

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté de pharmacie
Université de Montréal
Grade octroyé le:

5-02-09

Études *in vitro* et *in vivo* évaluant le rôle du métabolisme des médicaments par les CYP450s comme facteurs de variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments

Véronique Michaud

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
doctorat en Sciences Pharmaceutiques
Option pharmacologie
29 Août, 2008

Tous droits réservés, VÉRONIQUE MICHAUD, 2008©

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
**Études *in vitro* et *in vivo* évaluant le rôle du métabolisme des médicaments
par les CYP450s comme facteurs de variabilité interindividuelle dans la
réponse aux médicaments**

présentée par :
Véronique Michaud

sous la direction de :
Dr Jacques Turgeon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Julie Ducharme
président-rapporteur

Dr Daniel Lamontagne
Codirecteur (représentant du directeur de recherche)

Dr Patrick Du Souich
membre du jury

Dr David Flockhart
examineur externe

Dre Louise Béliveau
doyenne de la FES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

À une même dose, certains patients présentent une réponse favorable, d'autres une efficacité moindre voire même une inefficacité et d'autres encore, une toxicité. Des variations dans le métabolisme des médicaments, dont celui dépendant des cytochromes P450 (CYP450), expliquent une large part de variations observées entre les patients dans leur réponse aux médicaments. En effet, les CYP450s sont largement impliqués dans la biotransformation des médicaments et une attention particulière doit être portée aux facteurs modulant l'activité de ces derniers.

Mon projet de doctorat s'inscrit dans une visée à la fois fondamentale et clinique. Un premier volet présente des travaux de recherche visant à caractériser le métabolisme *in vitro* par les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 et mesurer l'influence du cytochrome b5 sur leur activité catalytique. Cette étude fut réalisée à l'aide de deux substrats marqueurs connus des CYP3As, la dompéridone et le midazolam. Un second volet porte sur la caractérisation du mécanisme d'inhibition des CYP3As par la clarithromycine, un antibiotique macrolide responsable d'un nombre important d'interactions médicamenteuses. Nos résultats montrent que l'inhibition des CYP3As par la clarithromycine possède des composantes d'inhibition compétitive et non-compétitive (formation de complexes métaboliques). Les modèles *in vitro* actuel d'inhibition par complexe métabolique ne permettent pas une extrapolation précise à la situation *in vivo* et utilisent des techniques difficilement reproductibles. Un modèle d'inhibition *in vitro* a été élaboré pour des inhibiteurs formant des complexes métaboliques intermédiaires.

Le troisième projet de recherche s'intéresse à l'expression et l'activité des CYP450s cardiaques et leur impact sur les concentrations intracellulaires des médicaments. De fait, la présence de CYP450s exprimés au niveau cardiaque pourrait contribuer au métabolisme intra-tissulaire et expliquer en partie la variabilité interindividuelle observée dans les effets cardiaques de certains médicaments. Dans un premier temps, les niveaux d'expression d'ARNm de CYP450s ont été déterminés à partir de cœurs de sujets sains ou insuffisants cardiaques. En second lieu, l'activité de ces enzymes a été évaluée suite au développement d'un protocole d'ultracentrifugation permettant de préparer des microsomes possédant une activité

catalytique. Nous avons ainsi caractérisé le métabolisme de la dompéridone et du vérapamil par les isoenzymes des CYP450s cardiaques (dont le CYP2J2).

La présence de polymorphismes génétiques dans les gènes des CYP450s peut entraîner des modifications significatives dans le métabolisme des médicaments. Nous avons réalisé une étude évaluant la contribution de facteurs pharmacogénétiques dans la réponse à la warfarine, l'anticoagulant oral le plus prescrit. Nos résultats fournissent différents modèles de régression afin de décrire la variabilité dans la réponse à la warfarine (principalement à l'aide de génotypes : CYP2C9 et VKOR et de phénotypes : ratio urinaire de losartan, ratio plasmatique de S-/R-warfarine et d'un INR au jour 4) et d'établir un nomogramme de traitement.

L'axe central de cette thèse repose sur le métabolisme des médicaments via les CYP450s comme facteur de variabilité interindividuelle dans les effets pharmacologiques des médicaments. Des études *in vitro* avec des isoenzymes des CYP450s et *in vivo* chez l'humain ont été réalisées dans le but d'améliorer les modèles *in vitro* permettant de prédire le potentiel d'interactions médicamenteuses chez l'humain.

Mots clés : Cytochromes P450, cytochrome b5, complexe métabolique intermédiaire, pharmacogénétique, pharmacocinétique, variabilité interindividuelle, clarithromycine, dompéridone, vérapamil, warfarine.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

When the same dose of a drug is given to patients, some show efficacy, others a lack of response while others show toxicity. Drug biotransformation by the cytochrome P450 (CYP450) enzymatic system is a major determinant of inter-subject variability in drug response. Several isozymes are comprised in this superfamily of enzymes and a number demonstrate genetic polymorphisms that influence their activity.

My Ph.D. project had both basic and clinical research aspects. Our first theme of research aimed at a better characterization of the respective role of CYP3A4 and CYP3A5 in drug metabolism. We also studied the modulatory role of cytochrome b5 on their activity. Studies were conducted with two CYP3A probe drugs namely, domperidone and midazolam, to dissect the respective contribution of CYP3A4 and CYP3A5. A second theme of our studies was the characterization of CYP3A inhibition by clarithromycin, a macrolide antibiotic involved in clinically-relevant drug-drug interactions. Our results demonstrate that inhibition of CYP3As by clarithromycin has a weak competitive inhibition component but a rather major non-competitive component (formation of intermediate metabolic complexes). Currently used *in vitro* models for the assessment of the formation of intermediate metabolic complexes do not allow for quantitative extrapolation to *in vivo* conditions. A new *in vitro* model was developed for the measurement of CYP450 inhibition secondary to the formation of intermediate metabolic complexes.

Our third project aimed at the study of cardiac CYP450s and their role in the control of intra-cardiac drug concentrations. We hypothesized that CYP450s levels in cardiac tissue may largely contribute to the control of intracellular drug concentrations. Hence, variability in the activity of cardiac CYP450s could explain some of the intersubject variability in drug action. In a first series of studies, the presence of CYP450 mRNAs was compared in samples obtained from hearts explanted from patients with end-stage heart failure and from hearts of healthy donors. Our results showed that mRNA of certain CYP450s can be modulated by heart failure. In the second part of these studies, an ultracentrifugation protocol was developed for the preparation of microsomes that could retain metabolic activity.

The metabolism of the probe drugs domperidone and verapamil by cardiac CYP450s, including CYP2J2, was characterized.

Finally, a clinical study was conducted with the most prescribed anticoagulant agent warfarin. Warfarin has a narrow therapeutic index which commands a close follow-up for dose adjustment. Our study examined the contribution of various non-genetic and genetic factors in the response to warfarin. Our multiple regression models established the role of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms as well as the importance of phenotypic measures – urinary metabolic ratio of losartan, the S/R plasma warfarin ratio and INR on day 4 – to construct a dose nomogram for warfarin.

The main stream of researches conducted in my thesis was the study of the CYP450s using various probe drugs to improve our understanding of intersubject variability in drug action. *In vitro* studies were conducted with various CYP450 isozymes and a pharmacogenetic study conducted in humans to improve the predictive value of *in vitro* models to drug disposition.

Key words : Cytochromes P450, cytochrome b5, metabolic intermediate complex, pharmacogenetic, pharmacokinetic, intersubject variability, clarithromycin, domperidone, verapamil, warfarin.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	iii
RÉSUMÉ EN ANGLAIS	v
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xiii
MES REMERCIEMENTS	xv
ORIENTATION GÉNÉRALE DE MES TRAVAUX DE RECHERCHE	xvii

SECTION 1; INTRODUCTION	1
1. INTRODUCTION	2
1.1. PHARMACOLOGIQUE CLINIQUE	2
1.1.1.PHARMACOCINÉTIQUE	5
1.1.2.PHARMACODYNAMIE	8
1.2. CYTOCHROMES P450	9
1.2.1.GÉNÉRALITÉS.....	9
1.2.2.PROPRIÉTÉS.....	15
1.2.3.MÉCANISMES.....	18
1.2.4.ISOENZYMES.....	22
1.3. PHAMACOGÉNÉTIQUE	37
1.3.1.HISTORIQUE & DÉFINITION	37
1.3.2.PHARMACOGÉNÉTIQUE & ISOENZYMES DES CYP450s	42

SECTION 2; TRAVAUX DE RECHERCHE	54
SECTION 2.1	55
CARACTÉRISATION DU MÉTABOLISME DE SUBSTRATS MARQUEURS DES CYP450s AU NIVEAU HÉPATIQUE ET CARDIAQUE.	55

Section 2.1.1	56
CARACTÉRISATION DU MÉTABOLISME DE LA DOMPÉRIDONE PAR LES CYP3As : RÔLE DES ISOENZYMES CYP3A4 ET CYP3A5, RÔLE DU CYTOCHROME B5 ET DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES D'INHIBITION PAR LA CLARITHROMYCINE	56
<u>MANUSCRIT 1:</u> An Improved HPLC Assay With Fluorescence Detection For The Determination Of Domperidone And Three Major Metabolites For Application To In Vitro Drug Metabolism Studies.....	57
i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	58
ii) INTRODUCTION.....	58
iii) ARTICLE.....	59
iv) DISCUSSION.....	82
<u>MANUSCRIT 2:</u> Comprehensive Characterization of CYP3A Isozymes Involved in the Metabolism of Domperidone : Comparison with the Probe Drug Substrate Midazolam, role of Cytochrome b ₅ and inhibition by Ketoconazole.....	83
i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	84
ii) INTRODUCTION.....	85
iii) CINÉTIQUE ATYPIQUE.....	86
iv) CYTOCHROME b ₅	89
v) ARTICLE.....	91
vi) DISCUSSION.....	121
<u>MANUSCRIT 3:</u> Competitive and mechanism-based inhibition of CYP3As by clarithromycin: comparison between various enzymatic sources including a new-cell based assay using freshly isolated human hepatocytes.....	125
i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	126
ii) INTRODUCTION.....	126
iii) COMPLEXE MÉTABOLIQUE INTERMÉDIAIRE ET CYP3A4.....	130
iv)ARTICLE.....	134
v) DISCUSSION.....	165

Section 2.1.2.....	170
DÉTERMINATION DES NIVEAUX ET DE L'ACTIVITÉ DE DIFFÉRENTS CYP450s AU NIVEAU DU CŒUR HUMAIN.	170

<u>MANUSCRIT 4</u> : Determination of cardiac mRNA levels of CYP450s involved in the metabolism of drugs from a large cohort of patients with end-stage heart failure and healthy subjects.	171
---	-----

<u>MANUSCRIT 5</u> : Metabolism of domperidone and verapamil by human heart microsomal fractions.	171
---	-----

i) OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	172
ii) INTRODUCTION.....	173
iii) LES CYP450s CARDIOVASCULAIRES.....	173
iv) CYP450 DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	178
v) ARTICLE 4.....	189
vi) ARTICLE 5	207
vii) DISCUSSION	246

SECTION 2.2.....	252
VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE DANS LA RÉPONSE À LA WARFARINE.	252

<u>MANUSCRIT 6</u> : Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients.....	252
--	-----

i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	253
ii) INTRODUCTION.....	254
iii) PHARMACOCINÉTIQUE.....	256
iv) PHARMACODYNAMIE.....	259
v) ARTICLE.....	263
vi) DISCUSSION	300

SECTION 3; CONCLUSION.....	307
3. CONCLUSION GÉNÉRALE	308

RÉFÉRENCES	314
-------------------------	------------

APPENDICES	xix
-------------------------	------------

APPENDICE I	xx
--------------------------	-----------

LISTE DES PROTOCOLES	xx
-----------------------------------	-----------

APPENDICE II	xxii
---------------------------	-------------

LISTE DES PUBLICATIONS & ABSTRACTS.....	xxii
--	-------------

<i>Publications</i>	xxiii
---------------------------	--------------

<i>Asbtracts.....</i>	xxv
-----------------------	------------

<i>Professional manuscripts.....</i>	xxix
--------------------------------------	-------------

APPENDICE III.....	xxx
---------------------------	------------

DÉCLARATION DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR	xxx
---	------------

Accord des coauteurs

<i>Article 1.....</i>	xxxix
-----------------------	--------------

<i>Article 2.....</i>	xxxix
-----------------------	--------------

<i>Article 3.....</i>	xxxix
-----------------------	--------------

<i>Article 4.....</i>	xxxix
-----------------------	--------------

<i>Article 5.....</i>	xxxix
-----------------------	--------------

<i>Article 6.....</i>	xxxix
-----------------------	--------------

Permission de l'éditeur

<i>Article 1.....</i>	xxxvii
-----------------------	---------------

<i>Article 6.....</i>	xxxviii
-----------------------	----------------

LISTE DES FIGURES *

FIGURE 1 : Arbre phylogénétique des 57 gènes des CYP450s identifiés chez l'humain.....	15
FIGURE 2 : Localisation du CYP450 microsomale et du système NADPH-CYP450 réductase dans la membrane du réticulum endoplasmique.....	16
FIGURE 3 : Figure illustrant la portion porphyrique, groupement prosthétique hème, du CYP450.....	18
FIGURE 4 : La biotransformation d'un composé par les CYP450s microsomales s'effectue sur la face externe du réticulum endoplasmique.....	19
FIGURE 5 : Cycle catalytique des CYP450s.....	21
FIGURE 6 : Schématisation des différences pharmacocinétiques selon les génotypes et l'ajustement théorique des doses afin d'obtenir des concentrations plasmatiques égales entre les génotypes lent, intermédiaire, normal et ultra-rapide.....	40
FIGURE 7 : Courbes de vitesse de formation métabolique et leur transformation selon Eadie-Hofstee.....	88
FIGURE 8 : Variabilité interindividuelle dans la dose de warfarine. Dose de maintien de 185 patients (de descendance européenne) de la clinique d'anticoagulothérapie de Seattle.....	255
FIGURE 9 : Mécanisme d'action de la warfarine et cycle de la vitamine K.....	260
FIGURE 10 : Contribution des facteurs génétiques et non-génétiques dans la variance des doses de maintien de la warfarine.....	300
FIGURE 11 : Données du modèle de Herman et al. appliqué à notre étude.....	304

* Les figures présentées dans les différents articles ne sont pas présentées dans cette liste. Seules les figures retrouvées dans les diverses introductions de la thèse sont énumérées.

LISTE DES TABLEAUX *

TABLEAU I : Résumé de diverses études et de leur algorithme pharmacogénétique pour estimer la dose de warfarine.....**303**

3

* Les tableaux présentés dans les différents articles ne sont pas présentés dans cette liste. Seuls les tableaux retrouvés dans les diverses introductions de la thèse sont énumérés.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
AUC : aire sous la courbe
CL : clairance
CLint : clairance intrinsèque
CO : monoxyde de carbone
CYP : cytochrome
CYP450 : cytochromes P450
DTT : dithiothéritol
EET : acide epoxyeicosatrienoïque acide
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
FAD : flavine adénine dinucléotide
FL : fluorescence
FMN : riboflavine 5'phosphate
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GGCX : γ -carboxylase vitamine K-dépendante
HETE : hydroxyeicosatrienoïque
HPLC : chromatographie liquide à haute performance/pression
IC₅₀ : concentration pour obtenir 50% d'inhibition
INR : ratio normalisé international
K_i : constante d'inhibition
K_m : constante d'affinité de Michaelis-Menten
LC : chromatographie liquide
LDL : lipoprotéine de faible densité
MIC : complexe métabolique intermédiaire
MDZ : midazolam
MS : spectrométrie de masse
n : coefficient de Hill
NADPH : β -nicotinamide adénine dinucléotide diphosphate
NF-1 : facteur nucléaire 1
NO : oxyde nitrique
1OH-MDZ : 1-hydroxymidazolam

4OH-MDZ : 4-hydroxymidazolam

ox :oxydé

PCR : réaction de polymérase en chaîne

PMSF : fluorure de phénylméthylsulphonyle

red : réduit

RH : substrat/médicament

ROH : substrat hydroxylé

RPM : révolution par minute

RT-PCR : PCR en temps réel

S_{50} : constante d'affinité d'Eadie Hofstee

SNP : polymorphisme d'un seul nucléotide (*single nucleotide polymorphism*)

$t_{1/2}$: demi-vie d'élimination apparente

TOF : *time of flight*

Vd : volume de distribution

VKOR : vitamine K époxyde réductase

Vmax : vitesse de formation maximale

UV : ultraviolet

VIH : virus d'immunodéficence humaine

MES REMERCIEMENTS

À mon directeur de recherche,

Mes premiers remerciements, je les adresse à mon directeur de recherche, le Dr Jacques Turgeon. Tout d'abord, merci d'avoir dérogé à tes propres règles et de m'avoir ainsi accepté sous ta supervision alors que j'en étais à ma première expérience en laboratoire. Merci de m'avoir donné ma chance. Je te remercie d'avoir cru en moi, de la confiance que tu as eu à mon égard durant toutes mes études. Bien que ton temps soit rare et précieux, merci pour ta générosité et du temps passé à expliquer et réexpliquer. De fait, merci pour ta patience. Également, ce fut un réel plaisir tant scientifique que culturel de voyager à tes côtés lors des différents congrès. Merci pour tes conseils, pour ton écoute, pour ton aide et ton soutien moral. Tu as contribué à mon évolution et à mon épanouissement tant au niveau scientifique, professionnel que personnel et je t'en suis gré. Merci de m'avoir encouragé et guidé dans mon choix de carrière. Merci de croire en mes ambitions et de m'aider à y arriver. Ces remerciements sont bien peu pour exprimer toute la reconnaissance que j'ai pour toi. Merci Jacques.

Aux gens du laboratoire,

Je désire également remercier les gens avec qui j'ai eu énormément de plaisir à travailler. Merci à Pierre Morissette, Raymond Hreiche, Marcin Z. et Andréa Sirhandaneau pour les nombreuses discussions (de toutes natures qu'elles aient été), pour vos opinions et conseils. Merci à vous pour votre écoute, les rires partagés en votre présence et les moments agréables passés en votre compagnie. Merci à Lucie Couture, ma collègue de chambre lors des congrès que j'ai eu plaisir à côtoyer. Merci aux stagiaires avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler ; Marie-Christine Dumas, Maude St-Onge, Benoît Pronovost, Martin Frappier et Sophie Zezmi. Merci aux assistants de laboratoire pour votre aide ; Nathalie Morin, François Bélanger et Sylvie Poirier-Larabie.

Au organisme subventionnaire,

Je tiens à remercier les Instituts en Santé du Canada pour leur support financier durant les 4 années de mon doctorat (de mars 2004-2008). Je suis reconnaissante

qu'ils aient cru en mes capacités et en mon projet de recherche. C'est avec beaucoup de fierté et de gratitude que je vous exprime mes remerciements car en plus de la reconnaissance prestigieuse qu'elle procure, cette bourse m'a permise de me concentrer davantage sur mes études doctorales et d'avoir pu en profiter pleinement. Merci à monsieur Robert Massé et à MDS qui furent les premiers à m'offrir une bourse qui m'a ouvert la porte à ma carrière.

À l'Université de Montréal,

Merci à la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal de m'avoir offert les espaces et équipements nécessaires à mes travaux tout en m'offrant un milieu stimulant de développement de carrière.

À ma famille,

Je veux remercier mes parents pour leur support inconditionnelle et de toujours croire que leur petite fille est la meilleure. Un grand merci à toute ma famille pour votre présence lorsque les moments ont été plus difficiles, merci d'accepter mon choix de carrière. Merci d'être toujours à mes cotés.

Aux membres du jury,

Je tiens à vous remercier pour le temps que vous consacrez à la lecture de ma rédaction de thèse. En espérant que ce présent manuscrit sera le reflet fidèle de l'intérêt et le plaisir que j'ai eu durant ces dernières années.

ORIENTATION GÉNÉRALE DE MES TRAVAUX DE RECHERCHE

Un grand nombre de patients présentent malheureusement des effets indésirables aux médicaments. Une attention particulière mérite d'être portée vis-à-vis ces effets secondaires puisqu'ils sont responsables de nombreuses hospitalisations. Ainsi, en plus de l'âge, du sexe et des facteurs environnementaux, nous savons à présent que les interactions médicamenteuses ou encore la présence de polymorphismes génétiques jouent un rôle important dans la variabilité interindividuelle et intra-individuelle dans la réponse aux médicaments. Ainsi, l'utilisation conventionnelle d'un médicament pour un patient peut se traduire par une inefficacité clinique alors que pour un autre, cette même utilisation pourra se traduire par une toxicité. Mes travaux de recherche s'intéressent à cette problématique et portent donc sur les facteurs pharmacocinétiques et pharmacodynamiques impliqués dans la variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments. Un des facteurs majeurs pouvant expliquer cette variabilité est le métabolisme des médicaments. Plusieurs études ont démontré que les cytochromes P450 (CYP450s) constituent le système enzymatique d'importance impliqué dans le métabolisme des médicaments. Une attention particulière lors de mes études fut donc portée aux interactions médicamenteuses et aux facteurs de prédisposition génétique dans le métabolisme des médicaments.

Ma thèse se subdivise en trois parties comprenant dans un premier temps une introduction qui est suivi d'une deuxième section décrivant mes travaux de recherche et finalement, une conclusion générale. Brièvement, l'introduction est composée d'une revue de notions relatives à la pharmacologie clinique incluant un rappel des concepts de pharmacocinétique-pharmacodynamie décrivant spécifiquement le métabolisme des médicaments. Plus précisément, les facteurs responsables de la variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments relatifs aux CYP450s comprenant entre autres la pharmacogénétique sont élaborés.

La seconde section représente le corps de ma thèse constitué de mes travaux de recherche lesquels comprennent 6 articles. Cette section est également subdivisée en deux grandes parties dont l'une porte sur la caractérisation du métabolisme de substrats marqueurs des CYP450s au niveau hépatique et cardiaque et l'autre traite

de la variabilité dans la réponse à la warfarine. Mes travaux de recherche sont présentés à l'aide d'articles scientifiques et chacune des sous-sections est organisée de la façon suivante; tout d'abord, les objectifs de l'étude sont décrits suivi d'une brève introduction de notions théoriques en lien avec l'article, ensuite l'article est présenté et finalement, une discussion générale relative à chacun des articles est exposée.

