqz-Aigrain E, Bellaich M, Faure C, Andre J, Rohlich P, Baudoin V, et al. Pharmacokinetics of intravenous omeprazole in children. *Eur J Clin Pharmacol* 1994;47:181-5.
8. Kato S, Ebina K, Fuji K, Chiba H, Nakagawa H. Effect of omeprazole in the treatment of refractory acid-related diseases in childhood: Endoscopic healing and twenty-four-hour intragastric acidity. *J Pediatr* 1996;128(3):415-21.
9. Lagerström P-O, Persson B-A. Determination of omeprazole and metabolites in plasma and urine by liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984;309:347-56.
10. Woolf EJ, Matuszewski BK. Simultaneous determination of omeprazole and 5-hydroxyomeprazole in human plasma by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1998;828:229-38.
11. D'Argenio D, Schumitzky A. *ADAPT-II User's Guide*. Los Angeles: Biomedical Simulations Resources, University of Southern California; 1992.
12. Collins D, Forest A. *IT2S User's Guide*. Buffalo, N.Y.: State University of New York at Buffalo; 1995.

13. Ching M, Mihaly G, Angus P, Morgan D, Devenish-Meares S, Yeomans N, et al. Oral bioavailability of omeprazole before and after chronic therapy in patients with duodenal ulcer. *Br J Clin Pharmacol* 1991;31(2):166-70.
14. Blanco JG, Harrison PL, Evans WE, Relling MV. Human Cytochrome P450 Maximal Activities in Pediatric versus Adult Liver. *Drug Metab Dispos* 2000;28(4):379-82.
15. Murry D, Crom W, Reddick W, Bhargava R, Evans W. Liver volume as a determinant of drug clearance in children and adolescents. *Drug Metab Dispos* 1995;23(10):1110-6.
16. Le Couteur D, McLean A. The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clin Pharmacokinet* 1998;34:359-73.

### CHAPITRE 3 : DISCUSSION - CONCLUSION

L'objectif principal de ce projet était de vérifier si l'oméprazole, administré à des enfants pour le traitement de reflux gastro-œsophagien (RGO), a un effet inducteur du CYP1A2 dans cette population.

Les objectifs secondaires étaient les suivants :

- Déterminer si l'induction des CYP1A2 par l'oméprazole varie en fonction de l'âge chez l'enfant.
- Déterminer le niveau d'induction des CYP1A2 pendant un traitement à l'oméprazole.
- Évaluer le temps de régression de l'induction après l'arrêt du traitement par l'oméprazole.
- Établir la pharmacocinétique de l'oméprazole en fonction de l'âge chez l'enfant.

La définition de ces objectifs était pertinente dans la mesure où un certain nombre d'études ont été conduites chez l'adulte pour déterminer si l'oméprazole est bien un inducteur des enzymes dépendant de la famille CYP1A et qu'une controverse règne encore au niveau des résultats de ces études. En effet, certains auteurs ont montré que l'oméprazole est capable d'induire les CYP1A et dans de nombreuses revues sur l'induction des enzymes de métabolisation des médicaments, cet inhibiteur de la pompe à protons apparaît dans la liste des inducteurs reconnus du CYP1A1 et du CYP1A2. Mais certains auteurs n'ont pas pu mettre en évidence de propriétés inductrices alors que d'autres auteurs ont même montré une certaine action inhibitrice. Cette disparité des résultats peut être due au fait que les protocoles étaient différents d'une étude à l'autre, que les doses administrées ainsi que les durées de traitement étaient hétérogènes, que les effectifs des sujets inclus dans les essais (sujets sains ou malades) étaient aussi différents d'une étude à l'autre. Globalement la plupart des études conduites chez l'adulte montrent que l'oméprazole est un inducteur faible des CYP1A.