La première partie de mes travaux de recherche traite en premier lieu du métabolisme de substrats marqueurs des CYP450s au niveau hépatique soit, sur la caractérisation du métabolisme de la dompéridone par les CYP3As, le rôle des isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5, du rôle du cytochrome b5 et de la détermination des caractéristiques d'inhibition par la clarithromycine. Les articles qui y sont intégrés comprennent; #1) *An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to in vitro drug metabolism studies*, #2) *Comprehensive Characterization of CYP3A Isozymes Involved in the Metabolism of Domperidone : Comparison with the Probe Drug Substrate Midazolam, role of Cytochrome b₅ and inhibition by ketoconazole*, et #3) *Competitive and Mechanism-based Inhibition of CYP3As by Clarithromycin: Comparison between Various Enzymatic Sources Including a New Cell-based Assay Using Freshly Isolated Human Hepatocytes*. La deuxième portion de cette partie porte sur le métabolisme au niveau cardiaque, soit sur la détermination des niveaux et de l'activité de différents CYP450s au niveau du cœur humain. Deux articles sont présentés dont l'un rapportant la présence de CYP450s dans le tissu cardiaque humain (#4 : *Determination of Cardiac mRNA Levels of CYP450s Involved in the Metabolism of Drugs from a Large Cohort of Patients with End-stage Heart Failure and Healthy Subjects*) et le second décrit la présence d'activité catalytique relative aux CYP450s cardiaques (#5 : *Metabolism of domperidone and verapamil by human heart microsomal fractions*).

Alors que la première partie de mes travaux de recherche est constituée d'études *in vitro*, la deuxième section porte principalement sur des aspects d'application clinique. Tel que mentionné précédemment, celle-ci décrit la variabilité dans la réponse à la warfarine et elle est formée d'un article : #6) *Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients*.

Enfin, ma thèse se termine par une conclusion globale faisant un rappel général sur les principaux concepts et soulève les points majeurs démarquant de mes travaux de doctorat.

SECTION 1; INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. PHARMACOLOGIQUE CLINIQUE

«Tous les médicaments sont des poisons, ce n'est qu'une question de dose»
Paracelsus, il y a plus de 500 ans...

L'étude des médicaments chez l'humain caractérise la pharmacologie clinique. En fait, elle décrit la relation entre la dose du médicament administré et l'effet biologique observé (désirable ou non). La pharmacologie clinique ne constitue pas une discipline scientifique circonscrite puisqu'elle représente une discipline générale faisant le pont entre la pharmacologie dite classique (le profil mécanistique) et la médecine clinique (le profil clinique). La pharmacologie clinique a pour objectif d'optimiser l'utilisation des médicaments déjà disponibles et d'évaluer leur profil d'efficacité et de sécurité. Et ceci, tant pour les médicaments sur le marché que pour ceux en développement, en réalisant des études scientifiques chez l'humain tant avec des volontaires sains que des patients. La pharmacologie clinique est subdivisée en deux sous-disciplines scientifiques ; la pharmacocinétique et la pharmacodynamie.

Dans les années trente, Paul Martini, considéré comme un des premiers pharmacologues cliniques, a introduit le terme de pharmacologie clinique.¹ Martini a décrit entre autres l'utilisation du placebo mais il a surtout soulevé l'importance du besoin d'estimer adéquatement la taille des échantillons et d'établir clairement les conditions initiales (baseline) avant de procéder à une étude clinique. À la même époque, Gold et collaborateurs ont également contribué à la fondation de cette discipline grâce à leurs contributions importantes dans le développement du design d'essais cliniques.^{2,3}

La pharmacologie clinique a connu un essor scientifique due entre autres à certains médicaments pour lesquels des réactions indésirables ont retenus particulièrement l'attention de la population. Au début il y eu la digoxine et la quinidine, plus tard la thalidomide, la théophylline, les anti-arythmiques et récemment la terfénaire, l'astémizole, le mibéfradil et le cisapride. Ainsi, au début des années soixante, la tragédie de la thalidomide a entraîné une expansion du mandat de la FDA afin de mieux protéger le public.⁴ La catastrophe de la thalidomide a aussi fourni l'élan majeur quant au développement de centres d'excellence académique financé par le

National Institute of Health (NIH) dans le domaine de la pharmacologie clinique. En réponse au mandat public généré par cette tragédie, les chefs de file en pharmacologie clinique des divers grands centres ont tenté d'établir un consensus sur les causes pouvant être prévenues et contribuant à la survenue d'effets indésirables importants.⁴ Parmi les causes susceptibles pouvant entraîner l'apparition de réactions indésirables ils ont noté ; une polypharmacie inadéquate, un échec de la part du personnel médical à identifier et à attribuer les symptômes ou les changements des tests de laboratoire à la médication, le manque d'études scientifiques concernant les mécanismes des réactions indésirables et enfin, l'ignorance générale des principes de la pharmacologie de base et appliquée et ceux de la thérapie.³ Ils concluent aussi que mise à part les effets tératogènes, les réactions indésirables aux médicaments observées en clinique sont pour la plupart liées à la dose et plus rarement, idiosyncrasiques.

Par la suite, la reconnaissance que la réponse aux médicaments est très variable entre les patients qui sont traités avec une dose standard a suscité le développement de méthodes analytiques afin de mesurer les concentrations sanguines chez les patients.³ La disponibilité de ces analyses rendait possible l'application des principes de pharmacocinétique dans la pratique routinière des soins aux patients. Toutefois, malgré ces avancées importantes, la fréquence des réactions indésirables majeures (soit celles nécessitant ou prolongeant des hospitalisations, entraînant une invalidité ou même la mort) demeurait toujours élevée (6.7% chez les patients hospitalisés).⁵ Certains prétendaient même que cette incidence était probablement plus élevée que celle généralement reconnue.

Il est possible et il était de pratique commune d'établir la dose thérapeutique d'un médicament par une approche empirique, soit par essai et erreur, en ajustant la dose ou l'intervalle posologique en fonction des effets produits, observés et attendus.⁶ Ainsi, un régime thérapeutique est établi afin d'optimiser la réponse pharmacologique et de réduire les toxicités et les inefficacités thérapeutiques. Les progrès en pharmacologie clinique ont seulement pris de l'ampleur lorsqu'il fut découvert que les concentrations au site actif et non la dose guidaient la réponse et que pour atteindre et maintenir une réponse adéquate, il était nécessaire de générer et d'assurer un profil d'exposition approprié du médicament dans l'organisme.⁷ Ainsi, ils sont passés de l'approche empirique caractérisée par une relation directe entre la dose du régime thérapeutique et les effets observés (désirables et indésirables) à une approche dite rationnelle où la dose et la réponse observée ne

sont plus directement reliées.⁶ Selon ce concept, les facteurs contrôlant le profil d'exposition définissent la pharmacocinétique. Brièvement, la pharmacocinétique peut-être caractérisée comme suit «qu'est-ce que l'organisme fait avec le médicament» alors que la pharmacodynamie peut-être décrite par «qu'est-ce que le médicament fait sur l'organisme».

La pharmacocinétique décrit la relation entre «l'input» du médicament et les concentrations atteintes dans le temps. De fait, la pharmacocinétique est définie par les processus d'absorption, de distribution et d'élimination (métabolisme et excrétion) du médicament qui influencent le temps d'action de ce dernier. La pharmacodynamie décrit la relation entre les concentrations et les effets produits dans le temps. Ainsi, la pharmacodynamie constitue la phase intervenant directement avec le mécanisme d'action du médicament. Il existe des facteurs pouvant influencer tant les paramètres pharmacocinétiques que pharmacodynamiques et conséquemment, une modulation de la réponse au médicament pourra être observée.

Suivant l'administration d'un médicament, le profil de réponse et d'effets indésirables diffèrent parmi les patients. Le phénomène de variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments est largement reconnu par la communauté scientifique et médicale. Malgré les avancés technologiques, les problèmes de santé (incluant les effets indésirables importants, la toxicité et l'inefficacité de traitement) et les coûts économiques engendrés au système de santé qui découlent de la difficulté à prévenir et à mieux contrôler cette variabilité demeurent importants encore aujourd'hui. De nombreux efforts ont été portés afin de mieux comprendre les facteurs susceptibles de moduler la réponse aux médicaments. La variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments est multifactorielle. Parmi les divers facteurs responsables, on retrouve ; les facteurs environnementaux, le sexe, l'âge, le poids, la présence de diverses pathologies concomitantes, les polymorphismes génétiques et différents déterminants pouvant affecter le devenir du médicament (l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion). Les diverses combinaisons et interactions entre ces différents facteurs déterminent le profil pharmacocinétique et pharmacodynamique d'un médicament pour chaque patient.

Une attention particulière est portée sur le métabolisme des médicaments comme déterminant majeur impliqué dans la variabilité dans la réponse aux médicaments.

D'ailleurs, il faut préciser que les interactions médicamenteuses affectant la pharmacocinétique et particulièrement celles altérant le métabolisme des médicaments constituent un des facteurs majeurs impliqués dans la survenue d'effets indésirables. De fait, 70 à 80% des réactions indésirables aux médicaments seraient principalement reliés à la relation dose-concentration d'où l'importance des facteurs pouvant affecter la pharmacocinétique.³ Malheureusement, le concept est connu mais difficile d'application dans la pratique clinique.

Certains grands concepts associés à la pharmacocinétique et à la pharmacodynamie sont brièvement élaborés dans la section suivante.

1.1.1. PHARMACOCINÉTIQUE

Absorption :

L'absorption est le processus par lequel le médicament inchangé se rend du site d'administration au site où sont effectués les mesures de concentrations dans l'organisme (habituellement, le plasma). Suivant son administration orale, le médicament est confronté à diverses barrières et obstacles pouvant causer des pertes de ce dernier avant d'atteindre la circulation systémique. Certains facteurs pouvant limiter l'absorption d'un médicament incluent entre autres une dissolution incomplète, une destruction du produit, les propriétés physico-chimiques de la molécule, des difficultés reliés au passage trans-intestinal secondaire à la présence de transporteurs et le métabolisme dans la lumière intestinale ou dans les entérocytes.⁶ L'absorption n'est pas restreinte à l'administration orale seulement mais s'applique aussi aux routes intramusculaire, sous-cutanée et autres voies extravasculaires. Ainsi, le suivi du composé inchangé dans le plasma est un moyen permettant l'évaluation de l'entrée du médicament dans la circulation systémique.

La biodisponibilité est souvent utilisée pour caractériser l'absorption du médicament. Le paramètre de biodisponibilité représente l'effet du premier passage intestinal-hépatique (métabolisme et transport) que subit le médicament lors du processus d'absorption jusqu'à ce qu'il atteigne la circulation systémique. Ce terme a été défini comme la quantité relative du médicament administré d'une formulation pharmaceutique précise qui entre dans la circulation systémique sous sa forme inchangée et la vitesse à laquelle ceci survient.⁸ Par convention, l'administration intraveineuse permet d'estimer la biodisponibilité absolue (100%). La biodisponibilité

relative par voie orale des médicaments est généralement inférieure à 1 ce qui s'explique principalement par l'effet du premier passage intestinal-hépatique.

Distribution :

Une fois le médicament absorbé, celui-ci pourra se distribuer dans différents tissus de l'organisme. La distribution est un processus réversible consistant en un transfert du médicament du site où sont effectués les mesures (souvent le plasma) vers les différents tissus.⁸

Élimination :

L'élimination est un processus irréversible caractérisé par une diminution des concentrations du médicament du site où l'on mesure celui-ci. L'élimination s'effectue selon deux processus qui sont l'excrétion et le métabolisme. L'excrétion consiste en une perte irréversible du médicament sous forme inchangée tandis que le métabolisme est la conversion chimique du composé en un autre produit.⁶

L'un des concepts probablement le plus important et le plus utilisé en clinique est celui de la clairance. La clairance est une mesure de capacité d'un organe à éliminer le médicament reliant alors la quantité de médicament éliminé de l'organisme durant une certaine période à sa concentration moyenne dans la circulation systémique durant cette même période (agissant comme réservoir).⁶ La clairance est décrite par l'équation suivante ; $CL = \text{Dose} / \text{AUC}$ où l'aire sous la courbe représente l'exposition totale au médicament durant une période de temps. La clairance d'un médicament est soumise au principe d'additivité et conséquemment, la clairance totale est obtenue par l'addition des clairances du médicament par différents organes.⁸

La concentration dans le plasma atteinte après que la distribution soit complétée est fonction de la dose et de l'étendue de la distribution du médicament dans les tissus. Le volume de distribution est un volume apparent (et non un espace physique) dans lequel le médicament se retrouve. Le volume de distribution sera dépendant de la liaison du médicament avec les protéines plasmatiques, à sa liaison tissulaire, à l'accessibilité des cellules et à sa partition dans les lipides.⁶ Des données récentes indiquent de plus que la présence de transporteurs membranaires d'influx et d'efflux sont des déterminants majeurs de la distribution tissulaire des médicaments.

La demi-vie d'élimination apparente d'un médicament est également un paramètre souvent utilisé en clinique. Elle représente le temps nécessaire pour que soit réduit de moitié la quantité du médicament dans l'organisme. La demi-vie d'élimination apparente d'un médicament est dépendante de la clairance totale et du volume de distribution du médicament.⁸

Tel que mentionné précédemment, l'élimination a lieu par excrétion et/ou par métabolisme. Pour la majorité des médicaments, l'excrétion est effectuée principalement via les reins et la bile. Le métabolisme représente le mécanisme majeur pour l'élimination des médicaments. Parmi les voies communes du métabolisme des médicaments, on note l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse et la conjugaison. Un médicament peut être soumis à plusieurs voies de métabolisme et ces réactions surviennent habituellement dans un ordre séquentiel ; les réactions de Phase I et de Phase II.⁶ En effet, un médicament peut subir simultanément un métabolisme par différentes voies compétitives et les métabolites peuvent aussi subir un métabolisme dit secondaire. Les réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de réduction surviennent généralement en premier, suivi des réactions de conjugaison d'où la désignation de réactions de Phase I et II, respectivement. Ainsi, les transformations de phase I introduisent généralement un groupement fonctionnel ou réactif dans la molécule alors que les transformations métaboliques de phase II sont habituellement des réactions de conjugaison du produit mère ou du métabolite avec l'acide glucuronique, le glutathion ou un sulfate. Les réactions de conjugaison facilitent le transport et favorisent l'élimination par les voies rénales et biliaires. Les réactions de phase I sont majoritairement catalysées par le système enzymatique des CYP450s.

La biotransformation des médicaments est un mécanisme permettant à l'organisme de se débarrasser de composés étrangers indésirables comme les médicaments qui sont perçus comme des toxiques potentiels. Également le processus de biotransformation peut constituer un mécanisme afin de produire la forme active de certains composés (par exemple ; les promédicaments). De plus, il faut noter que ces systèmes enzymatiques responsables de l'élimination des médicaments sont sujets à des variabilités inter- et intra-individuelles affectant ainsi l'élimination du médicament et conséquemment, on pourra parfois observer une modulation de l'effet pharmacologique de même que l'apparition de réactions indésirables. De fait, l'âge, le sexe, la présence de certaines pathologies peuvent affecter l'expression et/ou l'activité de certaines enzymes de biotransformation. De plus, il est bien

évident que l'administration concomitante de médicaments métabolisés via la même voie métabolique entrainera une inhibition (compétitive ou non) de l'enzyme avec des conséquences cliniques qui peuvent être de mineures à majeures et même mortelles dans certains cas.

1.1.2. PHARMACODYNAMIE

La pharmacodynamie décrit la relation entre les concentrations du médicament au site d'action et l'effet pharmacologique observé de ce médicament. L'intensité et la durée de l'effet pharmacologique sera fonction et proportionnelle à la dose administrée et à la concentration au site d'action.³ L'étude de l'effet pharmacologique d'une molécule peut être effectuée à partir de différentes stratégies ; par exemple à l'aide de modèles cellulaires ou moléculaires (*in vitro*), de tissus ou d'organes (*in vitro*, *in vivo*) ou finalement, en utilisant la totalité de l'organisme (*in vivo*).³ La mesure utilisée pour évaluer l'effet peut différer selon la stratégie employée.

Les études pharmacodynamiques ont pour objectif d'évaluer la relation dose-effet ou concentration-effet et représentent un point central en pharmacologie. Ces études contribuent à mieux comprendre le mécanisme d'action des médicaments, à sélectionner les doses et les régimes posologiques, à déterminer l'efficacité et la puissance des différents agents pharmacologiques et à élucider des interactions médicamenteuses. Il faut toutefois préciser que la relation pharmacodynamique générale concentration- ou dose-effet ne reflète pas nécessairement la réponse dans le temps du médicament et est parfois insuffisante pour décrire cette réponse.³ Ceci s'explique entre autres par les raisons suivantes ; 1) le plasma ne constitue pas le site d'action de la majorité des médicaments et ainsi, la réponse est retardée par rapport aux prédictions pharmacocinétiques réalisées avec les concentrations plasmatiques (à l'exception de certains médicaments comme l'héparine) et 2) l'action pharmacologique d'un médicament n'est pas nécessairement la même que la réponse au médicament.³ Une cascade de réactions peut suivre la liaison au récepteur et entraîner des médiateurs intermédiaires et des voies de signalisation complexes causant des changements physiologiques. Par conséquent, il est important de distinguer l'action pharmacologique (par exemple ; l'inhibition de l'enzyme HMG-CoA réductase par les statines) de l'effet physiologique (par exemple ; la baisse du cholestérol par les statines) et la réponse thérapeutique (par exemple ; la baisse du risque d'évènements cardiovasculaires). En résumé, l'effet

serait une conséquence de l'action du médicament et le délai d'action serait un reflet du temps requis pour que le médicament atteigne le site d'action pharmacologique ou encore, pour que le médicament altère la synthèse ou la dégradation de certains facteurs lesquels sont associés à des effets physiologiques.

Conclusion

La variabilité importante observée dans la réponse aux médicaments associée aux retombées économiques engendrées par une mauvaise utilisation de ces derniers sont un enjeu important soulevant un besoin de développer des outils afin d'améliorer les soins aux patients. La nouvelle approche se veut une médecine davantage personnalisée qui consiste à adapter la dose, le régime posologique et le choix du médicament aux caractéristiques du patient. Ceci nécessite une intégration des connaissances relatives à la pharmacocinétique et à la pharmacodynamie. En général, on remarque que le désir de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la variabilité dans la réponse aux médicaments a suscité un intérêt marqué pour la pharmacocinétique dont particulièrement pour le métabolisme des médicaments.

1.2. CYTOCHROMES P450

1.2.1. GÉNÉRALITÉS

Évolution : des plantes à l'homme

Les CYP450s seraient d'abord apparus chez les procaryotes, avant l'arrivée des eucaryotes et même, avant l'accumulation d'oxygène dans l'atmosphère. En fait, il semble que les systèmes d'oxydoréduction de type fer-sulfure auraient joué un rôle clé dans l'origine et le développement de la vie.⁹ Alors qu'au départ, le rôle des CYP450s pouvait être la détoxification vis-à-vis l'oxygène, l'augmentation majeure de l'oxygène dans l'atmosphère, il y a des millions d'années, a probablement redirigé les fonctions des CYP450s vers une utilisation de l'oxygène pour le métabolisme de produits endogènes et de xénobiotiques.⁹ D'ailleurs, l'élaboration de l'arbre phylogénétique montre un lien entre les concentrations d'oxygène atmosphérique et le développement biologique. Le métabolisme d'acides gras

endogènes et de stéroïdes fut probablement les fonctions premières et communes des CYP450s.¹⁰

Une diversification massive a eu lieu avec l'apparition des plantes suivie par la colonisation de vertébrés. Cette diversification importante est attribuée aux plantes qui se défendent contre les herbivores lesquels sont pourvus de nouveaux CYP450s capables de les détoxifier.¹¹ De fait, des évidences soulignent un phénomène de coévolution liant les CYP450s des herbivores avec ceux retrouvés chez les plantes. Les données phylogénétiques suggèrent une longue bataille entre les CYP450s retrouvés chez les plantes et ceux des mammifères. En fait, dans l'évolution de la vie, les autotrophes comme les plantes doivent synthétiser des composés organiques à partir de sources inorganiques et de l'énergie alors que les hétérotrophes comme les animaux, peuvent puiser leur énergie à partir de ces derniers. Les plantes ont élaboré des moyens de défense chimique en produisant des toxines afin de dissuader les prédateurs potentiels et de se protéger. En réponse, le système des CYP450s chez les animaux s'est développé et s'est adapté afin de pouvoir se détoxifier de ces toxines. Ainsi, de cette rivalité qui perdure depuis des millions d'années, se développent des activités catalytiques et de nouvelles formes de CYP450s. Il y aurait au moins une famille de CYP450s dont l'expression est ubiquitaire et commune à tous les organismes (animaux, plantes, champignons, levures, bactéries), soit le CYP51 (stérol déméthylase) qui est considéré comme étant le plus ancien membre de la famille des CYP450s.^{12, 13}

Historique :

La branche de la pharmacologie qui considère l'implication des enzymes de métabolisme comme un processus déterminant dans la disposition des médicaments dans l'organisme, maintenant défini comme le métabolisme des médicaments, a émergé vers 1840, avec les premières études s'intéressant au devenir et à la transformation dans l'organisme de produits exogènes en métabolites.¹⁴ Garrod fut le premier à réaliser que des enzymes pourraient agir comme détoxifiant envers les substances exogènes ; il croyait alors que les effets toxiques présentés par certains patients résultaient de l'inefficacité de leurs enzymes à détoxifier ces substances.¹⁵ La grande majorité des processus des voies métaboliques (comme, l'oxydation, la réduction, la sulfatation, la conjugaison à l'acide glucuronique, la méthylation et l'acétylation) furent découverts et décrits entre ~1860 et 1900.¹⁴ Par la suite, les travaux effectués à l'aide de préparation d'organes perfusés ont montré que le foie représentait le site principal de

métabolisme avec une contribution importante de d'autres organes, dont les reins. Après la Seconde Guerre Mondiale, les connaissances sur le métabolisme des médicaments ont connus des avancées majeures grâce à de nouvelles techniques de bioanalyse incluant la colorimétrie, la spectrométrie de masse et des techniques permettant d'explorer les réactions enzymatiques.

Un intérêt particulier pour les sciences biomédicales est apparu dans les années 1940-50. L'éclosion de ce secteur fut supportée «politiquement» entre autres par l'établissement de l'Institut Nationale de la Santé (NIH) et par la participation de différents comités gouvernementaux à fournir un support financier pour la recherche et la formation universitaire.¹⁶ De nombreux scientifiques ont ainsi participé à l'évolution des connaissances sur les CYP450s. Vers 1947, les travaux menés par RT Williams ont montré la formation de différents métabolites et leur excrétion par différentes voies d'élimination suite à l'administration de xénobiotiques chez l'animal.¹⁷⁻¹⁹ Ce chercheur proposa que le métabolisme des xénobiotiques impliquerait une variété de processus biochimiques. Bernard Brodie est considéré comme l'un des pionniers de la pharmacologie moderne. Son laboratoire fut parmi les premiers à proposer le concept que les différences dans la réponse pharmacologique à un médicament entre les espèces corrélaient avec la capacité métabolique et les concentrations plasmatiques. Par exemple, ils avaient observé que des doses importantes du produit SKF-525A prolongeaient l'action de plusieurs barbituriques.²⁰ En effet, le temps de sédation était augmenté chez les souris qui recevaient du SKF-525A. Les études de Cooper *et al.* montraient que le SKF-525A inhibaient le métabolisme *in vitro* et *in vivo* de d'autres médicaments suggérant un lien avec les enzymes qui métabolisent ces médicaments.²¹

À la même époque, la localisation de ces enzymes fut possible grâce à l'invention de l'ultracentrifugeuse laquelle a permis d'isoler différentes fractions d'homogénats de foie. À la fin des années 40, le crédit de la découverte démontrant que les enzymes impliquées dans le métabolisme de xénobiotiques sont localisées dans une fraction des cellules hépatiques revient au groupe de Jim et Elizabeth Miller.¹⁶ D'ailleurs, les travaux de Mueller et Miller ont décrit le rôle du NADPH et de l'oxygène comme étant des éléments requis pour métaboliser certains composés aminoazo par les fractions de cellules de foie séparées par centrifugation à partir d'un homogénat de foie de rat.^{22,23}

Axelrod qui était alors un étudiant dans le laboratoire du Dr Brodie, a développé des méthodes afin de mesurer le métabolisme de médicaments psychoactifs dont les amphétamines et l'éphédrine. Ils ont découvert que l'amphétamine était métabolisée en phenylacétone dans le surnageant lequel était obtenu suite à la centrifugation de 9,000g, mais pas dans la fraction microsomale ou la fraction soluble seules.²⁴ Leurs études ont montré que la présence d'un nucléotide triphosphate sous forme réduite (TPNH maintenant nommé NADPH) et de l'oxygène étaient nécessaires pour observer une activité catalytique dans des microsomes de foie de lapins. Ils conclurent donc que l'enzyme est dans les microsomes et que la fraction soluble fournit le NADPH. D'ailleurs, ces découvertes ont valu au Dr Axelrod un prix Nobel en 1970.

Parallèlement, l'avancement des connaissances concernant les CYP450s a aussi été possible grâce aux études sur le métabolisme des stéroïdes.^{25,26} Les travaux de Ryan et Engel révélèrent le rôle des CYP450s dans le métabolisme des stéroïdes. Ils ont également montré qu'en présence d'oxygène et de TPNH (ou NADPH), les fractions microsomales du cortex surrénalien catalysaient l'hydroxylation de la progestérone.²⁷

Tel que mentionné précédemment, le développement de technologies dont la spectrophotométrie a joué un rôle dans la découverte des CYP450s. Martin Klingenberg, un jeune physicien chimiste allemand, s'intéressa à la spectrophotométrie et à son application pour les réactions à cinétique rapide impliquant un transport d'électron. En 1958, Klingenberg découvrait la présence d'un pigment liant le monoxyde de carbone (carbon-monoxide-binding pigment) dont l'absorbance maximal se trouvait à ~450 nm. D'où la désignation de P450 qui s'expliquerait comme suit : «P» pour pigment avec un spectre d'absorption à 450 nm en présence d'un agent réducteur et de monoxyde de carbone dans des microsomes hépatiques de rat.²⁸ Ce pigment était très instable lors des traitements de solubilisation par des détergents. En 1962, les chercheurs Ryo Sato et Tsuneo Omura rapportèrent que la nature de ce pigment liant le monoxyde de carbone était une hémoprotéine.²⁹ Ils ont baptisé ce pigment hémoprotéique, un cytochrome. Leurs travaux constituent le fondement de nombreuses études réalisées par la suite.^{30,31} En 1962, le groupe composé d'Hashimoto, Yamano et Mason rapportait la découverte d'un nouveau composé ferrique dans des microsomes de foie de rat. Par la suite, il fut observé que ce «microsome ferrique» était identique au CYP450 d'après son spectre d'absorption optique.³²

La fonction physiologique de cette hémoprotéine liée à la membrane microsomale fut découverte en 1963, grâce aux travaux d'Estabrook, Cooper et Rosenthal qui s'intéressaient alors au rôle des stéroïdes dans l'hypertension.³³ En accord avec les travaux de Ryan et Engel, ils ont montré que l'hydroxylation de la 17-hydroxyprogestérone dans des fractions microsomiques de cortex des surrénales était inhibée en présence de monoxyde de carbone.^{33, 34} De plus, ils ont étudié le métabolisme oxydatif de plusieurs substrats dont la codéine, l'aminopyrine et l'acétanilide. Le métabolisme de ces produits était également inhibé par le monoxyde de carbone suggérant que le CYP450 est une enzyme impliquée dans l'hydroxylation de stéroïdes ainsi que dans le métabolisme de divers xénobiotiques.³⁵

Dans les années soixante, le caractère inductible de l'activité catalytique des microsomes hépatiques a été découvert par *Conney et al.* De fait, ils ont montré à partir d'expériences réalisées chez l'animal que certains produits chimiques entraînaient une augmentation de la capacité de métabolisme de certains stéroïdes et médicaments observé dans des microsomes de foie.^{36, 37} Au milieu des années soixante, la question suivante fut soulevée ; est-ce qu'il existe un seul CYP450 catalysant toutes ces réactions ou avait-il plusieurs CYP450s hépatiques dont chacun aurait une spécificité envers certains substrats ? Les études d'induction avec le phénobarbital et le 3-méthylcholanthrène par Sladek et Mannering mettaient en évidence pour la première fois qu'il existait de multiples formes de CYP450s dans le foie.³⁸ Il faudra attendre vers le milieu des années 70 avant la caractérisation de quelques formes de CYP450s. Ces travaux ont permis d'établir qu'effectivement il y a différentes formes de CYP450s lesquelles présentent un chevauchement mais aussi une certaine spécificité distinctive pour des substrats.³⁹ De plus, il a été montré que des CYP450s pouvaient être induits par certains composés chimiques, alors que d'autres CYP450s demeuraient relativement réfractaires à ces xénobiotiques inducteurs.

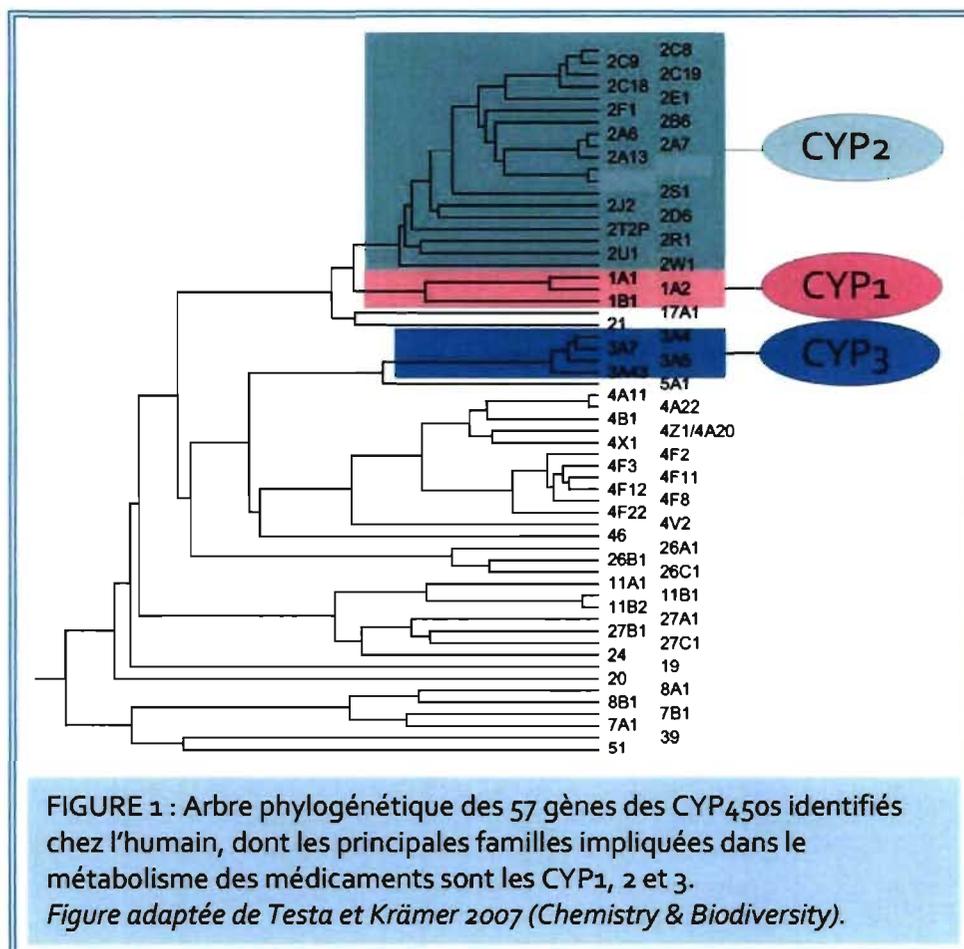
L'isolation et la caractérisation des différentes isoenzymes des CYP450s deviendront possibles au début des années 80 grâce aux percées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire. Au début des années 90, la recherche s'est davantage orientée sur les CYP450s humains ce qui a été possible grâce à la disponibilité de divers systèmes (enzymes recombinantes, anticorps spécifiques, tissus, biopsies...). Nous sommes maintenant dans l'ère des souris «knockout», des

enzymes recombinantes, d'anticorps spécifiques, de la pharmacogénétique et où les études sont davantage mécanistiques visant à mieux comprendre leurs fonctions physiologiques et l'implication clinique des différentes isoformes de ce système enzymatique.

Nomenclature :

La compilation des nombreuses recherches réalisées dans ce domaine ont montré que les CYP450s sont donc une superfamille constituée de plusieurs enzymes, nommées des isoenzymes, lesquelles sont toutes dérivées d'un gène ancestral commun. À la fin des années 80, un système de nomenclature a été développé par Nebert permettant d'identifier individuellement les différents CYP450s humains et des autres espèces qui est basé sur les similarités dans leurs séquences.^{40, 41} Il proposa une nomenclature pour les protéines des CYP450s basée sur l'évolution. Ainsi, les protéines dont les séquences d'acides aminés ont plus de 40% de sont regroupées dans une même famille. Les membres classifiés dans une même sous-famille présentent une homologie de plus de 55% dans leurs séquences. Le premier chiffre arabe désigne la famille des CYP450s, suivi d'une lettre indiquant la sous-famille et finalement, le dernier chiffre arabe permet l'identification individuelle de l'isoenzyme. L'acronyme CYP inscrit en majuscule fait référence à l'humain tandis que l'inscription Cyp réfère à la souris.

Le séquençage du génome de différents organismes a permis d'identifier plus de 7700 séquences de gènes de la superfamille des CYP450s, dont 2740 et 2675 chez les animaux et les plantes, respectivement. (<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>) Il est intéressant de constater que 102, 84 et 323 gènes associés aux CYP450s ont été identifiés dans le génome d'eucaryotes comme la souris, la drosophile et le grain de riz, respectivement alors que chez l'humain ce nombre est moindre.⁴² Effectivement, chez l'humain, 18 familles de gènes des CYP450s sont identifiés et 44 sous-familles sont répertoriées. (<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>) Au total, on retrouve 57 gènes et 58 pseudogènes associés aux CYP450s chez l'humain (Figure 1). (<http://drnelson.utm.edu/CytochromeP450.html>)

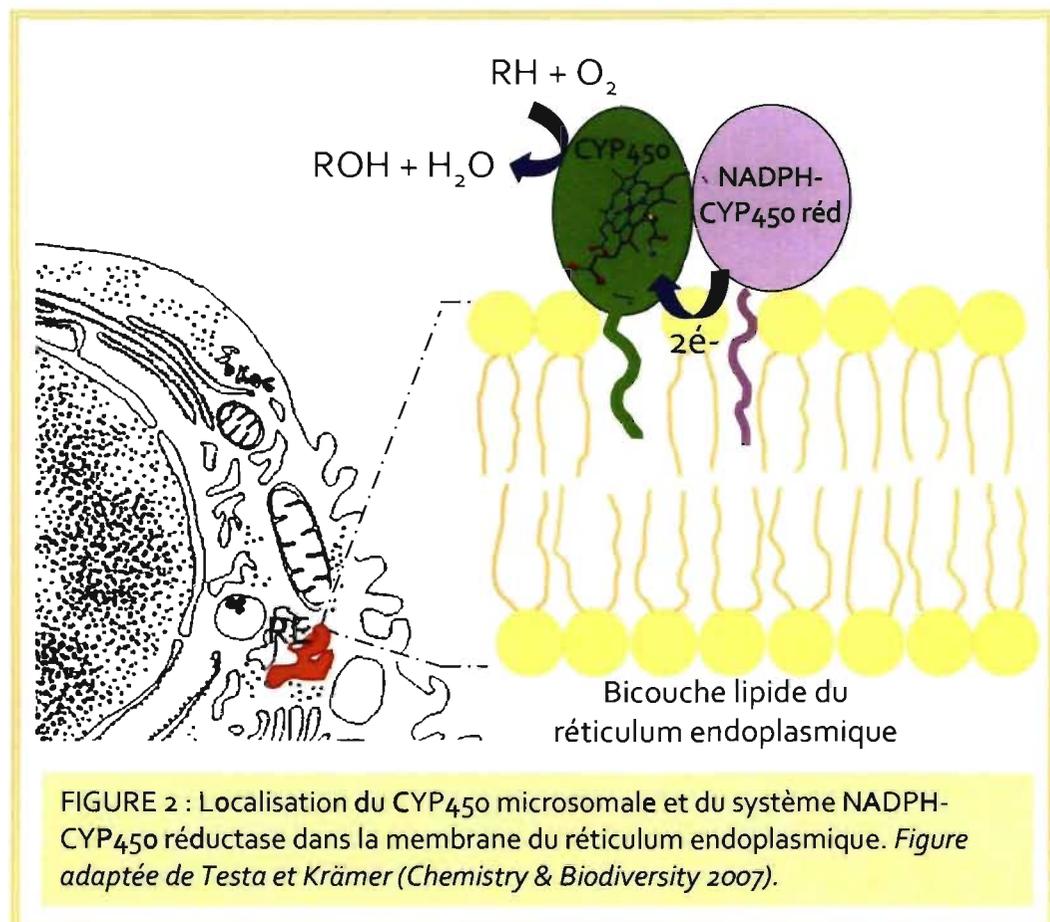


1.2.2. PROPRIÉTÉS

La désignation de «cytochrome P450» origine de leur caractère hémoprotéique et de la propriété spectrale particulière montrant un pic maximal d'absorption à 450 nm du complexe réduit du monoxyde de carbone avec l'enzyme. D'ailleurs la capacité du CYP450 réduit à produire un pic d'absorption à 450 nm suite à sa liaison avec le monoxyde de carbone est encore la technique utilisée pour l'estimation du contenu en CYP450. En fait, le monoxyde de carbone lie le fer de l'hème et la différence d'absorbance permet de quantifier la protéine. Le déplacement du maximum d'absorption vers le rouge d'environ 30 nm, tel qu'observé avec les CYP450s, désigne que la densité d'électrons au groupement hème est significativement perturbée. Il a été documenté que ceci serait dû à l'anion thiolate, c'est-à-dire un soufre chargé négativement.⁴³ L'atome de soufre provient de la cystéine dans la région du site actif de l'hème (les détails seront présentés dans la partie *structure*).

Localisation :

Les enzymes des CYP450s sont généralement attachées à une membrane, à l'exception de certains CYP450s solubles lesquels sont retrouvés chez les bactéries seulement. Donc, les CYP450s sont des protéines membranaires principalement localisés au niveau du réticulum endoplasmique (90%), bien que certaines formes de CYP450s participant à la synthèse de stérols, de stéroïdes ou d'acides biliaires résident dans la matrice mitochondriale.^{42, 44, 45} La protéine est ancrée dans la couche membranaire bilipidique par le segment N-terminal qui est hydrophobe alors que le restant de la protéine jusqu'au segment C-terminal est exposé dans le compartiment cytosolique où le site catalytique est accessible. Les données indiquent que la NADPH-CYP450 réductase, la NADH-CYPb5 réductase et que le cytochrome b5 présentent une organisation similaire (figure 2).⁴⁶



La plupart des CYP450s sont exprimés préférentiellement dans la zone centrilobulaire du foie.⁴⁷ Ceci n'est toutefois pas sans conséquences toxicologiques puisqu'en général, la région centrilobulaire du foie est davantage sensible aux

dommages occasionnés par les médicaments et l'éthanol qui sont activés via l'action des CYP450s.⁴⁸

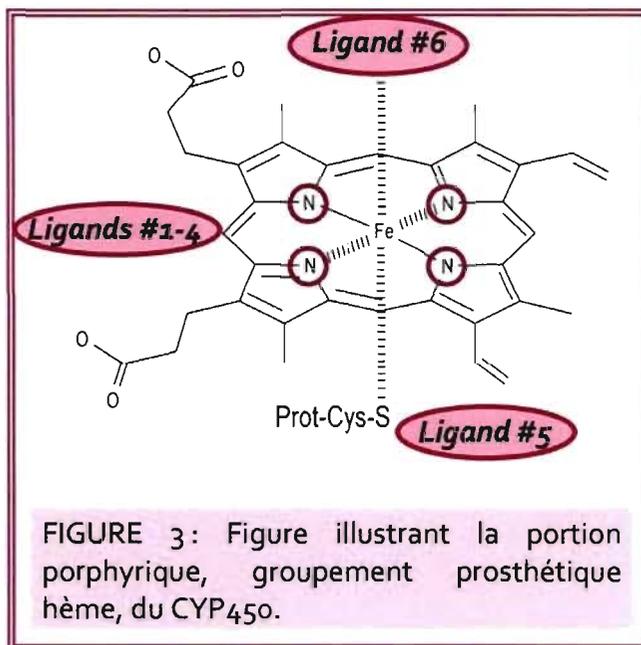
Les CYP450s sont exprimés dans la majorité des organes du corps humain, mais certaines isoformes apparaissent spécifiques à certains organes. Certains tissus incluant le foie, les intestins et les glandes surrénales expriment des quantités élevées de CYP450s et leur concentration peut excéder celle des autres hémoprotéines retrouvés dans ces organes.

Structure :

Comme toute hémoprotéine, le CYP450 est composé d'une apoprotéine et d'un groupement hème. Ce dernier, l'hème, constitue la partie prosthétique nommée protoporphyrine ferrique (*iron-protoporphyrin*). Cette porphyrine est commune aux cytochromes et aux autres hémoprotéines comme l'hémoglobine et la myoglobine. De fait, le groupement hème sert de groupement prosthétique pour de nombreuses hémoprotéines essentielles à la vie. D'ailleurs celles-ci sont impliquées dans un éventail remarquable de fonctions biologiques comme la liaison de l'oxygène par l'hémoglobine, des réactions métaboliques impliquant l'oxygène (par exemple ; les monooxygénases et les peroxidases), la transmission de signaux associés à des cascades de régulation (par exemple ; la guanylate cyclase et l'oxyde nitrique synthase) et les réactions de transfert d'électrons par les cytochromes.⁴⁹ L'élément le plus conservé dans la structure des CYP450s est la région hème-thiolate où l'oxygène est activé, c'est-à-dire le site actif de l'enzyme.

Contrairement à la partie prosthétique (porphyrine) de l'enzyme, la section protéique (apoprotéine) est très variable d'une isoenzyme à l'autre. C'est d'ailleurs ce qui confère des différences dans leurs propriétés telles que les réactions, les produits formés, la spécificité enzyme-substrat et le poids moléculaire. Les CYP450s sont des hémoprotéines dont le poids moléculaire est d'environ 50 kDa (oscillant entre 45 à 60 kDa) et contenant approximativement 500 acides aminés.⁵⁰

Le fer dans le groupement prosthétique de l'hème est coordonné avec quatre atomes d'azote situés dans des noyaux pyrroles. On retrouve également deux ligands additionnels non-porphyriques qui sont situés en positions axiales dont le ligand thiolate étant possible par la cystéine.⁵⁰ En effet, une molécule de cystéine se situant près du groupement carboxy-



terminal de la protéine fournit un atome de soufre essentiel au fer contenu dans l'hème.⁵¹ La liaison fer-soufre étant exceptionnellement forte entraîne un transfert considérable de la densité des électrons vers l'atome de fer nécessaire pour l'activité catalytique de l'enzyme. En effet, le ligand thiol en altérant la densité d'électrons fournit le champ électronique requis pour activer l'oxygène. D'ailleurs, la formation du cytochrome P420, forme inactive, peut être induite par la dénaturation de la protéine impliquant un déplacement du ligand hème-thiolate, c'est-à-dire par la rupture du lien fer-soufre. Le sixième ligand dont l'attraction est beaucoup plus faible peut être un groupement hydroxy provenant d'un acide aminé adjacent ou une molécule d'eau ou encore un substrat. Le groupement prosthétique hème est en intime relation avec le substrat puisque cet atome de fer permet l'activation de l'oxygène et l'oxydation du substrat.