Un autre argument justifiant nos objectifs réside dans le fait que les CYP1A, métabolisent les hydrocarbures polycycliques et sont aussi responsables de leur activation. Il y aurait ainsi activation de procarcinogènes en carcinogènes actifs. Bien qu'il n'ait pas été démontré de façon formelle que l'induction des CYP1A augmente le risque de cancer, il semblait intéressant de mettre en place une étude de l'induction des CYP1A chez l'enfant. En effet, de plus en plus d'enfants, même très jeunes, sont traités à l'aide d'oméprazole pour une pathologie de reflux gastro-œsophagien. Or on sait que la maturation du CYP1A2 se termine entre 3 et 6 mois après la naissance et il semble important de connaître le comportement de ce médicament vis à vis de cette enzyme durant cette période initiale de la vie. On sait, en outre, que l'activité du CYP1A2 est plus importante chez l'enfant que chez l'adulte ce qui ajoute un intérêt à ce type d'étude. Les questions que l'on est alors à même de se poser sont les suivantes. Est-ce qu'il y a induction ou non; si oui, cette induction est elle faible, modérée ou forte; est-ce que cette induction varie avec l'âge et combien de temps met-elle à régresser?

Répondre à ces questions permet d'atteindre l'objectif principal et les trois objectifs secondaires liés à l'induction du CYP1A2.

Sur le plan pharmacocinétique, très peu de travaux ont été conduits sur la pharmacocinétique de l'oméprazole dans la population pédiatrique. Il paraissait donc logique de profiter de l'étude métabolique pour conduire chez les enfants qui l'accepteraient (eux même ou leur représentant légal), une étude de pharmacocinétique qui permettrait de documenter cet aspect peu connu du devenir de cet inhibiteur de la pompe à protons dans cette population particulière.

La méthodologie à utiliser pour atteindre ces objectifs de recherche devait prendre en compte un certain nombre d'impératifs particuliers à la population étudiée. Les enfants recrutés devaient correspondre à des classes d'âge entre 3 mois et 17 ans. Et, le fait de recruter des petits enfants nécessitait d'utiliser des méthodes les moins invasives possibles tant pour l'étude de l'induction que pour l'étude de pharmacocinétique. C'est pourquoi le test respiratoire à la caféine marquée par l'isotope non radioactif ( $^{13}\text{C}$ ) du

carbone a été utilisé. En effet, il ne nécessite que des prélèvements de gaz expiré de façon normale.

Ce test doit normalement être conduit chez des sujets de préférence à jeun. Cette condition est difficile à respecter chez des enfants et surtout des petits enfants. La raison de cette mise à jeun est essentiellement due au fait que la digestion d'aliments conduit à la formation de CO<sub>2</sub> dont la richesse isotopique en <sup>13</sup>C peut varier dans le temps en fonction de la nature et de l'origine des aliments. On comprend aisément qu'une variation de l'enrichissement basal en <sup>13</sup>C du CO<sub>2</sub> expiré, pendant la durée du test, en fausse de façon irrémédiable les résultats. Il fallait donc mettre au point un petit déjeuner tel que la richesse isotopique de ces constituants ne modifie en rien la production basale de <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>.

Pour ce qui est de l'étude pharmacocinétique, la population étudiée imposait pour des raisons éthiques évidentes de travailler avec le moins possible de recueils sanguins dont le volume devait être le plus faible possible. Ces impératifs ont amené à mettre au point et à valider une méthode de dosage de l'oméprazole et de ses deux métabolites majeurs (hydroxyoméprazole et oméprazole-sulfone) permettant de travailler sur des petits échantillons. Dans ces conditions nous avons choisi un abord de pharmacocinétique de population pour traiter le problème de pharmacocinétique.

Les méthodologies choisies ont permis d'atteindre les objectifs fixés en début d'étude. Nous avons pu mettre au point un petit déjeuner standard ne modifiant par la richesse en <sup>13</sup>C du CO<sub>2</sub> expiré pendant le temps de l'épreuve de test respiratoire. Ce repas est essentiellement constitué de riz, de jus d'orange ainsi que de lait. Le riz et l'orange sont des végétaux en C<sub>3</sub> dont les sucres présentent, du fait des mécanismes photosynthétiques de leur biosynthèse, une richesse faible en <sup>13</sup>C, à l'encontre des sucres issus du maïs (plante C<sub>4</sub>) dont la richesse en <sup>13</sup>C est supérieure. Nous avons prouvé que ce déjeuner standardisé maintenait pratiquement constant le niveau du <sup>13</sup>C expiré sous forme de CO<sub>2</sub>.