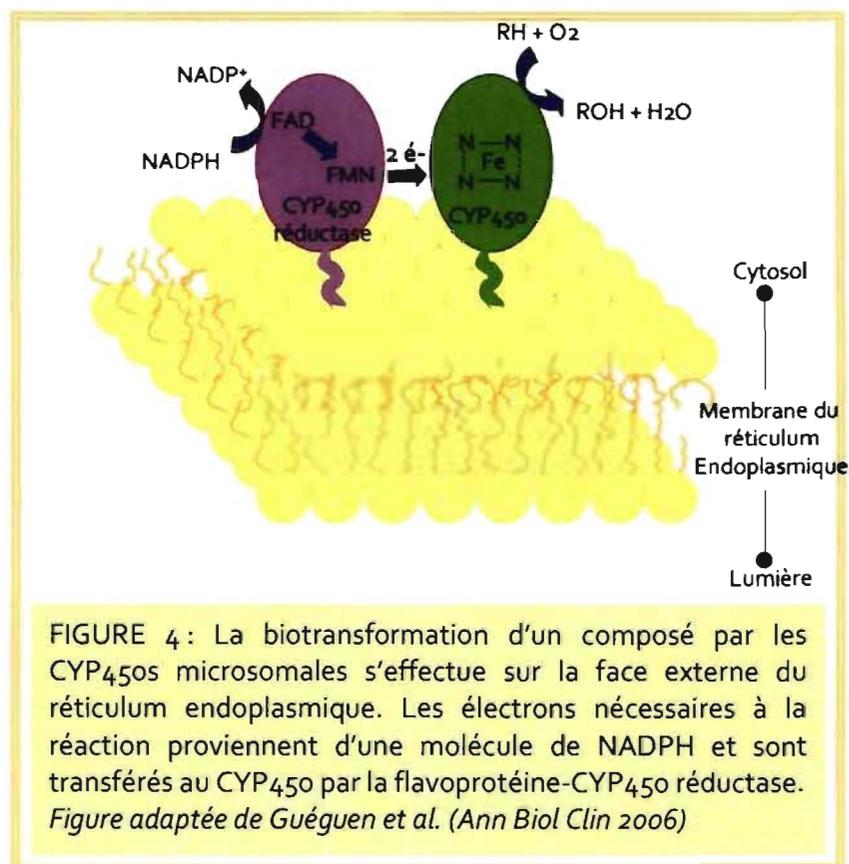
1.2.3. MÉCANISMES

Les CYP450s représentent le système enzymatique majeur responsable des réactions métaboliques de phase I. Brièvement, les transformations métaboliques de phase I introduisent un groupement fonctionnel ou réactif dans la molécule. Les mécanismes par lesquels les CYP450s catalysent ces réactions de phase I ont été largement étudiés malgré que certains points demeurent encore obscurs. La principale fonction des CYP450s est d'activer une molécule d'oxygène causant des intermédiaires réactifs pouvant attaquer des sites particuliers d'une entité chimique afin d'introduire un groupement hydroxy dans la structure. Le cycle catalytique

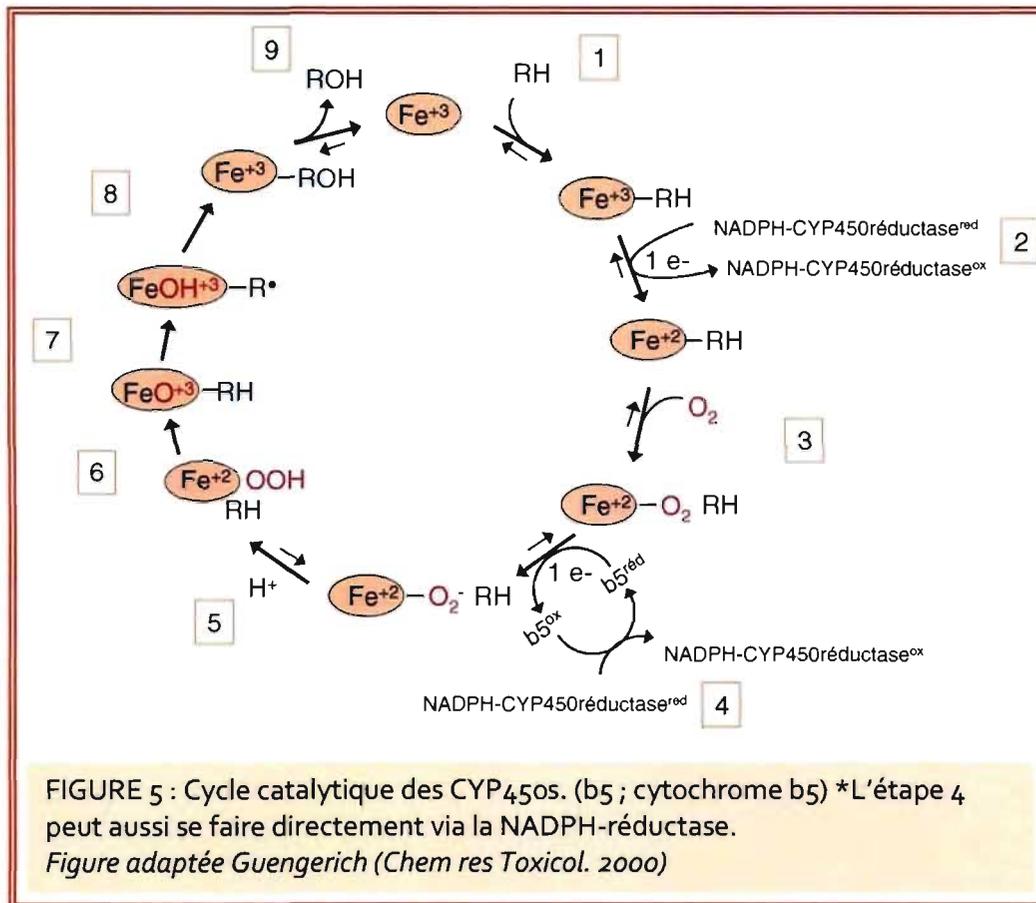
définissant le fonctionnement de ce système enzymatique ainsi que les réactions qu'ils catalysent seront brièvement décrits.

Cycle catalytique :

Les CYP450s sont des monooxygénases qui nécessitent un donneur d'électrons externe transférant les électrons requis pour l'activation de l'oxygène. Les CYP450s peuvent être classifiés en deux groupes selon le système d'électron utilisé. Les CYP450s microsomaux qui sont des protéines membranaires acceptent leurs électrons d'une flavoprotéine, la NADPH-CYP450 réductase. Cette flavoprotéine contient une flavine-adénine dinucléotide (FAD) et une riboflavine 5'phosphate (FMN). Alors que la seconde classe de CYP450s comprenant les CYP450s mitochondriales obtiennent leurs électrons d'une NADH-FAD réductase. Cette classe ne sera toutefois pas discutée dans la présente thèse.



Le cycle catalytique des CYP450s microsomaux à titre de monooxygénase comprend différentes étapes se déroulant comme suit ; le cycle débute en présence d'un CYP450 dont le fer est à l'état ferrique (Fe^{+3}) (Figure 5). 1) Lors de l'étape 1, le substrat se lie à l'enzyme près de la région distale de l'hème. La fixation du substrat avec le CYP450 peut entraîner un changement dans le spin de l'atome de fer (certains CYP450s ont un spin faible alors que d'autres CYP450s présentent un spin élevé à l'état libre de substrat). En fait, le fer ferrique à l'état d'équilibre existe sous deux états électroniques ; sous forme de spin faible et spin élevé. Mais suite à cette liaison enzyme-substrat, l'hémoprotéine est obligatoirement sous la forme d'un spin élevé. Un spin élevé de l'atome de fer, aussi nommé état actif ou réductible, est caractérisé par une réduction qui est en termes d'énergie beaucoup plus facile que la forme de spin faible. 2) Ceci permet de procéder à la première étape de réduction où un électron sera transféré du NADPH-CYP450 réductase au CYP450 microsomal. Plus particulièrement, l'électron vient du NADPH via la flavoprotéine NADPH-CYP450 réductase, dont l'électron circule du groupement prosthétique du FAD au FMN au CYP450. 3) Le CYP450 réduit, maintenant sous un état ferreux (Fe^{+2}), peut se lier à une molécule d'oxygène formant un complexe instable, Fe^{+2}O_2 . Il semble que pour que la réaction de monooxydation ait lieu, le second électron doit être acheminé rapidement, autrement le complexe se dissocierait libérant un anion radicalaire superoxide. 4) Le complexe CYP450-dioxygène-substrat reçoit le second électron. Le transfert de cet électron peut être exécuté soit par la NADPH-CYP450 réductase ou via le cytochrome b5. L'origine du deuxième électron dépend du CYP450 impliqué. 5) Un proton est ensuite ajouté. La réaction d'oxydation implique donc un transfert au substrat d'un atome d'oxygène activé. 6) Une molécule d'eau est libérée suite à la scission irréversible du lien peroxide, FeO-O . Lors de cette réaction le ligand thiolate joue un rôle déterminant en augmentant la densité d'électrons des deux atomes d'oxygène. 7) Ceci génère un composé réactif, le FeO^{+3} qui généralement attaque un atome d'hydrogène du substrat produisant un substrat radicalaire mais peut aussi attaquer directement le lien carbone-hydrogène sans la formation d'un intermédiaire radicalaire. 8) Ce qui est immédiatement suivi par la formation du complexe enzyme-produit caractérisée par une oxydation et finalement, 9) le produit se dissocie de l'enzyme.



Réactions :

La versatilité des CYP450s concerne tant la grande variété de substrats qu'ils métabolisent que la variété remarquable de réactions qu'ils catalysent. L'oxydation représente la réaction la plus fréquente, toutefois les CYP450s peuvent également catalyser des réactions inhabituelles telles que la réduction, la déhalogénéation, la déshydrogénation et des oxydations menant à des ouvertures de cycles.⁵² Les réactions conventionnelles de base incluent la C-oxydation, l'oxygénation d'un hétéroatome, la déalkylation et la formation d'époxyde. Brièvement, l'hydroxylation d'un carbone, ou C-oxydation, est la réaction la plus commune entraînant généralement la formation d'un alcool. Ces réactions sont habituellement associées à une diminution de la toxicité. Quant à l'oxygénation d'un hétéroatome, elle représente l'ajout d'un oxygène sur un atome autre que le carbone tel qu'un atome d'azote, de phosphore, de soufre et d'iode. Plusieurs des produits S-oxydés et N-oxydés possèdent une toxicité moindre que la molécule mère. Cependant, il faut noter que la N-oxydation des composés arylamines et d'amines hétérocycliques

entraîne au contraire une activation de ces derniers. Parmi les autres réactions communément catalysées par les CYP450s, on retrouve la déalkylation qui consiste en l'hydroxylation d'un carbone adjacent à un hétéroatome engendrant la libération de ce dernier ainsi que la formation d'époxyde pour des composés possédant des carbones insaturés dans leur structure.⁵² La réaction causant une libération d'un hétéroatome (déalkylation) peut résulter tant en une détoxification qu'une bioactivation.⁵² L'époxydation est tout particulièrement d'intérêt dans le domaine de la toxicologie car elle peut entraîner la formation de produits instables pouvant interagir avec des macromolécules.⁵² D'ailleurs, ces réactions sont observées dans l'activation de divers composés chimiques carcinogènes par les CYP450s.⁵³ Par ailleurs, même si la participation des CYP450s dans les réactions de réduction de composés endogènes n'est pas en grand nombre, leur implication demeure importante.⁵² Par exemple, il semble que les CYP450s soient impliqués dans des réactions de déshydrogénation laquelle est importante dans le métabolisme des acides gras.

En somme, les CYP450s constituent le système enzymatique en importance responsable du métabolisme des xénobiotiques. Le système enzymatique des CYP450s est caractérisé par une versatilité importante dû au nombre de réactions qu'il catalyse ce qui est rendue possible grâce aux multiples membres qui le compose. La prochaine section fera une revue des principales familles des CYP450s, des membres qui les composent et qui sont principalement impliqués dans le métabolisme des médicaments.

1.2.4. ISOENZYMES

Les caractéristiques générales des principales isoenzymes des familles CYP1, CYP2 et CYP3 seront décrites. Les isoenzymes se distinguent entre autres par leur niveau d'expression tissulaire, leur sélectivité tissulaire, la sélectivité de leurs substrats et les réactions qu'elles catalysent.

CYP1

La famille CYP1 est constituée de 3 gènes, soit les *CYP1A1*, *CYP1A2* et *CYP1B1*. Globalement, ces trois enzymes sont davantage impliquées dans le métabolisme ou

l'activation de divers pro-carcinogènes environnementaux et de toxines.⁵⁴⁻⁵⁶ Le CYP1A2 est essentiellement exprimé au foie. À l'inverse, les CYP1A1 et CYP1B1 sont surtout des isoenzymes retrouvées dans des tissus extra-hépatiques.

CYP1A1

Le CYP1A1 est exprimé dans le foie fœtal, mais son expression chez l'adulte n'est pas très importante.^{57, 58} Par ailleurs, il est exprimé dans les poumons où des variations importantes dans les niveaux de CYP1A1 ont été observées entre les sujets.^{59, 60} Cette isoenzyme est également retrouvée dans le placenta et dans les cellules sanguines périphériques (les lymphocytes et monocytes).^{61, 62} De plus, l'ARNm associé au gène *CYP1A1* a été détecté dans certains tissus extra-hépatiques comme le pancréas, la prostate, le thymus, l'intestin grêle, le colon et les glandes mammaires.^{51, 63} Le CYP1A1 fut la première isoenzyme étudiée dans l'hydroxylation d'hydrocarbures aromatiques.^{64, 65} Elle intervient dans le métabolisme de composés comme le benzopyrène ou l'éthoxyrésorufine, mais aussi dans l'activation de puissants pro-carcinogènes.^{60, 66-69} Dans les années soixante, Nebert et Gelboin ont montré que l'enzyme aryl hydrocarbure hydroxylase qui représentait alors le CYP1A1, pouvaient être induite.^{64, 65} Bien qu'*in vitro* cette isoenzyme apparaît inductible via de nombreux composés, *in vivo* les évidences «d'inductibilité» avec les différents produits sont plus limitées. La fumée de cigarette, les amines hétérocycliques et l'oméprazole demeurent des inducteurs reconnus.^{59, 70}

CYP1A2

Les séquences dans les régions codant pour les gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* sont identiques à 70%. Le niveau d'expression de CYP1A2 est considérable puisqu'elle représente 10-15% des CYP450s hépatiques totaux. Il faut toutefois noter que ces niveaux d'expression sont très variables (environ 40-fois de variation interindividuelle).⁵¹ Contrairement au CYP1A1, l'isoenzyme CYP1A2 n'a pas été retrouvée dans le tissu pulmonaire.⁶³ Cependant tout comme le CYP1A1, l'activité du CYP1A2 est induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques comme ceux retrouvés dans la fumée de cigarette, les viandes grillées sur charbon de bois, les produits d'incinération industrielle et certains légumes verts crucifères.^{51, 71, 72} Parmi les inhibiteurs du CYP1A2, on note entre autres la furafylline, la ciprofloxacine, la fluvoxamine et la naphthoflavone.^{73, 74} Plusieurs carcinogènes et de nombreux médicaments sont des substrats du CYP1A2 dont particulièrement, des amines aromatiques, des hydrocarbures polycycliques, des N-nitrosamines, la

caféine, des antipsychotiques atypiques incluant la clozapine et l'olanzapine, la théophylline et l'acétaminophène.^{71, 75-78}

CYP1B1

Tout comme le CYP1A1, l'expression de l'isoenzyme CYP1B1 est principalement extra-hépatique. Chez l'humain adulte, le CYP1B1 est retrouvé dans les reins, la rate, le thymus, la prostate, les poumons, les ovaires, l'utérus, les glandes mammaires, l'intestin grêle et le colon.⁵¹ Étant donné que le CYP1B1 catalyse la biotransformation ou encore la formation de carcinogènes, plusieurs des tissus mentionnés précédemment présentent un intérêt particulier puisque plusieurs de ces composés sont associés avec le développement de tumeurs dans ces tissus. Effectivement, l'activité de CYP1B1 est principalement caractérisée par sa capacité à activer une gamme variée de carcinogènes. Par exemple, une étude a rapporté que le dimethylbenzanthracène ne produisait pas de tumeurs chez les souris knockout pour le gène *CYP1B1*.⁷⁹ Une découverte intéressante fut celle montrant que le CYP1B1 humain participe efficacement à l'hydroxylation de la 17- β estradiol pour la transformer en 4-hydroxyestradiol. Il faut ajouter que les métabolites 4-hydroxyoestrogènes sont chimiquement plus réactifs et qu'ils sont considérés comme des candidats potentiels à la formation des tumeurs dépendantes des œstrogènes.^{80, 81} Le résévatrol, un polyphénol retrouvé dans le raisin rouge et pour lequel des propriétés anticancéreuses ont été proposées, est un inhibiteur non-compétitif de CYP1B1.⁸²

CYP2

Le CYP2 représente la plus grande famille des CYP450s chez l'humain comprenant près du tiers des séquences du CYP450. Cette famille est composée de 13 sous-familles dont 16 gènes fonctionnels sont dérivés (*CYP2A6, 2A7, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1, 2J2, 2R1, 2S1, 2U1 et 2W1*) et 13 pseudogènes ont été identifiés. Plusieurs des isoenzymes de la famille CYP2 ont été récemment identifiées et dont le rôle et la caractérisation de celles-ci sont encore préliminaires. Seules les isoenzymes bien caractérisées à ce jour et qui sont d'intérêt dans le métabolisme des médicaments seront abordées dans ce chapitre.

CYP2A6

Le CYP2A6 est principalement retrouvé dans le foie chez l'adulte et l'expression extra-hépatique de cette isoenzyme est minime, à l'exception de la région nasopharyngée.^{83, 84} Chez le fœtus, le niveau d'expression des CYP2As est particulièrement élevé dans la muqueuse olfactive comparativement au foie.⁸⁵ Les sites d'expression du CYP2A6 présentent un intérêt particulier en lien avec le risque associé à certains cancers. La réaction de la 7-hydroxylation coumarin est spécifique à l'activité du CYP2A6, alors que cette isoenzyme présente un chevauchement dans la sélectivité de certains composés dont particulièrement, l'oxydation de nitrosamines. De fait, le CYP2A6 est associé à la bioactivation de composés carcinogènes retrouvés dans le tabac. De plus, le CYP2A6 est également impliqué dans le métabolisme de la nicotine en cotinine ainsi que dans l'hydroxylation de cette dernière.⁸⁶⁻⁸⁸ Il faut noter qu'en catalysant la biotransformation de la nicotine, le CYP2A6 forme des précurseurs carcinogènes associés au cancer du poumon.⁸⁹ La contribution relative du CYP2A6 dans le métabolisme des médicaments est faible. Par contre, son implication est davantage située dans le métabolisme de composés chimiques, dans la formation de produits réactifs (par exemple le métabolite toxique de l'halothane) et dans la susceptibilité à développer des cancers.

CYP2B6

Chez l'humain, le *CYP2B6* est le seul gène identifié appartenant à la famille CYP2B. Chez l'humain, cette isoenzyme est majoritairement exprimée dans le foie bien qu'elle fut aussi détectée dans les poumons, le cerveau, l'intestin, la peau, les reins et l'endomètre.⁹⁰ Contrairement aux animaux rongeurs où la famille CYP2B est abondamment exprimée, le CYP2B6 compte pour seulement 1% du contenu des CYP450s hépatiques humains et ne dépasserait que rarement 5% et cela, même chez des individus recevant des inducteurs.^{51, 91} Il faut toutefois noter que son contenu hépatique varie considérablement (plus de 100-fois de variations).⁹⁰ Il a été estimé que le CYP2B6 serait impliqué dans ~3% des réactions métaboliques des médicaments.⁵¹ En particulier, la contribution du CYP2B6 apparaît importante pour le métabolisme du cyclophosphamide, du bupropion, de la kétamine, du propofol, de la S-méphénytoïne, de la méthadone, de l'antimalarique artémisine, de la sélégeline et de certains polluants environnementaux.^{71, 92, 93} Certains médicaments antirétroviraux contre le VIH sont métabolisés par le CYP2B6 et il a aussi été rapporté que certains agents peuvent induire l'activité de celle-ci dont le ritonavir.⁹⁴
⁹⁵ Parmi les inhibiteurs de cette isoenzyme, on note l'orphénadrine et la ticlopidine.⁹²

CYP2C; *CYP2C8*, *CYP2C9* et *CYP2C19*

Il existe quatre gènes appartenant à la sous-famille CYP2C incluant les *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C18* et *CYP2C19* lesquels présentent plus de 80% de similarité dans leurs séquences d'acides aminés.⁹⁶ Les CYP2Cs sont parmi les premiers CYP450s humains ayant été purifiés à partir de tissus humains.⁹⁷⁻⁹⁹ Les protéines codant pour les gènes de la sous-famille CYP2C comptent pour environ 20% des CYP450s hépatiques totaux.¹⁰⁰ Les CYP2Cs présentent plusieurs polymorphismes génétiques lesquels influencent la réponse aux médicaments. Des quatre membres de cette sous-famille, les *CYP2C8*, *CYP2C9* et *CYP2C19* sont les isoenzymes d'intérêt clinique. En fait, l'expression du *CYP2C18* apparaît surtout au niveau de la peau et des poumons mais est non significative au foie (au seuil de détection).⁵¹ Cette isoenzyme ne semble pas inhibée, ni induite comparativement à ses consœurs du CYP2C et étant donné son activité catalytique très limitée et faible, sa contribution au métabolisme des médicaments est considérée comme peu probable.⁵¹

CYP2C8

Alors que son expression apparaît substantiel au niveau du tissu rénal, les données indiquent qu'elle est relativement faible au niveau hépatique.⁵¹ En plus des reins, l'ARNm associé au gène du *CYP2C8* a aussi été détecté dans d'autres tissus extra-hépatiques dont le cerveau, l'utérus, les glandes mammaires, les ovaires, le duodénum et les glandes surrénales.¹⁰¹ Le *CYP2C8* a été rapporté comme étant hautement inductible dans les hépatocytes.^{102, 103} La réaction en importance caractérisant le *CYP2C8* est celle de l'hydroxylation du taxol (paclitaxel).¹⁰⁴ Parmi les autres substrats du *CYP2C8*, on note la rosiglitazone, la troglitazone, la pioglitazone, le répaglinide, la cérvastatine, le vérapamil et aussi, des substrats endogènes tels que l'acide rétinoïque et l'acide arachidonique.¹⁰⁵ D'ailleurs en 2001, la cérvastatine a été retirée du marché dû à des cas de rhabdomyolyses sévères et même mortelles. Suite aux analyses des cas d'effets indésirables avec la cérvastatine, des évidences d'interactions médicamenteuses significatives via le *CYP2C8* ont été soulevées. De fait, plusieurs des réactions indésirables avec la cérvastatine sont survenues en présence de gemfibrozil, un inhibiteur puissant du *CYP2C8*.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Le *CYP2C8* semble faiblement inhibé par les inhibiteurs puissants des CYP2Cs incluant le sulphafénazole.⁵¹ Brièvement, le *CYP2C8* joue un rôle important dans l'oxydation hépatique et rénale de substrats endogènes et son implication majeure en pharmacologie clinique semble aujourd'hui davantage reliée

au métabolisme de l'agent antinéoplasique (paclitaxel). (Pour les détails en lien avec les substrats endogènes et les CYP2Cs voir section 2.1.2).

CYP2C9

Les nombreuses observations suite aux études d'induction métabolique avec des barbituriques ont contribué à la caractérisation du CYP2C9. La protéine a été purifiée entre autres à l'aide de l'hydroxylation de la S-méphénytoïne de même qu'avec la tolbutamide.^{98, 109} Parmi les membres de la sous-famille CYP2C, le CYP2C9 est le plus hautement exprimé dans le tissu hépatique. Cette isoenzyme est probablement la seconde en importance en termes d'expression protéique hépatique après le CYP3A4. Le CYP2C9 est responsable du métabolisme de plusieurs médicaments incluant des anti-inflammatoires non-stéroïdiens, la warfarine, des sulfonamides, des antagonistes de récepteurs à l'angiotensine et la fluvastatine. Plusieurs de ces substrats ont été proposés à titre de substrat-marqueurs de l'activité du CYP2C9 dont le losartan, la tolbutamide, la warfarine et la phénytoïne.¹¹⁰⁻¹¹⁵ L'activité du CYP2C9 peut être inhibée par le sulfaphénazole, un inhibiteur puissant et relativement sélectif pour cette isoenzyme.

Le modèle pharmacophore associé au CYP2C9 a été largement étudié; les résultats obtenus en utilisant des coumarines à titre de marqueurs suggéraient la présence de deux sites dont l'un sert d'empilement pour les anneaux aromatiques et le second, est un site de liaison ionique pour les anions organiques. Il faut se rappeler que de nombreux substrats du CYP2C9 possèdent une charge anionique (substrats acides lipophiles).¹¹⁶⁻¹¹⁸

CYP2C19

Le CYP2C19 est en termes d'abondance, une isoenzyme relativement mineure où elle contribue pour moins de 5% des CYP450s hépatiques totaux. La réaction classiquement associée à l'activité du CYP2C19 est l'hydroxylation de la S-méphénytoïne. Le nombre de substrats dont le métabolisme est catalysé par le CYP2C19 est relativement restreint. Parmi les médicaments d'intérêt, on retrouve certains inhibiteurs des pompes à protons, principalement l'oméprazole, le citalopram et l'antimalarique, proguanil.¹⁰⁵ Également, le CYP2C19 est responsable du métabolisme de la thalidomide connue pour ses effets tératogènes.¹¹⁹

CYP2D6

La sous-famille CYP2D est constituée d'un seul membre chez l'humain, soit le CYP2D6. Bien qu'il ne représente qu'environ 2 à 5% du contenu total en CYP450s, le CYP2D6 est impliqué dans la biotransformation de ~25% des médicaments utilisés en clinique. Cette isoenzyme est principalement exprimée dans le foie mais elle est aussi retrouvée dans le cerveau, les poumons et le cœur.¹²⁰ De plus, le CYP2D6 est caractérisé par une variabilité interindividuelle et interethnique élevée qui s'explique principalement par la présence de polymorphismes génétiques (détails à la section 1.3.2). Le CYP2D6 intervient notamment dans le métabolisme de composés endogènes dont certains neurotransmetteurs. L'association entre la présence de CYP2D6 dans le cerveau et les divers produits agissant au niveau du système nerveux central dont leur biotransformation est dépendante de l'activité de cette isoenzyme suscite beaucoup d'intérêt.

Différentes études visant à caractériser la relation entre la structure du CYP2D6 et ses substrats ont observé que la plupart de ses substrats contenaient un atome d'azote basique situé à une distance de 5 à 7 Å du site d'oxydation.⁵¹ En fait, la fonction aminée sert de site de liaison avec l'enzyme et le site d'oxydation est constitué d'un noyau aromatique ou d'une zone hydrophobe sur lesquels les modifications sont réalisées. D'ailleurs, le CYP2D6 catalyse le métabolisme de nombreux médicaments avec une fonction aminée incluant des antidépresseurs tricycliques, des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, des analgésiques opiacés, des antipsychotiques, des antiarythmiques, des β -bloqueurs, des antihistaminiques de première génération, des dérivés des amphétamines, des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase et l'antitussif dextrométhorphan (<http://www.intermed-rx.ca>).¹⁰⁵ Parmi les inhibiteurs puissants de l'activité du CYP2D6, on retrouve la terbinafine et la quinidine. Les données de la littérature indiquent que cette isoenzyme ne serait pas sujette au phénomène d'induction. L'importance clinique de cette isoenzyme s'explique par la variabilité interindividuelle considérable qui la caractérise, sa contribution au métabolisme d'une panoplie de médicaments largement prescrits et les conséquences cliniquement significatives associées aux variations dans l'activité du CYP2D6.

CYP2E1

Chez l'humain, un seul membre de la sous-famille CYP2E a été caractérisé, soit le CYP2E1. Environ 7% du contenu en CYP450s hépatique est constitué de CYP2E1, cependant les niveaux d'expression peuvent varier considérablement d'un individu à

l'autre.¹²¹ Cette isoenzyme a aussi été détectée dans des tissus extra-hépatiques comme les poumons, l'œsophage, l'intestin grêle, le cerveau, le cœur et les lymphocytes.^{84, 121, 122} L'hydroxylation de la chloroxazone, un relaxant musculaire, est relativement spécifique au CYP2E1. Toutefois d'autres isoenzymes dont le CYP1A1, peuvent aussi catalyser cette réaction bien que leur activité catalytique soit excessivement faible.^{123, 124} Par conséquent, la chloroxazone est utilisée pour estimer l'activité hépatique du CYP2E1.¹²⁵ Cette isoenzyme présente un intérêt particulier en toxicologie, puisque l'acétaminophène ainsi que plusieurs composés hydrophobes de petits poids moléculaires pro-carcinogènes incluant des nitrosamines, le benzène, le styrène et des composés polyhalogénés sont métaboliquement activés par le CYP2E1.¹²⁶ Tout comme le CYP2A6, des anesthésiques halogénés (exemple ; halothane et isoflurane) sont souvent métabolisés via le CYP2E1.^{127, 128}

À l'origine, le CYP2E1 fut caractérisé comme une éthanol-oxydase. Le rôle du CYP2E1 dans le métabolisme de l'éthanol a été l'objet de maintes discussions. Il est maintenant bien démontré que l'alcool déshydrogénase représente l'enzyme majeure impliquée dans l'oxydation de l'alcool. Toutefois, le CYP2E1 peut contribuer au métabolisme de l'alcool en présence de concentrations élevée d'alcool ou chez des individus ayant des niveaux faibles de l'enzyme alcool déshydrogénase. Il a été suggéré que la transformation de l'éthanol en acétaldéhyde par le CYP2E1 aurait un rôle dans la toxicité associée avec l'alcool bien qu'il existe encore certaines controverses à ce sujet. Les études évaluant le phénotype du CYP2E1 en utilisant le chloroxazone à titre de substrat-marqueur ont montré plus de 5 fois de variation dans la clairance du médicament et plus de 50-fois de variation dans l'expression protéique du CYP2E1 suite à une exposition à l'alcool.^{129, 130} En plus de l'éthanol, plusieurs composés peuvent induire l'activité du CYP2E1 incluant l'isoniazide et certains solvants (exemple ; l'acétone, le benzène et le toluène) alors que le disulfiram a la capacité d'inhiber l'activité du CYP2E1. L'implication clinique du CYP2E1 réside donc dans le rôle de ce dernier dans l'oxydation de quelques médicaments, de l'alcool, le stress oxydatif (via la production de radicaux libres) et le risque de certains cancers.⁵¹

CYP2J2

Le CYP2J2 est une enzyme dont l'expression est majoritairement extra-hépatique comprenant le tractus gastro-intestinal, le cœur, l'endothélium vasculaire, les reins, les poumons et le pancréas. En plus d'être impliqué dans le métabolisme de

composés endogènes dont l'acide arachidonique, le CYP2J2 est aussi impliqué dans la biotransformation de certains médicaments et particulièrement, quelques antihistaminiques de seconde génération. D'ailleurs, le CYP2J2 serait l'isoforme prédominante dans l'hydroxylation intestinale de l'astémizole et de l'ébastine chez l'humain, ce qui suggère un rôle non négligeable de cette nouvelle isoenzyme dans l'effet du premier passage intestinal-hépatique pour les médicaments substrats de cette isoenzyme.^{131, 132} Les informations concernant cette isoenzyme sont davantage explicitées dans la section 2.1.2 (ii introduction).

CYP3

CYP3A ; CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 et CYP3A43

La famille CYP3 humaine est constituée d'une seule sous-famille, le CYP3A, laquelle regroupe quatre gènes ; *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* et *CYP3A43*. Les protéines dérivées des gènes *CYP3As* présentent un chevauchement dans la spécificité de leurs substrats mais démontrent des distinctions quant à leur expression tissulaire. En effet, le CYP3A4 est principalement exprimé dans le foie et l'intestin grêle, tandis que le CYP3A5 est sporadiquement retrouvé dans ces mêmes organes, mais il est communément associé à une expression extra-hépatique. Le CYP3A7 est principalement exprimé durant le développement foetal et finalement, le CYP3A43 pourrait être exprimé dans les testicules et la prostate.

Historiquement, la caractérisation de cette famille a débuté avec des études d'induction chez des animaux traités avec le phénobarbital. Dans les années soixante-dix, la purification et la caractérisation des CYP450s étaient limitées à deux formes connues de CYP450s; le CYP450 induit par le phénobarbital et le CYP448 induit par le 3-méthylcholantène. Dans les années quatre-vingt, il fut observé que la forme CYP450-phénobarbital était induite chez le rat suivant un traitement avec un stéroïde synthétique, la 16 α -carbonitrile prégnénolone.^{133, 134} Ensuite, certains chercheurs intéressés au métabolisme de la nifédipine dû à sa grande variabilité interindividuelle observée, ont isolé le CYP450 capable de catalyser l'oxydation de la nifédipine.^{135, 136} Ainsi, la famille CYP3A fut d'abord définie comme un CYP450-phénobarbital, ensuite décrite comme le CYP450-16 α -carbonitrile prégnénolone et puis nommée le CYP450-nifédipine oxydase.

CYP3A4

Il est bien accepté que le CYP3A4 constitue l'isoenzyme majeure des CYP450s impliqués dans le métabolisme des médicaments. L'importance pharmacologique de cette isoforme s'explique par son expression abondante dans les principaux organes responsables de l'élimination des médicaments et par le nombre considérable de médicaments qu'elle biotransforme.

Le CYP3A4 est l'isoenzyme la plus abondamment exprimée dans le foie et dans l'intestin grêle où elle représente 30% à 60% du contenu hépatique en CYP450s.¹³⁷⁻¹³⁹ La fraction du CYP3A4 dans l'intestin grêle serait encore plus élevée.¹⁴⁰ La présence de cette isoenzyme dans les hépatocytes et dans les entérocytes contribue de façon significative au métabolisme présystémique des médicaments, soit l'effet du premier passage intestinal-hépatique. Par conséquent, l'activité du CYP3A4 peut influencer significativement la biodisponibilité des médicaments administrés par voie orale et ainsi, affecter le profil d'efficacité et de toxicité de ces derniers. Par ailleurs, le CYP3A4 est aussi retrouvé dans d'autres organes comme l'estomac, l'œsophage et le colon où il est faiblement exprimé, représentant 4,3%, 2,5% et 1,5% comparativement à son expression hépatique.

Il est bien reconnu que le CYP3A4 peut métaboliser une grande variété d'agents pharmacologiques. D'ailleurs, l'isoenzyme CYP3A4 contribue au métabolisme de plus de 50% des médicaments couramment utilisés en clinique. Parmi ceux-ci on compte ; des antirétroviraux contre le VIH, des bloqueurs des canaux calciques, des statines, des antiarythmiques, des antihistaminiques de deuxième génération, des benzodiazépines, des antidépresseurs, des antipsychotiques, des analgésiques opioïdes, des immunosuppresseurs, des anticancéreux, des antagonistes sélectifs 5HT₃, des hormones, des modulateurs de la motilité gastrique et des agents pour le traitement de la dysfonction érectile. (<http://www.intermed-rx.ca>)

L'activité catalytique associée au CYP3A4 est hautement variable dans la population. Il est commun d'observer jusqu'à 40-fois (et même 90-fois) de variations dans l'expression de cette protéine entre les individus.^{139, 141-143} De plus, il a été remarqué que l'activité métabolique *in vivo* des substrats du CYP3A4 peut varier d'au moins 10 fois.¹²¹ Cependant, les mécanismes responsables de cette variabilité demeurent encore obscurs. Cette variabilité dans l'expression des CYP3As est en

somme le reflet complexe de plusieurs facteurs dont principalement, les facteurs environnementaux. De fait, il faut mentionner que les facteurs génétiques ne semblent pas influencer l'activité catalytique du CYP3A4. Bien qu'il existe des variants alléliques du CYP3A4, ceux-ci ne causent pas une distribution polymorphique de l'activité métabolique. Par ailleurs, l'induction transcriptionnelle de cette isoenzyme semble jouer un rôle important dans la variabilité interindividuelle observée pour cette isoenzyme. En effet, l'activité du CYP3A4 est corrélée avec le niveau d'expression d'ARNm indiquant que le contrôle transcriptionnel est un mécanisme majeur pour la régulation de l'expression du CYP3A4.¹⁴⁴

Plusieurs produits ont la capacité d'induire l'activité catalytique du CYP3A4 en augmentant son expression ; par exemple, la dexaméthasone, le rifampin, les barbituriques, la carbamazépine, la troglitazone, la primidone et le millepertuis sont tous des inducteurs connus du CYP3A4.¹⁰⁵ À l'inverse, certaines cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6) ont été associées à une régulation à la baisse des niveaux d'expression du CYP3A4.^{145, 146}

Une attention particulière est portée en clinique aux inhibitions de l'activité du CYP3A4 en raison des conséquences cliniques non-négligeables qu'elles peuvent engendrer. En effet, le CYP3A4 est impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses cliniquement significatives. Ceci s'explique par le fait que le CYP3A4 soit impliqué dans la biotransformation d'un nombre considérable et d'une large diversité de médicaments. De plus, le phénomène de la polypharmacie étant une réalité courante en clinique, le potentiel d'administration concomitante de médicaments influençant ou étant influencé par le CYP3A4 s'en trouve augmenté et conséquemment, la probabilité d'interactions médicamenteuses aussi.

Il faut noter que le CYP3A4 est la moins spécifique des isoenzymes du CYP450 en termes de spécificité des substrats qu'elle biotransforme. En plus de la gamme variée de substrats structurellement différents qu'elle métabolise, l'isoenzyme CYP3A4 catalyse un grand nombre de réactions diverses. Il a été proposé que cette versatilité métabolique soit expliquée par la présence d'un large site actif permettant la liaison du CYP3A4 avec des molécules de différentes tailles et de structures très variées. Il faut mentionner que la grande taille du site actif pourrait être en partie responsable du chevauchement dans la sélectivité des substrats entre les différentes isoenzymes de la sous-famille CYP3A. La structure «libre» (en absence de ligand) du CYP3A4 fut récemment décrite en 2004.^{147, 148} Un des points

importants caractérisant la structure du CYP3A4 est la présence d'une large zone hydrophobe au-dessus du site actif. Les résultats de plusieurs études suggéraient que deux ou trois molécules pouvaient se lier simultanément au site actif. Toutefois, le volume du site actif décrit originalement en absence de ligand par Williams *et al.* et Yano *et al.* était trop petit pour soutenir une telle possibilité, à moins que des changements de conformation aient lieu suivant la liaison d'un ligand.^{147, 148}

Différents modèles ont alors été proposés tentant d'expliquer la diversité des substrats que le CYP3A4 métabolise et les réactions cinétiques qualifiées comme non-conventionnelles (atypiques ou non-Michaelis-Menten) observées avec cette isoenzyme. L'un des modèles proposé est basé sur la présence de deux sites actifs distincts, l'un liant le substrat et l'autre liant un effecteur.^{149, 150} Dans ce modèle, seul le substrat a accès à l'oxygène.¹⁴⁹ D'autres modèles ont suggéré la présence d'au moins deux régions structurellement séparées responsables de l'orientation et de la liaison du substrat à l'intérieur du site actif dont l'une ou plusieurs de ces régions seraient pourvues d'une région hydrophobe qui pourrait recevoir des substrats démontrant une autoactivation.¹⁵¹ Également, un autre modèle propose qu'il y ait 1) un site actif comprenant deux sous-poches à l'intérieur du site actif qui peuvent lier les substrats et 2) une région pouvant accepter un effecteur.¹⁵² L'étude d'Ekroos et Sjören a montré que l'interaction CYP3A4-ligand peut entraîner des changements de conformation drastiques dépendamment des ligands et augmenter jusqu'à 80% le volume du site actif.¹⁵³ Leurs résultats ont montré que la capacité du CYP3A4 à accommoder de multiples ligands simultanément supporte la promiscuité structurelle des ligands puisque la forme du site actif et la distribution des charges peuvent être modulées par un second ligand. De fait, ils ont rapporté que deux molécules de kétoconazole pouvaient se lier au site actif causant un changement de conformation.¹⁵³ Ils ont aussi observé que le kétoconazole et l'érythromycine induisaient des changements structurels différents suggérant une flexibilité de la protéine CYP3A4 dépendante des ligands présents ce qui pourrait expliquer les divers phénomènes de coopérativité (homotropie et hétérotropie) (voir section 2.1.1 ; manuscrit #2 ; ii) introduction).

Un intérêt remarquable est porté à l'attention du CYP3A4 en clinique dû à son rôle dans le devenir des médicaments. Notamment, l'impact du CYP3A4 sur la biodisponibilité et les nombreuses interactions médicamenteuses potentielles et réelles impliquant le CYP3A4 mérite une attention particulière due aux conséquences non négligables qui peuvent en découler. En effet, tant des échecs

thérapeutiques que des effets indésirables dont plusieurs sont de sévérité importante ont été rapportés (par exemple ; la cyclosporine vs la toxicité rénale ou le rejet de greffon, la terfénaire vs les torsades de pointe, les statines vs les rhabdomyolyses, antirétroviraux contre le VIH vs augmentation de la charge virale, etc.).

CYP3A5

Les gènes *CYP3A4* et *CYP3A5* présentent une similarité supérieure à 85% dans leurs séquences d'acides aminés.⁵¹ L'expression du *CYP3A5* a été détectée dans les reins où elle représente l'isoenzyme prédominante, dans l'estomac, les poumons, la prostate, les glandes surrénales et plus faiblement, dans le foie et l'intestin grêle.¹⁵⁴⁻¹⁶⁰ Les travaux de Wrighton *et al.* suggéraient que l'isoenzyme *CYP3A5* contribuait dans une faible proportion au contenu hépatique total des *CYP3As*.¹⁶¹ Toutefois, l'étude de Kuehl *et al.* indique que le *CYP3A5* peut représenter plus de 50% des *CYP3As* chez certains individus lorsque ceux-ci expriment cette isoenzyme.¹⁴⁴ De fait, le point majeur caractérisant le *CYP3A5* est la présence de polymorphismes génétiques régissant son expression et sa distribution variable selon les ethnies. (voir les détails dans la section 1.3.2)

Les différences dans le niveau d'expression chez l'adulte comparativement au fœtus observées avec les *CYP3A4* et *CYP3A7* ne s'appliquent pas au *CYP3A5*.¹⁶² En effet, contrairement au *CYP3A4*, le *CYP3A5* est exprimé dans le foie du fœtus, toutefois son expression est toujours sous l'influence de polymorphismes génétiques.

Les diverses comparaisons quant à la sélectivité de l'activité du *CYP3A5* versus le *CYP3A4* ont toutes observées une similitude entre ces deux isoformes. L'étude réalisée par le laboratoire de Wrighton qui comparait l'activité catalytique des enzymes recombinantes *CYP3A4*, *CYP3A5* et *CYP3A7* envers différents substrats a montré qu'en général, le *CYP3A5* présente une activité comparable ou réduite au *CYP3A4*.¹⁶³ De plus, les inhibiteurs de l'activité du *CYP3A4* inhibent généralement aussi celle du *CYP3A5*. Bien que les mécanismes de régulation du gène *CYP3A5* apparaissent similaires à ceux du *CYP3A4*, la présence d'inducteurs cause souvent une augmentation modeste (parfois nulle) et inférieure à celle du *CYP3A4*.¹⁶⁴ Étant donné la similitude quant aux réactions catalysées par les *CYP3A4* et *CYP3A5*, les modèles structuraux proposés pour le *CYP3A4* sont probablement aussi valables pour le *CYP3A5*.⁵¹

Puisque ces deux isoenzymes, CYP3A4 et CYP3A5, possèdent une homologie dans la spécificité de leurs substrats, il demeure difficile de discerner leur contribution relative dans le métabolisme des substrats des CYP3As. Plusieurs substrats ont été évalués à titre de substrat-marqueur afin de tenter de distinguer l'activité du CYP3A4 et du CYP3A5. Parmi les nombreux marqueurs de l'activité des CYP3As étudiés et identifiés *in vitro*, leur validation *in vivo* fut plutôt décevante. Ceci s'explique principalement par trois aspects ; 1) plusieurs des substrat-marqueurs évalués sont biotransformés tant par CYP3A4 que par CYP3A5, 2) même si certains des métabolites formés présentent des caractéristiques de formation différentes *in vitro*, ceci demeure difficilement applicable *in vivo* et 3) des transporteurs comme la glycoprotéine-P, sont fréquemment co-exprimés dans les même cellules que les CYP3As et ceux-ci partagent un grand nombre de substrats et de modulateurs.