Ensuite, le test respiratoire à la caféine  $^{13}\text{C}$  s'est montré tout à fait approprié à la population pédiatrique. Il a été bien supporté par tous les enfants quel que soit leur âge. La population étudiée était composée de 26 enfants traités avec l'oméprazole dans les conditions normales de traitement : 0.5 à 1.4 mg/kg/J pour une durée de 8 semaines. Les tests respiratoires ont été réalisés avant la mise sous traitement (valeur de base) puis aux semaines 2, 4, 8 et 12 du traitement. Les résultats des tests ont montré que l'activité CYP1A2 montrait un accroissement après 2, 4 et 8 semaines de traitement et revenait à la valeur basale à la semaine 12. L'accroissement d'activité bien que significative n'était pas très élevée, ce qui permet de conclure que l'oméprazole est un inducteur modéré de l'activité du CYP1A2 dans cette population. Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux des études conduites chez l'adulte pour lesquels des résultats positifs quant à l'induction étaient observés. Ces résultats positifs montraient eux aussi une induction modérée du CYP1A par l'oméprazole. Il est à noter que nous n'avons pas pu, compte tenu du protocole et de la population étudiée, rapprocher le niveau d'induction et l'activité CYP2C19 chez les enfants.

En ce qui concerne la mise au point et la validation du dosage de l'oméprazole et de ses deux principaux métabolites, la méthode mise au point avec extraction en phase solide de 500  $\mu\text{L}$  de plasma et l'analyse chromatographique par LC-DAD a permis d'effectuer des dosages précis, exacts et avec une limite de quantification satisfaisante pour mener à bien l'étude pharmacocinétique.

Les paramètres pharmacocinétiques de l'oméprazole ont pu être déterminés en utilisant une méthode compartimentale. Les paramètres, obtenus par une analyse de maximum de vraisemblance (Adapt-II), ont servi de paramètres initiaux pour l'analyse itérative à deux stades (IT2S). En effet, le modèle à deux compartiments, avec un temps de latence pour l'absorption s'avérait le modèle le plus adéquat pour décrire les observations obtenues chez 11 enfants. Le temps de latence pour l'absorption semble tout à fait logique vu la formulation de l'oméprazole. L'oméprazole étant administré sous forme de capsules ou de comprimés composés de granules enrobés qui se solubilisent à pH 6 (duodénum), le temps de latence observé reflète bien le temps de transit du médicament avant de se rendre au duodénum.

Cependant, une fois le comprimé dissout, l'absorption se fait plutôt rapidement. La vitesse d'absorption moyenne ( $CV\%$ ) était de 2.8 (41.0%)  $hr^{-1}$ , ce qui signifie que près de la moitié de la dose est absorbée après 15 minutes. Les paramètres de population moyen pour le volume de distribution ( $V_c/F$ ), le volume de distribution total ( $V_{ss}/F$ ), la demi-vie de distribution ( $T_{1/2\alpha}$ ) et la demi-vie d'élimination ( $t_{1/2\beta}$ ) était du même ordre de grandeur que ceux rapportés dans des études effectuées dans des populations adultes.

Nous avons pu observer une clairance moyenne supérieure à celle préalablement mesurée dans la population adulte. Il a été montré que la clairance diminuait de façon significative après des doses multiples chez les adultes. Ces observations sont en désaccord avec les résultats obtenus dans notre population pédiatrique. En effet, la clairance mesurée suite à des administrations multiples chez les enfants sont nettement supérieures à celles pour des doses simples ou multiples chez les adultes.