Il a été rapporté que le type de système enzymatique (par exemple ; les hépatocytes, les enzymes provenant de cellules lymphoblastiques ou les enzymes recombinantes) et les conditions expérimentales utilisés lors des études de métabolisme *in vitro* apparaissent influencer les activités catalytiques des CYP3A4 et CYP3A5. Les détails relatifs à ces facteurs seront élaborés dans la section 2.1.1 ; manuscrit #2. Il faut noter que la biotransformation par les CYP3A4 et CYP3A5 de certains médicaments, comme la vincristine et le tacrolimus, est plus efficace via le CYP3A5 que par le CYP3A4, ce qui suggère que le CYP3A5 pourrait contribuer significativement au métabolisme de certains médicaments chez les individus et les populations exprimant des quantités élevées de CYP3A5.

CYP3A7

Le CYP3A7 est l'isoenzyme hépatique prédominante chez le fœtus chez qui le CYP3A4 est absent. En plus du foie, cette isoenzyme est également présente dans d'autres tissus fœtaux dont les reins, les poumons et les surrénales. L'expression de CYP3A7 apparaît élevée durant les phases embryonnaire et fœtale et diminue rapidement dès les premières semaines de vie.^{162, 165} Plusieurs études arrivent à des conclusions similaires concernant la réduction majeure et même jusqu'à la disparition du CYP3A7 durant l'enfance.^{162, 165, 166} Le placenta ainsi que l'endomètre expriment l'isoenzyme CYP3A7. Il est intéressant de noter que les niveaux d'expression semblent varier selon le trimestre de la grossesse et la phase du cycle menstruel.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ Le mécanisme impliqué dans la répression de l'expression du gène *CYP3A7* est toutefois inconnu. Bien que cette isoenzyme ait été détectée

dans quelques foies adultes, elle est présente en très faibles quantités et possède une activité significativement réduite après la naissance.^{165, 169}

Le CYP3A7 possède généralement une activité catalytique similaire aux CYP3A4 et CYP3A5.^{170, 171} À l'inverse, l'étude comparative réalisée par Williams *et al.* concluait que l'activité catalytique du CYP3A7 était souvent plus faible que celle des CYP3A4 et CYP3A5 et cela, dans des conditions expérimentales semblables.¹⁶³ L'intérêt clinique de cette isoenzyme découle principalement de la contribution du CYP3A7 au le métabolisme des médicaments chez le fœtus. Par conséquent, les considérations en regard des interactions médicamenteuses avec les CYP3A4/5 devraient aussi être appliquées au fœtus durant la grossesse.⁵¹

CYP3A43

Le plus récent membre de la sous-famille CYP3A à avoir été caractérisé est le CYP3A43, étudié par le groupe de Domanski *et al.*¹⁷² L'ARNm associé au CYP3A43 est abondamment exprimé au niveau de la prostate et des testicules suggérant une implication possible dans le métabolisme des stéroïdes. Il a cependant été observé que les enzymes recombinantes du CYP3A43 possédaient une activité catalytique très faible envers la 6 β -hydroxylation de la testostérone.¹⁷² L'expression hépatique du CYP3A43 est excessivement faible ; les niveaux d'ARNm de CYP3A43 ne représentent que 0.1% du contenu hépatique du CYP3A4.⁵¹ Il existe peu de preuves que l'isoenzyme CYP3A43 contribue significativement au métabolisme des médicaments.

Conclusion

La réponse aux médicaments tant du point de vue des effets indésirables aux médicaments que des échecs thérapeutiques secondaire à un manque d'efficacité est extrêmement variable entre les individus . Si l'on exclut les erreurs d'indications, de posologie, d'utilisation et de «compliance» qui expliquent une partie de l'inefficacité et de la toxicité des médicaments, la variabilité observée dans la réponse aux médicaments peut être d'origine pathophysiologique, environnementale et/ou génétique. La pharmacogénétique est la discipline qui étudie la relation entre les mécanismes d'origine génétique et la réponse aux médicaments. La prochaine section portera sur la pharmacogénétique en lien avec les isoenzymes du CYP450.

1.3. PHAMACOGÉNÉTIQUE

1.3.1. HISTORIQUE & DÉFINITION

La pharmacogénétique est l'étude de l'influence du profil génétique sur la variabilité de la réponse à un traitement médicamenteux. La pharmacogénétique étudie les mécanismes d'origine génétique intervenant dans la réponse aux médicaments. La pharmacogénétique est un domaine de la pharmacologie caractérisé par un champ d'application personnalisé où la variabilité dans la structure génique de chaque patient est prise en considération soit durant le développement des médicaments ou encore lors de thérapie individualisée afin d'améliorer l'efficacité en augmentant le nombre de patients désignés comme étant de «bons répondeurs» ou de réduire le nombre de patients avec des réactions indésirables à la médication.

La discipline qu'est la pharmacogénétique, soit l'étude des variations héréditaires dans la réponse aux médicaments, est apparu dans les années 1950. L'une des premières observations quant à l'impact des variants génétiques dans la réponse aux médicaments concerne le risque de toxicité hémolytique associée au gène du glucose 6-phosphate déshydrogénase. En effet, lors de la Seconde Guerre Mondiale, environ 10% des soldats africain-américains ont présenté une hémolyse suite à l'administration d'agents anti-malariens comme la primaquine, alors que cette toxicité apparaissait chez un très faible pourcentage de soldats caucasiens.¹⁷³ Le second exemple de variation génétique causant une réponse anormale est celui décrit par Kalow et Staron rapportant un risque d'apnée prolongée avec la succinylcholine s'expliquant par une faible activité des pseudochoolinestérases héréditairement transmise.^{174, 175} Enfin, l'exemple probablement le plus connu de l'effet de la génétique dans la biotransformation des médicaments rapporté dans les années 50, est le polymorphisme de l'acétylation avec l'isoniazide utilisé pour le traitement des patients avec une tuberculose.^{176, 177}

En 1957, Motulsky fut le premier à conceptualiser et à proposer que l'hérédité peut expliquer des différences individuelles observées dans l'efficacité et la toxicité des médicaments.¹⁷⁸ Il souligne qu'à une exposition similaire aux médicaments, certains patients deviennent malades alors que d'autres ne sont pas affectés. Ainsi, il propose que les gènes déterminant l'activité enzymatique y soient impliqués. Le terme de pharmacogénétique a été défini et utilisé pour la première fois en 1959 par Friedrich Vogel.

La pharmacogénétique et la pharmacogénomique tentent de décrire et de définir l'influence des facteurs génétiques sur l'efficacité des médicaments et l'apparition des effets indésirables associés à ces derniers. Tandis que la pharmacogénétique est davantage orientée sur les conséquences cliniques d'une mutation ponctuelle d'un gène, la pharmacogénomique aurait un champ d'application plus étendue, c'est-à-dire qu'elle considère simultanément de nombreux gènes ainsi que leur interaction mutuelle.¹⁷⁹ La pharmacogénomique est en fait un reflet de l'évolution de la pharmacogénétique comprenant le spectre entier des gènes déterminant la réponse aux médicaments ce qui inclut l'évaluation de la diversité dans la séquence du génome et les conséquences cliniques.¹⁸⁰ Le terme de pharmacogénomique est relativement récent et est apparu dans la littérature vers 1998.¹⁸⁰ Il faut toutefois noter que cette distinction demeure bien arbitraire et que généralement ces termes sont utilisés de façon interchangeable.

Comme mentionné précédemment, plusieurs facteurs peuvent influencer la réponse aux médicaments incluant les facteurs environnementaux, les facteurs physiologiques, les facteurs pathologiques et les facteurs génétiques. Toutefois, il faut préciser que des polymorphismes associés à des gènes régissant la pharmacodynamie mais encore plus, ceux impliqués dans le processus pharmacocinétique seraient responsables d'environ 50% de la variabilité observée dans la réponse aux médicaments ([url : www.cypalleles.ref](http://www.cypalleles.ref)).¹⁸¹ Quoique de nombreux gènes interviennent dans les diverses étapes de la pharmacocinétique, soit de l'absorption à élimination des médicaments, le métabolisme constituerait - le processus le plus important influencé par des modifications génétiques. L'importance des variants alléliques dans les enzymes du métabolisme des médicaments pour expliquer les différences interindividuelles de concentration des médicaments et d'effet pharmacodynamique a été reconnue depuis une cinquantaine d'années déjà.^{174, 177, 182, 183} La majorité des polymorphismes génétiques influençant le métabolisme des médicaments cliniquement importants ont été découverts sur la base de différences phénotypiques dans la population.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ De plus, un fait intéressant à souligner est que la fréquence des polymorphismes pharmacogénétiques diffère selon les groupes ethniques.¹⁸⁷

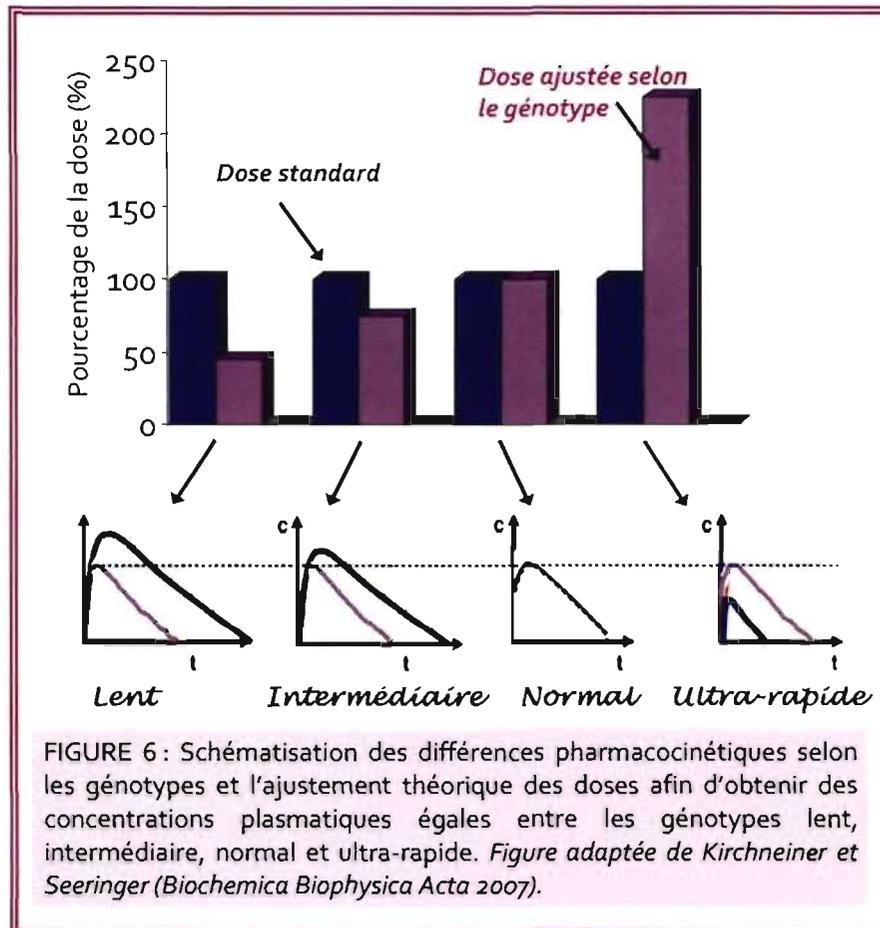
La diversité pharmacogénétique est représentée par différents types de changements (mutations) dans l'ADN dits polymorphismes causant une variabilité dans la réponse aux médicaments. Ces changements incluent entre autres les polymorphismes touchant un seul nucléotide, SNP, (SNP ; single-nucleotide

polymorphisme) qui constitue le polymorphisme le plus commun comprenant 80 à 90% de toutes les variations.¹⁸⁸ Un polymorphisme génétique est défini comme une différence génétique dite héréditaire qui survient dans la population à une fréquence supérieure à 1%.

La découverte de traits pharmacogénétiques peut s'effectuer selon deux stratégies nommées les stratégies pré-génomique et post-génomique. La première, stratégie pré-génomique (surtout utilisée avant les années 2000), a permis de découvrir à partir de réponses aberrantes aux médicaments ou de divers phénotypes sur le métabolisme des médicaments des patrons génétiques supportant ces variabilités. Cette stratégie catégorise d'abord les individus selon le phénotype et ensuite, les polymorphismes génétiques sont comparés dans les divers groupes de phénotypes. À l'inverse, la stratégie post-génétique, est une méthode basée sur le séquençage et une fois les mutations identifiées, les phénotypes sont comparés dans les différents groupes de génotypes.¹⁸⁹

Application :

Brièvement, la variabilité dans le métabolisme des médicaments due à des facteurs génétiques peut se refléter par des différences dans la clairance, la demi-vie d'élimination apparente et les concentrations plasmatiques maximales. Ces différences pharmacocinétiques peuvent être surmontées par un ajustement des doses basé sur le génotypage. La figure suivante schématise les différences pharmacocinétiques selon les différents génotypes et l'ajustement théorique des doses selon les groupes génotypiques ; faible, intermédiaire, normal et ultra-rapide pour obtenir des concentrations plasmatiques équivalentes.



La pharmacogénétique peut être utilisée avant d'initier un traitement afin d'ajuster les doses, de guider la stratégie thérapeutique mais aussi, elle peut expliquer des concentrations plasmatiques anormalement élevées ou faibles et ainsi, servir d'outil diagnostique afin d'expliquer des échecs thérapeutiques ou l'apparition d'effets indésirables. L'importance clinique des variants alléliques dépendra de la fréquence allélique mais aussi des caractéristiques du médicament et de ses dérivés.

Ce ne sont pas tous les médicaments qui bénéficieraient de l'utilisation de la pharmacogénétique dans l'optimisation d'une thérapie. Tel que décrit par Kirchneiner et Seeringer, l'utilisation de la pharmacogénétique dans l'ajustement des doses de médicaments présente certaines limitations. Le génotypage et les coûts associés ne seraient pas justifiés par exemple pour des médicaments qui possèdent un large profil thérapeutique et de sécurité.¹⁹⁰ Également, l'ajustement des doses basé sur la génétique serait peu utile pour les médicaments qui sont métabolisés par des voies d'élimination multiples. De plus, les auteurs soulignent l'importance de considérer la co-médication dans l'analyse et l'interprétation d'un

résultat de génotypage. Différents génotypes peuvent entraîner différentes réponses suivant la présence d'interactions médicamenteuses. Par exemple, l'activité enzymatique d'un métabolisateur lent ne sera pas (ou peu) augmentée ou réduite par un inducteur ou un inhibiteur de cette enzyme. Tandis que les métaboliseurs normaux ou ultra-rapides peuvent voir leur phénotype converti en métaboliseurs lents par l'ajout d'inhibiteurs. L'application de la pharmacogénétique dans l'ajustement des doses doit aussi considérer la présence de métabolites pharmacologiquement actifs. Effectivement, l'accumulation du produit mère ou du métabolite actif secondaire à des différences dans l'activité globale de l'enzyme peut affecter tant l'effet pharmacologique que le risque de toxicité.

Il faut noter qu'un nombre considérable de recherches est réalisé en pharmacogénomique afin d'identifier les mécanismes sous-jacents aux réactions indésirables aux médicaments. On compte qu'environ 4% des nouveaux médicaments sont retirés du marché dû aux effets indésirables.¹⁹¹ Durant la période s'échelonnant de 1995 à 2005, au moins 34 médicaments furent retirés du marché en raison de cas d'hépto- et de cardiotoxicité. On note parmi ceux-ci la néfazodone, la cérivastatine, le rofécoxib, le cisapride, la terfénadine et la troglitazone.¹⁹²

Également, le risque de développer certains types de cancer a été associé à des polymorphismes génétiques reliés à quelques-unes des enzymes du CYP450. Ceci pourrait être dû à une capacité moindre à inactiver des molécules exogènes ou endogènes mutagéniques/carcinogéniques ou à l'inverse, à une plus grande capacité à produire des procarcinogènes.¹⁹³

La pharmacogénomique suscite un intérêt majeur dans le traitement de la dépression (par exemple ; des inhibiteurs sélectifs de la sérotonine et des antidépresseurs tricycliques), de maladies cardiovasculaires (comme le métoprolol et le losartan), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), de certains cancers (Herceptin®), de l'éradication à H. Pylori (inhibiteurs des pompes à protons) mais particulièrement, avec l'anticoagulothérapie orale dont le chef de file est la warfarine. Les notions concernant la pharmacogénétique appliquée à la warfarine seront élaborées dans la section 2.2 de la thèse.

Les enzymes de phase I responsables du métabolisme des médicaments, principalement les CYP450s, catalysent la biotransformation de nombreux

médicaments et le rôle de polymorphismes génétiques relativement à des aberrations observées dans le métabolisme des médicaments qui est représenté par des phénotypes différents a été identifié pour certaines isoenzymes des CYP450s.¹⁸⁷

1.3.2. PHARMACOGÉNÉTIQUE & ISOENZYMES DES CYP450S

Certaines isoenzymes des CYP450s qui participent au métabolisme des médicaments présentent des variabilités interindividuelles tant dans leur niveau d'expression que dans leur activité catalytique. Cette variabilité peut-être occasionnée par des facteurs environnementaux ainsi que par des facteurs génétiques. Environ 40% du métabolisme des médicaments effectué par les CYP450s est réalisé par des isoenzymes polymorphiques. Une méta-analyse a rapporté que 59% des médicaments responsables d'effets indésirables sont métabolisés via des enzymes polymorphiques de phase I dont 86% de ces enzymes appartiennent à la famille des CYP450s.¹⁹⁴ Afin de différencier brièvement les isoformes dont le gène est polymorphe,, Ingelman-Sundberg a suggéré une classification qui divise les CYP450s en 3 groupes principaux ;1) les familles CYP5 à CYP51, enzymes qui sont principalement impliquées dans le métabolisme de composés endogènes, qui démontrent une affinité élevée pour leurs substrats, qui sont relativement bien conservées au cours de l'évolution et conséquemment, ces enzymes ne présentent pas ou très peu de polymorphisme génétique 2) les familles CYP1-2-3 sont des enzymes qui ont souvent une affinité moindre pour leurs substrats, qui se seraient moins bien conservées durant l'évolution et qui présentent des polymorphismes génétiques importants et finalement, 3) la famille CYP4 composée d'enzymes qui présentent des caractéristiques des deux classes précédentes.^{48, 194}

À l'exception des isoformes CYP1A1, CYP2E1 et CYP3A4 lesquelles se seraient bien conservées au cours de l'évolution, tous les autres gènes des CYP450s appartenant aux familles CYP1 à CYP3 sont polymorphes.⁴⁸ À l'inverse, seulement 6 des 20 isoenzymes impliquées de façon importante dans le métabolisme de composés endogènes présentent des différences génétiques. Ceci indique dans un premier temps que les gènes codant pour les isoformes catalysant le métabolisme de xénobiotiques sont le résultat d'un mécanisme d'adaptation à l'environnement et

deuxièmement, que la conservation des gènes associés aux CYP450s pourrait s'expliquer par l'importance majeure et même vitale de ces isoenzymes.⁴⁸

Les polymorphismes génétiques des isoenzymes des CYP450s affectent la pharmacocinétique des médicaments substrats pour ces isoenzymes. Ces différences dans le métabolisme et l'élimination du médicament peuvent exposer le patient à des concentrations très variables du médicament ce qui peut causer des différences dans la réponse pharmacologique mais également, dans l'apparition d'effets indésirables du médicament. La compréhension de la base moléculaire génétique expliquant les différences héréditaires dans le métabolisme des médicaments fut élucidée à la fin des années 1980 grâce au clonage et à la caractérisation du gène humain polymorphique (*CYP2D6*) qui encodait pour l'enzyme catalysant l'hydroxylation de la débrisoquine.¹⁹⁵ Depuis, plusieurs gènes associés aux CYP450s entraînant différents phénotypes ont été isolés, leur mécanisme a été caractérisé et leur impact clinique a été défini.

Les polymorphismes génétiques dans les enzymes du CYP450 peuvent causer des changements dans la capacité métabolique de ces dernières à métaboliser les médicaments. Basés sur leur capacité métabolique, quatre différents phénotypes peuvent être distingués ; métabolisateur lent, métabolisateur intermédiaire, métabolisateur normal et métabolisateur ultra-rapide.¹⁹⁰ Par conséquent, les individus dont le phénotype est associé à un métabolisateur lent ou intermédiaire présentent un risque augmenté de réactions indésirables aux médicaments dû à leur incapacité à métaboliser efficacement le médicament (à l'inverse, pour un pro-médicament, un phénotype lent sera associé à une perte d'efficacité due à l'incapacité de former le composé actif). D'un autre côté, les individus ayant un phénotype dit ultra-rapide sont plus à risque de présenter un échec thérapeutique ou encore des effets indésirables advenant la formation de métabolites toxiques.

CYP2

CYP2D6

Le polymorphisme génétique du CYP2D6 est le plus discuté dans la littérature, probablement en raison de ses répercussions cliniques et dû au fait qu'il fut le premier polymorphisme génétique des CYP450s découvert. L'existence de différents phénotypes pour le CYP2D6 a été observée pour la première fois à la fin des années soixante-dix par différents chercheurs qui ont montré la présence d'un

phénotype de métabolisateur lent pour le métabolisme de la débrisoquine et de la spartéine, deux substrats du CYP2D6. En effet, un phénotype caractérisé par une réponse hypotensive importante a été associé avec l'hydroxylation polymorphique de la débrisoquine, un antihypertenseur. Une association entre les concentrations plasmatiques élevées de débrisoquine et des ratios métaboliques urinaires très élevés (débrisoquine/4-hydroxydébrisoquine) a alors été rapportée.^{184, 196} Toutefois, ce n'est qu'en 1988 que le polymorphisme génétique sera identifié par le groupe de Gonzalez *et al.*¹⁹⁵

Du point de vue des polymorphismes génétiques reliés au métabolisme des médicaments, le CYP2D6 est probablement la plus importante des isoenzymes polymorphiques. Il est estimé que le polymorphisme génétique du CYP2D6 affecte significativement le métabolisme d'environ 50% de ses substrats.¹⁹⁷ D'ailleurs, la grande variabilité interindividuelle observée dans l'activité de cette isoenzyme est attribuée largement aux variations génétiques. À ce jour, plus de 70 différents variants du gène *CYP2D6* ont été identifiés et caractérisés. (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) Les variants du *CYP2D6* peuvent être classifiés selon leur impact sur l'activité enzymatique ; ainsi des allèles peuvent expliquer une absence d'activité ou que celle-ci soit diminuée, normale ou très augmentée.

Les variants génétiques causant une protéine non-fonctionnelle sont associés à un phénotype de métabolisateur lent. Parmi les variants les plus communs produisant une protéine non-active, on retrouve l'allèle *CYP2D6*5* (une délétion complète du gène), l'allèle *CYP2D6*4* (défaut d'épissage) et plus rarement, les allèles *CYP2D6*3* et *CYP2D6*6* (des changements d'acide aminé ou des insertions dans la région codante).¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Par ailleurs, un phénotype intermédiaire a été décrit en présence de variants génétiques qui réduisent l'affinité du substrat et entraînent l'instabilité de l'enzyme (*CYP2D6*10*) ou qui altèrent la spécificité du substrat et diminuent l'activité catalytique (*CYP2D6*17*).¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Une variation dans la région promotrice, *CYP2D6*41*, peut aussi entraîner un phénotype de métabolisateur intermédiaire secondairement à une diminution de l'expression de la protéine (défaut d'épissage).²⁰¹ Cet allèle, *CYP2D6*41*, est un variant de l'allèle *CYP2D6*2* ; celui-ci est une mutation causant une altération dans la structure du site actif ce qui crée, *in vitro*, une spécificité altérée pour les substrats. Le gène *CYP2D6* est sujet à de nombreuses variations relativement au nombre de copies. La duplication inclut tant les gènes fonctionnels, les gènes partiellement fonctionnels que les gènes non-

fonctionnels. La duplication et même, la multiduplication des gènes fonctionnels du CYP2D6 résultent en une activité enzymatique ultra-rapide (définie comme un phénotype de métabolisateur ultra-rapide). Plusieurs des nouveaux variants de duplication sont retrouvés auprès des africain-américains.¹⁹⁷ D'ailleurs, il est estimé que les quantités de métabolites formés peuvent être 10 à 30 fois plus élevées chez les métaboliseurs ultra-rapides. Conséquemment, il devient important de considérer la toxicité reliée aux métabolites.

Les allèles *CYP2D6* sont sujettes à des différences interethniques importantes ; les métaboliseurs lents sont principalement retrouvés en Europe tandis que les métaboliseurs ultra-rapides ont surtout été identifiés dans le nord de l'Afrique et en Océanie et finalement, les métaboliseurs intermédiaires sont localisés majoritairement en Asie où l'on retrouve une prévalence élevée de l'allèle *CYP2D6*10*.²⁰² Chez les caucasiens, le *CYP2D6*4* qui exhibe une fréquence allélique de 12 à 21%, est responsable de 70-90% des phénotypes de métaboliseurs lents.²⁰³ Chez les européen-caucasiens et leurs descendants, les allèles dites fonctionnelles sont généralement prédominantes et leur fréquence est estimée à ~71% alors que chez les asiatiques, les africains et les africains-américains, les allèles fonctionnelles représentent seulement 50% de la fréquence allélique du CYP2D6. Cependant, l'allèle *CYP2D6*5* (délétion du gène) est présente dans toutes les populations à une fréquence semblable d'environ 5%.

Sistonen *et al.* ont montré que le phénotype de métaboliseurs dits normaux (ou extensifs) est prédominant à travers les différentes populations avec une fréquence s'échelonnant de ~50-90%.²⁰⁴ Le second groupe métabolique le plus communément observé est les métaboliseurs ultra-rapides dont les fréquences sont évaluées à 40%, 26% et 8% en Afrique du Nord, en Océanie et en Amérique, respectivement.²⁰⁴

Le CYP2D6 présente un intérêt marqué en clinique puisqu'il est responsable du métabolisme de nombreux médicaments fréquemment prescrits et que son polymorphisme génétique peut avoir de grandes répercussions cliniquement significatives sur ses substrats. Le génotypage des allèles du *CYP2D6* déterminé tant prospectivement que rétrospectivement, permet d'expliquer de nombreux cas d'échecs thérapeutiques ou de réactions indésirables aux médicaments (par exemple, le manque d'efficacité avec des traitements antidépresseurs, un manque d'analgésie avec la codéine, des hypotensions avec des β -bloqueurs, etc.).

CYP2C19

Suite à la découverte du polymorphisme concernant la débrisoquine et la spartéine, un nouveau polymorphisme affectant cette fois-ci le métabolisme de l'anticonvulsivant méphénytoïne a été décrit par Kupfer *et al.*²⁰⁵ L'enzyme responsable de l'hydroxylation de la S-méphénytoïne est codée par le gène *CYP2C19* pour lequel il existe deux variants alléliques majeurs et cinq autres allèles mineurs rarement retrouvés. Les deux variants alléliques relativement communs sont associés avec une production de protéines tronquées. Tout comme pour le *CYP2D6*, les individus définis comme déficients en *CYP2C19* sont porteurs de deux variants alléliques. La diminution d'activité du *CYP2C19* apparaît plus commune auprès des orientaux que des européens. De fait, la fréquence de métaboliseurs lents du *CYP2C19* s'élève à plus de 5% dans les populations caucasiennes et africaines et à 20% chez les asiatiques.²⁰⁶ Les allèles *CYP2C19*2* et *CYP2C19*3* sont responsables de la majorité des allèles retrouvés chez les métaboliseurs lents ; chez les asiatiques, le *CYP2C19*3* est particulièrement présent.²⁰⁷ Le phénotype de métaboliseur lent semble bénéfique dans le traitement d'ulcères peptidiques/gastriques avec des inhibiteurs des pompes à protons. En effet, il a été observé que les individus avec une activité déficiente pour le *CYP2C19* présentaient un meilleur degré de guérison de leur ulcère et une meilleure réponse au traitement de reflux gastro-œsophagien que les patients avec un ou deux allèles normaux (*CYP2C19*1*).²⁰⁸⁻²¹¹ Ceci est expliqué par des concentrations plasmatiques plus élevées des inhibiteurs des pompes à protons chez les métaboliseurs lents.

CYP2C9

Il existe aussi une variabilité interindividuelle importante de l'activité du *CYP2C9* produisant des variations dans la réponse aux médicaments et dans l'apparition de réactions indésirables à ces médicaments. Le gène *CYP2C9* présente un polymorphisme génétique pour lequel plus de 30 variants alléliques ont été trouvés. Cependant, l'impact de plusieurs de ces variations génétiques n'est pas encore établi. Parmi ces divers allèles, le *CYP2C9*1* représente la séquence de référence et l'allèle sauvage. Le comportement polymorphique du *CYP2C9* est principalement déterminé par deux variants dans la région codante du gène; *CYP2C9*2* et *CYP2C9*3* lesquels produisent une enzyme avec une activité réduite. *In vitro*, les enzymes recombinantes *CYP2C9*2* et *CYP2C9*3* fonctionnellement défectueuses présentent une efficacité métabolique relative à l'allèle sauvage de 12% et 5%, respectivement.²¹²

Le *CYP2C9*2* semble pratiquement absent dans les populations de l'Asie de l'est (chinois, japonais et coréens), alors que chez les africains-américains, la fréquence allélique est estimée à 3,2%.²¹³ D'un autre côté, l'allèle *CYP2C9*2* est plus fréquent chez les hispaniques et les caucasiens où les fréquences s'élèvent à 12% et 8-19%, respectivement.²¹³ Tout comme pour le *CYP2C9*2*, l'allèle *CYP2C9*3* est faiblement retrouvé dans la population asiatique dont les fréquences sont de 1,1%, 2,2% et 3,3% chez les coréens, les japonais et les chinois, respectivement. La fréquence allélique du *CYP2C9*3* est variable auprès des caucasiens chez qui la fréquence s'étend entre 3,3 à 16,2%. Il est intéressant de noter que les allèles *CYP2C9*2* et *CYP2C9*3* n'ont pas été retrouvés dans la population inuit canadienne, ce qui est probablement expliqué par le fait que les Inuits du Canada ont des racines ancestrales asiatiques.²¹³

Pour plusieurs substrats du CYP2C9, des études menées auprès de patients et de volontaires sains homozygotes pour l'allèle *CYP2C9*3* ont révélées des différences de 5 à 10-fois dans les paramètres pharmacocinétiques.^{190, 197} Les individus hétérozygotes *CYP2C9*3* ont pour leur part une valeur de clairance orale équivalente à ~50% de celle des métaboliseurs normaux (*CYP2C9*1/*1*).¹⁹⁷ Par ailleurs, des effets significatifs ont aussi été rapporté avec l'allèle *CYP2C9*2*, mais seulement pour certains substrats dont la S-warfarine, l'acenocoumarol, la tolbutanamide et le célécoxib.^{214, 215} D'ailleurs, le célécoxib fut le premier médicament pour lequel une recommandation par la compagnie a été introduite dans la monographie indiquant une mise en garde lorsque ce médicament est administré à des métaboliseurs lents du CYP2C9. Il est possible que l'effet substrat-dépendant du polymorphisme *CYP2C9*2* puisse être expliqué par des différences d'affinité que présente cet allèle. En effet, des données *in vitro* révèlent que l'affinité du *CYP2C9*2* envers certains substrats varie comparativement à l'enzyme sauvage (wild-type) tandis que d'autres substrats ne sont pas affectés.²¹²

CYP2C8

Il a été montré qu'*in vitro* les variations du métabolisme des substrats du CYP2C8 et de son expression sont grandes. Toutefois, il demeure difficile d'estimer la variation *in vivo* reliée au CYP2C8 puisqu'il n'y a pas de test phénotypique standardisé pour évaluer l'activité de cette isoenzyme.²¹⁶ Le gène *CYP2C8* est relativement bien conservé et il ne semble pas avoir de variants importants modifiant la fonctionnalité de la protéine ou d'allèle nulle au sein de la population. De nombreux variants alléliques (SNPs) ont été décrits dans la région codante du gène *CYP2C8*. Ces

derniers présentent des variations interethniques importantes; l'allèle *CYP2C8*2* est principalement retrouvé chez les africains alors que les allèles *CYP2C8*3* et *CYP2C8*4* sont principalement retrouvés auprès des caucasiens.²¹⁷⁻²¹⁹ Les autres variants identifiés pour le gène *CYP2C8* sont extrêmement rares. Le *CYP2C8*3* est caractérisé par une substitution de deux acides aminés et des études *in vitro* ont démontré une activité réduite de l'isoenzyme représentée par une baisse du métabolisme du paclitaxel.^{220, 221} Cependant, il faut souligner qu'*in vivo*, les répercussions du *CYP2C8*3* sont incertains. Ainsi, l'importance clinique du polymorphisme associé au *CYP2C8* et ce, pour les différents variants, demeure encore obscure.

CYP2A6

Contrairement au *CYP2C8*, l'activité du *CYP2A6* est facilement estimable *in vitro* et *in vivo* en utilisant comme marqueur l'oxydation de la coumarine. L'activité du *CYP2A6* est caractérisée par une variabilité interindividuelle excessivement élevée où plus de 300-fois de variation a été rapportée.¹⁹⁷ De plus, il faut souligner que cette variation intersujet montre des différences interethniques importantes. Effectivement, moins de 1% des caucasiens sont des métaboliseurs lents du *CYP2A6*, alors que chez les asiatiques, la fréquence de métaboliseurs lents s'élève à 20%.¹⁹⁷ Plusieurs mutations entraînant des perturbations significatives dans la fonctionnalité du *CYP2A6* ont été identifiées dont les plus communes sont les allèles *CYP2A6*2* et *CYP2A6*4*. La fréquence allélique du *CYP2A6*4* est estimée entre 15 à 20% chez les orientaux, mais ce variant est plus rare chez les européens où la fréquence est de 3%. Les allèles *CYP2A6*2*, *CYP2A6*4*, *CYP2A6*5* et *CYP2A6*20* résultent en une perte de l'activité enzymatique alors que les allèles *CYP2A6*6*, *CYP2A6*7*, *CYP2A6*10*, *CYP2A6*11*, *CYP2A6*12*, *CYP2A6*17*, *CYP2A6*18* et *CYP2A6*19* produisent une enzyme dont l'activité est réduite.¹⁹⁷ Étant donné l'implication du *CYP2A6* dans le métabolisme de la nicotine, certains chercheurs se sont intéressés à la relation entre les variations génétiques du *CYP2A6*, la dépendance à la nicotine et le risque de développer un cancer relié au tabagisme. Les résultats de différentes études sont controversés. Plusieurs études dont celles réalisées par le groupe de Tyndale ont observé qu'une déficience du *CYP2A6* réduisait la prévalence de cancer chez les fumeurs et la propension de tabagisme.²²²⁻²²⁵ Par contre, d'autres études n'ont pu montrer aucune relation entre le tabagisme et le génotype *CYP2A6*.²²⁶⁻²²⁸ Le rôle du *CYP2A6* dans le tabagisme et le risque de cancer reste à être confirmé, bien que les données semblent plus probantes chez les asiatiques où les variants alléliques sont plus fréquents.

CYP2B6

Le CYP2B6 est parmi les isoenzymes les moins étudiées des CYP450s chez l'humain. Son rôle dans l'activation de la cyclophosphamide et dans le métabolisme de composés chimiques environnementaux a récemment été rapporté. Chez l'humain, le gène *CYP2B6* est hautement polymorphique dont plus de 100 variants alléliques (SNPs) ont été identifiés. Il représente l'un des gènes CYP450s les plus polymorphes chez l'humain. Plusieurs de ces polymorphismes sont très rares, alors que certains sont communs avec des fréquences alléliques pouvant atteindre 5 à 50% et ce, selon les ethnies.⁹⁰ Lang *et al.* furent les premiers à identifier neuf variants (SNPs) pour le gène *CYP2B6*, dans une population caucasienne dont cinq de ceux-ci entraînaient un changement d'acides aminés (K262R, Q172H, R487C, R22C et S259R).²²⁹ Puis, sept haplotypes alléliques distincts ont été définis (*CYP2B6**2 à *7 et *CYP2B6**9) lesquels sont basés sur ces cinq SNPs seul ou en combinaison.

Des diminutions de l'expression protéique et de l'activité de biotransformation de la S-méphénytoïne ont été observées chez les porteurs de variants *CYP2B6**5 et *CYP2B6**7.²²⁹ Tsuchiya *et al.* ont rapporté une augmentation des concentrations plasmatiques de l'efavirenz chez les individus *CYP2B6**6/*6.²³⁰ Une autre étude a également montré chez des patients atteints du HIV et recevant de l'efavirenz, une association entre le variant 516G>T (associé au *CYP2B6**6) et 1) une augmentation de l'aire sous la courbe de l'efavirenz, 2) des concentrations intracellulaires augmentées du médicament dans les cellules sanguines mononuclées périphériques et 3) un risque de toxicité au système nerveux central plus important avec l'efavirenz chez les individus homozygotes pour la mutation.²³¹ Par ailleurs, la clairance du bupropion diffère seulement en présence de l'allèle *CYP2B6**4, alors qu'aucun effet des variants *CYP2B6**1, *2, *5 et *6 n'a influencé la clairance de l'antidépresseur. Le métabolisme de la S-méthadone serait influencé par le génotype du CYP2B6 où les individus porteurs du *CYP2B6**6/*6 présentent des concentrations plasmatiques 2-fois plus élevées que le génotype non-muté.^{90, 232} Les auteurs mentionnent que ce polymorphisme aurait peu d'impact sur la réponse analgésique puisque que l'activation du récepteur opioïde est principalement liée à l'énantiomère R-méthadone. Cependant, l'énantiomère S-méthadone est plus puissant (eutomère) pour bloquer le canal potassique impliqué dans la repolarisation cardiaque.^{90, 232} D'ailleurs, des intervalles QT prolongés ont été observés chez les patients homozygotes pour l'allèle *CYP2B6**6. Ceci indique que ces individus pourraient être exposés à un risque accru d'arythmies cardiaques.²³³ Il

n'en demeure pas moins que les données concernant le CYP2B6, son polymorphisme génétique et les relations génotype-phénotypes sont récentes et controversées, ainsi d'autres études sont requises afin de caractériser clairement ses impacts cliniques.

CYP3

CYP3A4

Des variants dans la région promotrice (5'-untranslated region) ont été trouvés dont le plus commun étant la mutation *CYP3A4*1B*. La fréquence de ce variant est très variable selon les différentes ethnies avec une fréquence allélique de 0%, 4-10% et 48-80% pour les asiatiques (chinois, japonais et taïwanais), les caucasiens et les africain-américains, respectivement.²³⁴ Il existe des données contradictoires dont certaines suggèrent que ce promoteur serait associé à une légère augmentation de l'activité alors que d'autres études ne supportent pas ce postulat. De fait, des études ont rapporté qu'il n'existait aucune association entre la présence de *CYP3A4*1B* et une activité *in vivo* altérée pour différents substrat-marqueurs de l'activité du CYP3A4 (érythromycine, midazolam et dextrométhorphan).²³⁵⁻²³⁷ Cependant, d'autres études ont proposé que le variant *CYP3A4*1B* soit davantage lié à un risque possible de cancer qu'à une influence sur le métabolisme des médicaments.

Des variants du gène *CYP3A4* ont également été retrouvés dans la région codante. Plusieurs études ont conclu que le variant *CYP3A4*3* n'était pas différent de l'allèle sauvage (wild-type) concernant le métabolisme de divers substrats du CYP3A4 (testostérone, progestérone, nifédipine). Il en est de même pour les différents variants *CYP3A4*7*, *CYP3A4*9*, *CYP3A4*10* et *CYP3A4*19* pour lesquels leur expression et leur capacité à métaboliser étaient similaires à l'allèle de référence *CYP3A4*1* (wild-type). Plusieurs des variants ont été associés à une baisse d'activité catalytique *in vitro*. Par exemple, pour le *CYP3A4*16*, une diminution de 60% de l'hydroxylation de la testostérone, pour le *CYP3A4*17*, une baisse de 99% des valeurs de Vmax et du Km pour le métabolisme de la nifédipine, pour le *CYP3A4*12*, une augmentation de quatre fois la valeur du Km pour la formation du 1-hydroxymidazolam et finalement les *CYP3A4*11* et *CYP3A4*16*, les niveaux d'ARNm étaient semblables mais les niveaux protéiques étaient diminués comparativement à l'allèle sauvage.²³⁴ Ces résultats ont été déterminés à partir de cellules transfectées avec ces différents variants, des études *in vivo* sont donc

requis avant de conclure à l'influence possible d'un polymorphisme génétique du CYP3A4 dans la variabilité interindividuelle de la réponse aux médicaments métabolisés par cette isoenzyme. Trois variants (*CYP3A4*4*, *CYP3A4*5* et *CYP3A4*6*) retrouvés dans la population chinoise ont été évalués en utilisant le ratio urinaire 6-hydroxycortisol/cortisol.²³⁸ Il a été montré que le ratio était réduit en présence de ces variants, et la diminution du ratio la plus marquée était associée avec la présence de la mutation *CYP3A4*6*.²³⁸ Cependant, cette étude comprend plusieurs lacunes dont la qualité du substrat-marqueur utilisé, le manque de données concernant sa population de référence et surtout, aucun contrôle ni ajustement quant à la médication prise par les sujets au moment de l'étude. En général, on peut conclure que plusieurs de ces variants sont rares et qu'aucune mutation n'a encore démontré une influence clinique sur le métabolisme *in vivo* des médicaments CYP3As.

CYP3A5

À l'inverse du CYP3A4 dont les variants génétiques ne sont pas communs et pour lesquels l'importance fonctionnelle demeure limitée, l'expression du CYP3A5 est hautement variable et pourrait ainsi contribuer à la variabilité dans la réponse aux médicaments dont l'élimination est dépendante des CYP3As. La plupart des variants sont retrouvés dans la région codante du gène *CYP3A5*. Particulièrement, les allèles *CYP3A5*2*, *CYP3A5*4*, *CYP3A5*6*, *CYP3A5*7*, *CYP3A5*8*, *CYP3A5*9* et *CYP3A5*10* sont présents dans différents exons, tandis que les allèles *CYP3A5*3* et *CYP3A5*5* qui affectent l'épissage de l'ARNm sont retrouvés dans les régions introniques.

La principale raison expliquant l'expression variable du CYP3A5 hépatique est attribuée à l'allèle muté *CYP3A5*3*. Ce variant allélique crée un site d'épissage alternatif dans l'ARNm produisant un ARNm aberrant, cause l'apparition précoce d'un codon d'arrêt (*stop codon*) et résulte en une expression de faible à nulle de la protéine. Sa fréquence allélique varie selon les ethnies ; 70-95%, 71-85%, 65-75% et 20-35%, chez les caucasiens (français et européens), les japonais, les chinois et la population de race noire (africains et africain-américains), respectivement.^{144, 239-}

²⁴¹ Il est intéressant de remarquer que ce variant est plus prévalent que l'allèle sauvage, *CYP3A5*1*, dans la majorité des populations, à l'exception des africain-américains chez qui l'allèle sauvage est prédominant. De fait, la fréquence de l'allèle sauvage s'élève à 10-30% pour les caucasiens, 15% pour les japonais, 25-35% pour les chinois mais à 50% pour les africain-américains. Il fut observé que seuls les

individus avec au moins un allèle sauvage expriment des quantités importantes de l'enzyme au niveau du foie. Ainsi, on estime que le CYP3A5 est trouvé en quantité appréciable dans le foie chez 10 à 30% des caucasiens et des asiatiques. La présence du variant allélique *CYP3A5*3* a été associée à une diminution de la clairance de divers substrats des CYP3As incluant des statines (simvastatin, atorvastatin et lovastatin), des immunosuppresseurs (tacrolimus et cyclosporine) et le vérapamil.²⁴²⁻²⁴⁶

L'allèle *CYP3A5*6* fut identifié chez environ 13-16% des africains-américains et rarement retrouvé dans les populations caucasiennes (0-4%) ou asiatiques (0%).^{144, 239, 241} Le *CYP3A5*6* est un variant contenant un changement dans un exon entraînant la déletion de cet exon ; ainsi en générant un ARNm dans lequel l'exon est épissé, la délétion cause une protéine tronquée sans activité fonctionnelle. De façon semblable, l'incidence de l'allèle *CYP3A5*7* est nulle chez les caucasiens alors que la fréquence allélique est d'environ 10% chez les africains et les africain-américains.^{240, 241, 247-249} Ce variant est une mutation associée à une insertion d'une base dans un exon entraînant un déplacement dans la lecture de la région codante et un arrêt prématuré ce qui génère une enzyme inactive. Quant aux autres variants pour le gène *CYP3A5*, ils sont peu fréquents.