L'étude pharmacocinétique que nous avons conduite nous permet de conclure que les enfants ont une clairance systémique de l'oméprazole supérieure à celle trouvée chez les adultes. Ceci a été démontré à l'aide d'une méthode de pharmacocinétique de population robuste. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. Il reste à déterminer si cette clairance élevée peut s'expliquer par le fait que le volume du foie normalisé par le poids corporel est supérieur chez les enfants ou par le fait que le métabolisme de phase I est plus efficace dans la population pédiatrique.

## REFERENCES

1. Rost KL, Brösicke H, Brockmöller J, Scheffler M, Helge H, Roots I. Increase of cytochrome P4501A2 activity by omeprazole : Evidence by the <sup>13</sup>C-(N-3-methyl)-caffeine breath test in poor and extensive metabolisers of S-mephenytoin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1992;52(2):170-80.
2. Oesterheld JR. A Review of Developmental Aspects of Cytochrome P450. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 1998;8(3):161-74.
3. Ioannides C, Parke DV. Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews* 1993;25(5):458-501.
4. Kato S, Shibuya H, Hayashi Y, Tseng S-W, Nakagawa H, Ohi R. Effectiveness and pharmacokinetics of omeprazole in children with refractory duodenal ulcer. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1992;15:184-8.
5. Jacqz-Aigrain E, Bellaich M, Faure C, Andre J, Rohlich P, Baudoin V, et al. Pharmacokinetics of intravenous omeprazole in children. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1994;47:181-5.
6. Kato S, Ebina K, Fuji K, Chiba H, Nakagawa H. Effect of omeprazole in the treatment of refractory acid-related diseases in childhood: Endoscopic healing and twenty-four-hour intragastric acidity. *The Journal of Pediatrics* 1996;128(3):415-21.
7. Tanaka E, Breimer DD. In vivo function tests of hepatic drug-oxidizing capacity in patients with liver disease. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 1997;22:237-49.
8. Vandenplas Y, Belli D, Benhamou P, Cadranet S, Cezard J, Cucciara S, et al. A critical appraisal of current management practices for infant regurgitation - recommendations of a working party. *European Journal of Pediatrics* 1997;156:343-57.
9. Faure C, Pelatan C, Languépin L. Inhibiteurs de la pompe à protons en pédiatrie. *Archives de Pédiatrie* 1999;6:650-6.
10. Lorentzon P, Bayati A, Lee H, Andersson K. Selective inhibition of the gastric H<sup>+</sup>,K(+) -ATPase by omeprazole and related compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1997;834:592-9.
11. Andersson T. Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors. Focus on Omeprazole, Lansoprazole and Pantoprazole. *Clinical Pharmacokinetics* 1996;31(1):9-28.

12. Katsuki H, Nakamura C, Arimori K, Fujiyama S, Nakano M. Genetic polymorphism of CYP2C19 and lansoprazole pharmacokinetics in Japanese subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1997;52:391-6.
13. Roh H-K, Dahl M-L, Tybring G, Yamada H, Cha Y-N, Bertilsson L. CYP2C19 genotype and phenotype determined by omeprazole in a Korean population. *Pharmacogenetics* 1996;6:547-51.
14. Kovacs P, Edwards DJ, Lalka D, Scheiwe WM, Stoekel K. High-dose omeprazole: Use of a multiple-dose study design to assess bioequivalence and accuracy of CYP2C19 phenotyping. *Therapeutic Drug Monitoring* 1999;21:526-31.
15. Lewis DFV, Lake BG. Molecular modelling and quantitative structure activity relationship studies on the interaction of omeprazole with cytochrome P450 isozymes. *Toxicology* 1998;125:31-44.
16. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics* 1998;35(5):361-90.
17. Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint-Aubert B, Bories P, Michel H, et al. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 1990;99:737-47.
18. Farrell GC, Murray M. Human Cytochrome P450 Isoforms: Their Genetic Heterogeneity and Induction by Omeprazole (editorial). *Gastroenterology* 1990;99:885-9.
19. Parkinson A, Hurwitz A. Omeprazole and the Induction of Human Cytochrome P-450: A Response to Concerns About Potential Adverse Effects. *Gastroenterology* 1991;100(4):1157-64.
20. Wrighton SA, Watkins P. Nonuniform Distribution of Cytochrome P450IA2 in Liver. *Gastroenterology* 1991;100(5):1487-8.
21. Moldeus P, Berlin RG, Lu A, Castagnoli N, Carlsson E, Andersson T. P450/Losec. *Gastroenterology* 1991;100(5):1488-9.
22. Andersson T, Bergstrand R, Cederberg C, Eriksson S, Lagerstrom P-O, Skanberg I. Omeprazole treatment does not affect the metabolism of caffeine. *Gastroenterology* 1991;101:943-7.
23. McDonnell WM, Scheiman JM, Traber PG. Induction of Cytochrome P450IA Genes (CYP1A) by Omeprazole in the Human Alimentary Tract. *Gastroenterology* 1992;103:1509-16.

24. Daujat M, Peryt B, Lesca P, Fourtanier G, Domergue J, Maurel P. Omeprazole, an inducer of human CYP1A1 and 1A2, is not a ligand for the Ah receptor. *Biomedical and Biophysical Research Communications* 1992;188(2):820-5.
25. Quattrochi L, Turkey R. Nuclear uptake of the Ah (dioxin) receptor in response to omeprazole: Transcriptional activation of the human CYP1A1 gene. *Molecular Pharmacology* 1993;43:504-8.
26. Rost KL, Roots I. Accelerated caffeine metabolism after omeprazole treatment is indicated by urinary metabolite ratios: Coincidence with plasma clearance and breath test. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1994;55:402-11.
27. Nousbaum JB, Berthou F, Carlhant D, Riche C, Robaszkiewicz M, Gouerou H. Four-week treatment with omeprazole increases the metabolism of caffeine. *The American Journal of Gastroenterology* 1994;89(3):371-175.
28. Xiaodong S, Gatti G, Bartoli A, Cipolla G, Crema F, Perucca E. Omeprazole does not enhance the metabolism of phenacetin, a marker of CYP1A2 activity, in healthy volunteers. *Therapeutic Drug Monitoring* 1994;16:248-50.
29. Rizzo N, Padoin C, Palombo S, Scherrmann J-M, Girre S. Omeprazole and lansoprazole are not inducers of cytochrome P4501A2 under conventional therapeutic conditions. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1996;49:491-5.
30. Andersson T, Holmberg J, Rohss K, Walan A. Pharmacokinetics and effect on caffeine metabolism of the proton pump inhibitors, omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1998;45:369-75.
31. Dilger K, Zheng Z, Klotz U. Lack of interaction between omeprazole, lansoprazole, pantoprazole and theophylline. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1999;48:438-44.
32. Rost KL, Fuhr U, Thomsen T, Zaigler M, Brockmüller J, Bohnemeier H, et al. Omeprazole weakly inhibits CYP1A2 activity in man. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1999;37(11):567-74.
33. Lambert GH, Kotake AN, Schoeller D. The CO<sub>2</sub> breath test as monitors of the cytochrome P450 dependant mixed function monooxygenase system. (review). *Progress in Clinical & Biological Research* 1983;135:119-45.
34. Lambert GH, Schoeller DA, Kotake AN, Flores C, Hay D. The effect of age, gender, and sexual maturation on the caffeine breath test. *Developmental Pharmacology and Therapeutics* 1986;9:375-88.
35. Schoeller D, Klein P, Watkins J, Heim T, Jr WM. <sup>13</sup>C abundances of nutrients and effect of variations in <sup>13</sup>C isotopic abundances of test meals formulated for

$^{13}\text{CO}_2$  breath tests. The American Journal of Clinical Nutrition 1980;33:2375-85.

36. Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH. Geometric method for measuring body surface area: A height-weight formula validated in infants, children and adults. The Journal of Pediatrics 1978;93(1):62-6.