CYP1

CYP1A

Au moins treize variants alléliques sont maintenant connus pour le gène *CYP1A2*, dont 5 de ceux-ci résultent d'un changement de la séquence dans la région codante entraînant un changement d'acides aminés.⁵¹ Les travaux effectués dans le laboratoire du Dr Guengerich indiquent que ces variants affectaient généralement peu les paramètres cinétiques *in vitro* et cela, pour plusieurs substrats du CYP1A2 (moins de deux fois de variations).⁵¹ Actuellement, les données suggèrent que la variabilité interindividuelle dans le métabolisme des médicaments pour l'isoenzyme CYP1A2 ne soit pas d'origine génétique. Malgré l'absence de variants génétiques fonctionnels pour le CYP1A2, plusieurs études épidémiologiques suggèrent un lien possible entre certaines mutations et la susceptibilité à certaines maladies telles que divers cancers, l'infarctus du myocarde et la schizophrénie, bien qu'aucun consensus n'ait encore été atteint concernant ces hypothèses.

Conclusion

La pharmacogénétique tente de mieux expliquer comment la diversité génétique dans la population influence l'efficacité et le risque de toxicité aux médicaments. Les différences héréditaires dans les enzymes de métabolisme des médicaments sont généralement à trait monogénique et leur influence sur la pharmacocinétique de la médication dépendante de cette enzyme sera déterminée par l'importance de cette enzyme polymorphique dans l'activation ou l'inactivation de la molécule substrat de cette dernière. À l'opposé, l'effet pharmacologique global des médicaments est davantage associé à un trait polygénique qu'à un trait monogénique. Par conséquent, la réponse au médicament sera déterminée par l'interrelation de différents gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme, le devenir et les effets pharmacologiques de ce médicament. D'ailleurs, les résultats discordants qui sont parfois observés entre les différentes études de pharmacogénétique laissent suggérer la contribution possible de différents gènes. Toutefois, il faut préciser que plusieurs des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments présentent un polymorphisme génétique associé à des phénotypes différents dont l'impact clinique sera pertinent et significatif. Ainsi, le rôle de la pharmacogénétique dans la réponse aux médicaments sera en partie déterminé par le(s) voie(s) métabolique(s) qui régissent l'élimination de la molécule et l'isoenzyme majoritairement responsable de la biotransformation de celle-ci. Il est maintenant bien reconnu que les enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments dont principalement les CYP450s, possèdent un rôle important dans la variabilité interindividuelle observée dans la réponse aux médicaments.

La section suivante décrit (liste non exhaustive) des travaux de recherche réalisés au cours des mes études graduées. Tous les travaux présentés comportent une thématique commune en rapport au métabolisme des médicaments par différentes isoenzymes des CYP450s. La première section traite principalement de travaux de recherche fondamentale accomplis à l'aide de différentes approches *in vitro*. La seconde partie fait référence aux travaux effectués *in vivo* suite à la conduite d'une étude clinique. Ainsi, une stratégie translationnelle fut adaptée pour des projets qui abordent tantôt une approche mécanistique, tantôt une approche purement clinique.

SECTION 2: TRAVAUX DE RECHERCHE

TRAVAUX DE RECHERCHE

SECTION 2.1

**CARACTÉRISATION DU MÉTABOLISME DE SUBSTRATS
MARQUEURS DES CYP450s AU NIVEAU HÉPATIQUE ET
CARDIAQUE.**

TRAVAUX DE RECHERCHE

SECTION 2.1.1

CARACTÉRISATION DU MÉTABOLISME DE LA
DOMPÉRIDONE PAR LES CYP3As : RÔLE DES
ISOENZYMES CYP3A4 ET CYP3A5, RÔLE DU
CYTOCHROME B5 ET DÉTERMINATION DES
CARACTÉRISTIQUES D'INHIBITION PAR LA
CLARITHROMYCINE.

SECTION 2.1.1

ARTICLE #1

***An Improved HPLC Assay With Fluorescence
Detection For The Determination Of Domperidone
And Three Major Metabolites For Application To
In Vitro Drug Metabolism Studies.***

i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'objectif de la première partie du projet de recherche est la mise au point d'une méthode de chromatographie liquide à haute performance suffisamment sensible et spécifique permettant la détection et la quantification de la dompéridone et de ses métabolites à partir d'une matrice *in vitro*.

ii) INTRODUCTION

Les stratégies analytiques tant pour le monitoring thérapeutique des médicaments que pour les analyses pharmaceutiques lors des études de pharmacocinétique peuvent impliquer la quantification de produits et/ou de métabolites sur un vaste écart de concentrations allant du microgramme au picogramme. Les concentrations à mesurer sont en partie influencées par le type d'études (*in vitro* vs *in vivo*) et la matrice biologique (comme le plasma, l'urine, des tissus, des cellules...) utilisée pour fin d'analyse. D'une part, les propriétés physicochimiques et la structure chimique de la molécule influenceront la méthode analytique.²⁵⁰ D'autre part, la dose administrée, la biodisponibilité du produit et le profil pharmacocinétique du médicament gouverneront les concentrations du produit mère et/ou des métabolites présents. Ces facteurs détermineront la sensibilité et la spécificité requises pour la méthode analytique.²⁵⁰

Parmi les techniques analytiques les plus fréquemment utilisées dans les analyses pharmaceutiques, la chromatographie est au premier rang. La chromatographie est une technique de séparation des composés chimiques retrouvés dans une matrice qui repose sur les différences entre leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile afin de séparer les différents constituants d'un mélange. La chromatographie permet d'identifier qualitativement et quantitativement des substances. Il existe principalement deux types de variantes à la chromatographie, ainsi on peut distinguer la chromatographie en phase liquide et celle en phase gazeuse.

La chromatographie liquide à haute pression (HPLC) a été mise au point à la fin des années soixante par Huker et Hulsman. Bien qu'elle ait fait concurrence à la chromatographie en phase gazeuse, cette dernière demeure encore utilisée

aujourd'hui due à son seuil de détection souvent plus faible. Alors que la chromatographie en phase gazeuse possède une sensibilité et une efficacité de séparation supérieure à la chromatographie liquide, son utilisation est toutefois limitée par la volatilité et la stabilité thermique des molécules. Ainsi, on note un risque moindre de dégradation des échantillons avec la technique d'HPLC comparativement à la chromatographie en phase gazeuse puisqu'elle ne requiert pas une chaleur intense pour procéder à la chromatographie. L'arrivée d'une multitude de colonnes et de détecteurs variés permet le développement de méthodes HPLC davantage spécifiques et sensibles et cela, plus rapidement.

Au cours de mes études de maîtrise, nous avons caractérisé le métabolisme général de la dompéridone. Nous avons alors identifié que la dompéridone était principalement métabolisée via la famille des CYP3As. Afin de distinguer efficacement les différents métabolites formés dans les études de caractérisation du métabolisme spécifique de la dompéridone par les isoenzymes des CYP3As (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7), une mise au point de la méthode d'analyse était nécessaire. La méthode présentée ici fut basée sur une technique d'analyse disponible au laboratoire soit la chromatographie liquide à haute pression, HPLC. Ce type d'approche analytique est suffisamment sensible pour des analyses pharmacocinétiques *in vitro*.

iii) ARTICLE



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Chromatography B, 852 (2007) 611–616

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY B

www.elsevier.com/locate/chromb

An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to *in vitro* drug metabolism studies

Veronique Michaud^a, Chantal Simard^b, Jacques Turgeon^{a,*}

^a Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

^b Faculty of Pharmacy, University Laval, Ste-Foy, Quebec, Canada

Received 15 September 2006; accepted 19 February 2007

Available online 12 March 2007

**AN IMPROVED HPLC ASSAY WITH FLUORESCENCE DETECTION FOR THE DETERMINATION
OF DOMPERIDONE AND THREE MAJOR METABOLITES FOR APPLICATION TO IN VITRO DRUG
METABOLISM STUDIES.**

Veronique Michaud¹, B.Pharm., M.Sc, Chantal Simard², B.Pharm, Ph.D.,
and Jacques Turgeon¹, B.Pharm., Ph.D.

¹Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal. Quebec, Canada

²Faculty of Pharmacy, University Laval, Ste-Foy, Quebec, Canada

Correspondance: Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.

Faculté de pharmacie

Université de Montréal

C.P.6128, Succursale Centre-ville

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Sources of support that require acknowledgment:

Veronique Michaud is the recipient of a studentship from the Canadian Institutes of Health Research. The laboratory of Dr Jacques Turgeon is funded by the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

ABSTRACT

Domperidone is currently used in Canada and Europe for the treatment of intestinal motility disorders as well as for its antiemetic properties. Recent drug metabolism studies have indicated that domperidone is a substrate of different subtypes of CYP3A family and consequently, the drug requires complete characterization of its metabolism for the identification of major drug-drug interactions. Therefore, the purpose of our studies was to develop a simple, sensitive and rapid HPLC assay for the determination of domperidone and its major metabolites. This assay had to be suitable for the conduct of *in vitro* drug metabolism study with human liver microsomes. Baseline resolution of internal standard, domperidone and three of its major metabolites was achieved in a run time of less than 15 minutes using an Ultrasphere ODS column (250 mm x 4.6 mm x 5 μ M) and a mobile phase consisting of disodium citrate buffer (10 mM, pH 3.4):methanol:acetonitrile:triethylamine, 54.6:34.7:9.9:0.8 at a flow rate of 1.0 ml/min. Chromatographic separation was executed at room temperature. Quantification was performed by tandem fluorescence (excitation λ = 282 nm and emission λ = 328 nm) and ultraviolet detectors (λ = 254 nm for the quantification of encainide, internal standard). Calibration curves were constructed and showed linearity in the range of 0.1 to 20 μ mol/L and 10 to 250 μ mol/L. Intra- and interday coefficients of variation were less than 8% and 11%, respectively. Mean accuracy was $100.5 \pm 9.9\%$ and limit of quantification was established at 0.06 μ mol/L for domperidone and its metabolites. The assay allows estimation of enzymatic parameters (K_m and V_{max}) of domperidone for the formation of its various metabolites and sensitivity is sufficient for the conduct of inhibition studies with potent CYP3A inhibitors.

INTRODUCTION

Domperidone, 5-chloro-1-[1-[3-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)propyl]-4-piperidinyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one, is a selective antagonist of the D2 receptor with a chemical structure related to butyrophenone. The drug is principally used in Canada and European countries (not USA) for the treatment of motility disorders as well as for its antiemetic properties.^{1,2} Domperidone was for a long time a second choice to cisapride but the removal of the latter from the market has increased its clinical use.

Information on the metabolism of domperidone in humans has remained limited for years. At the beginning of the '80s, oral and intravenous administrations of the ¹⁴C-labelled compound to rats, dogs and human have led to the identification of three major metabolites formed following oxidative N-dealkylation and hydroxylations at two different sites.³ Further characterization of the metabolism of the drug by our group has allowed identification by LC-MS-MS of four isomers of ring hydroxylated metabolites.⁴ Finally, Ward et al. demonstrated that 5-hydroxydomperidone (labelled M3) was the major hydroxylated metabolite.⁵ They, as we did, identified M2 as the N-dealkylated major metabolite (Figure 1).^{4,5}

Recent drug metabolism studies performed have demonstrated that CYP3A4 is the most prominent member of the CYP3A-family which is involved in domperidone metabolism, with minor contribution of CYP1A2 and CYP2D6.^{4,5} The CYP3A family, the most abundantly expressed in human liver, is highly variable and contributes greatly to variation in oral bioavailability and systemic clearance of CYP3A substrates.^{6,7} It is the purpose of some studies conducted in our laboratory to characterize the metabolism of domperidone and evaluate the risk of drug-drug interactions with this drug. The overall objective of these studies is to further evaluate the risk of drug-induced Long QT Syndrome since electrophysiological studies have demonstrated that domperidone is a potent blocker of the rapid component of the delayed rectifier potassium current (I_{Kr} ; IC_{50} 162 nM).⁸

Several methods have been reported for the determination of domperidone in various matrices such as plasma, urine and milk.^{3,9,10} Some of these assays use ¹⁴C-labelled

drug and are very sensitive but they do not permit the determination of major metabolites of domperidone.^{3, 11-13} Other assays measure levels of domperidone by radio-immunoassay but antibodies raised in rabbits against domperidone are not commercially available and do not allow for the determination of domperidone metabolites.^{3, 11, 13, 14} The use of LC-MS and ESI-MS have been recently reported and could be adapted for the conduct of drug metabolism studies.^{5, 10, 15, 16} Unfortunately, the required equipments are not available in several laboratories. Finally, other previously reported HPLC assays with fluorescence/UV detection were either only partially described, required post-column derivatization or lacked resolution required for the quantification of all identified metabolites.^{5, 9, 17}

Therefore, the objective of our study was to develop a simple and sensitive HPLC assay, using non-radioactive materials, and allowing for the determination of domperidone and at least three of its major metabolites formed by human liver microsomes. The method is based on a previously described HPLC assay by the group of Yamamoto *et al.* and employs reversed-phase chromatography (HPLC) with fluorescence and ultraviolet detection.¹⁷

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Domperidone (analytical grade) was purchased from Janssen Pharmaceutica N.V. (Beerse, Belgium). Encainide hydrochloride (analytical grade), used as the internal standard, was provided by Bristol-Myers Pharmaceutical research and development division (Wallingford, CT, USA). Acetonitrile and methanol were purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). Dimethylsulfoxamide (DMSO) and triethylamine were obtained from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Other chemicals used were of highest qualities commercially available. Metabolites of domperidone were generated following the incubation of the parent drug with human liver microsomes. Reaction cofactors (NADP⁺, D-glucose 6-phosphate and glucose 6-phosphate dehydrogenase) were obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Human liver microsomes were purchased from Human Biologics International (Scottsdale, AZ, USA).

Standard solutions

A stock solution of domperidone was prepared by dissolving 29.8 mg of the drug in 1 mL of DMSO (70 mM). Dilutions were performed by using various volumes of this stock solution added to DMSO to create secondary stock solutions with final concentrations varying from 0.01 to 50 mM. Stock solutions of internal standard, encainide hydrochloride, were prepared in distilled water to final concentrations of 129 $\mu\text{mol/L}$ or 257 $\mu\text{mol/L}$. The stock and working solutions were stored at -20°C and the incubations mixtures containing metabolites of domperidone were stored at -80°C .

Apparatus

The chromatographic HPLC system (Thermo Separation products, Fremont, CA) consisted of a SpectraSystem P4000 pump, a SpectraSystem AS3000 autosampler, a model FL3000 fluorescence detector, a SpectraSystem UV3000 ultraviolet detector and a model PC1000 System Software. Chromatographic separation of domperidone and its major metabolites was performed at room temperature on an Ultrasphere ODS column (250 mm x 4.6 mm x 5 μM ; Beckman Coulter, Fullerton, CA) using a mobile phase containing disodium citrate buffer (10 mM, pH 3.4):methanol:acetonitrile:triethylamine, 54.6:34.7:9.9:0.8 at a flow rate of 1.0 mL/min. Eluent was monitored with fluorescence detection (excitation $\lambda = 282$ nm and emission $\lambda = 328$ nm) and by ultraviolet absorbance at $\lambda = 254$ nm (quantification of encainide, internal standard).

Incubations

The incubation mixture (final volume, 500 μL) consisted of 20 μL human liver microsomes, 375 μL phosphate buffer 50 mM (pH 7.4), 100 μL NADPH-regenerating system solution and 5 μL substrate (domperidone dissolved in DMSO; 1% final reaction volume). Incubations containing microsomes, buffer and NADPH-regenerating system solution were pre-incubated at 37°C for 8 minutes. Reactions were initiated by the addition of the substrate to the incubation mixture. After 45 minutes, enzymatic process was stopped by adding 500 μL of ice-cold acetonitrile. Encainide was added as the internal standard. The incubation mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes. The supernatant, 10 to 30 μL , was injected onto the HPLC system and major metabolites of domperidone were monitored.

Standard Curve

Calibration curves based on the area under the peak of domperidone to internal standard were constructed using 8 different concentrations in duplicate. Aliquot (5 μL) of the secondary stock solutions were added to incubation mixtures (final volume 500 μL) to obtain a range of domperidone concentrations varying between 0.1 $\mu\text{mol/L}$ and 250 $\mu\text{mol/L}$. The internal standard, encainide hydrochloride was added (30 μL) to final concentrations of 7.3 or 14.5 $\mu\text{mol/L}$. To improve precision, two calibration curves were constructed: the first one covered the range of 0.1 to 20 $\mu\text{mol/L}$ while the second covered the range of 10 to 250 $\mu\text{mol/L}$. In the lower range, final concentration of the internal standard was fixed at 7.3 $\mu\text{mol/L}$ while a final concentration of 14.5 $\mu\text{mol/L}$ was used for the curve in the highest range. The data were then subjected to linear regression analysis to give the appropriate calibration factor.

Frozen standards of secondary stock solutions (-20°C), frozen samples from standard curves (-80°C) and finally frozen incubation mixtures (-80°C) were reanalyzed periodically to confirm stability of the compounds and reproducibility of the assay.

Pure drug substance for the metabolites of domperidone was not available. Hence, the standard curve constructed for the parent compound were used and applied to the peak area of the metabolites. The degree of fluorescence emission for these compounds relative to domperidone was assumed to be equal to 1.

Precision

Intraday variability in the analysis of domperidone and its metabolites was assessed by the repeated analysis ($n=6$) of fixed volumes of incubations performed with domperidone (2.5, 5, 20, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$). The range of concentrations analyzed varied between 0.1 to 72 $\mu\text{mol/L}$. This range of concentrations corresponded to 42.6 ng/mL to 30.7 $\mu\text{g/mL}$ for domperidone (molecular weigh of 425.9g), 44.2 ng/mL to 31.8 $\mu\text{g/mL}$ for hydroxylated metabolites (M1 and M3; molecular weigh of 441.9g) and 25.2 ng/mL to 18.1 $\mu\text{g/mL}$ for the N-dealkylated metabolite (M2, molecular weigh of 252 g). Interday precision was determined by repeated analysis of similar samples for domperidone and its metabolites (0.1 to 72 $\mu\text{mol/L}$) generated from incubation mixtures

on 5 consecutive days. The precision was calculated as percent coefficient of variation (CV):

$$CV = \text{Standard Deviation} \times 100 / \text{mean of repeated measurements.}$$

RESULTS

Description of assay improvements.

Yamamoto et al. described in 1998 a quantitative HPLC assay for the determination of domperidone in plasma.¹⁷ This assay that uses fluorescence detection exhibited high sensitivity with a detection limit of 1 ng/ml (2.37 nmol/L) for domperidone in plasma. However, this assay did not allow for the quantification of the metabolites of domperidone.

In order to do so, we decided to modify the mobile phase by adding acetonitrile and by increasing the proportion of the disodium citrate buffer. Various ranges of pH were also assessed: a decrease in the pH of the mobile phase was found to be associated with shorter retention times and an improvement in peak resolution. Finally, sharper peaks and baseline resolution were obtained by the addition of the ion-pairing agent triethylamine. We also had to change the internal standard to prevent interference with some of domperidone metabolites. Consequently, tandem fluorescence and UV detection were used for the determination of the new internal standard namely, encainide. The liquid-liquid extraction procedure was eliminated and proteins were precipitated by the addition of acetonitrile

Chromatographic analysis

A typical chromatogram of domperidone and its major metabolites detected in incubations performed with human liver microsomes is shown in Figure 2a. Retention times were 4.2, 4.7, 5.1, 5.7, 6.5 and 12.1 minutes for a hydroxylated metabolite (M1), a N-dealkylated metabolite (M2), a minor hydroxylated metabolite (M4), a major metabolite (5-hydroxydomperidone, M3), internal standard (encainide) and domperidone, respectively. Eluting fractions corresponding to these compounds were collected and reanalysed by LC-MS-MS.⁴ Results obtained were compared to data

published by Ward et al. and by Meulderman et al. and identification of the various metabolites was reported in Simard et al.³⁻⁵ As can be noted, our HPLC assay allowed for the detection and separation of four oxidative metabolites of domperidone. Quantification was however feasible only for the three major metabolites using a signal to noise ratio of 5. Even though levels of the minor metabolite (M4) were too low for quantification, complete separation was sought for in order to prevent over-estimation of other nearby metabolites. Complete base peak resolution for all metabolites, internal standard and domperidone was achieved with conditions used. A typical chromatogram obtained from a blank and control incubation is shown in Figure 2b.

Linearity and Sensitivity

Equations determined by linear regression analyses used to determine concentrations of domperidone and its major metabolites were: $y=0,383x + 0,018$ in the range of 0.1 to 20 $\mu\text{mol/L}$ ($r^2 = 0.996$; $p<0.05$), and $y=0,195x + 0,104$ in the range of 10 to 250 $\mu\text{mol/L}$ ($r^2 = 0.989$; $p<0.05$). Mean accuracy values were $102.7 \pm 11.2\%$ and $98.1\% \pm 8.1\%$ for low and high standard curves, respectively (Table I). Detection limit was 0.06 $\mu\text{mol/L}$ for domperidone and its major metabolites. Intraday and interday coefficients of variation were less than 8% and 11%, respectively (Table II).

Application to in vitro drug metabolism studies

Our improved HPLC method was applied to the study of the metabolism of domperidone in human liver microsomes. The sensitivity observed with our method using fluorescence detection was sufficient to allow detection of all major metabolites of domperidone. The sensitivity was also sufficient for the determination of enzymatic parameters related to the formation of these metabolites (K_m and V_{max}) and allowed the conduct of inhibition studies. For example, incubations conducted with human liver microsomes in the presence of inhibitors such as imidazole drugs indicated that formation rate of domperidone metabolites was decreased by ~80%. (Figure 3)

DISCUSSION

We have described herein an improved HPLC based on the previously reported assay by Yamamoto *et al.* for the determination of domperidone in plasma (Table III).¹⁷ Mobile phase was redefined to allow for the determination of domperidone and three of its major metabolites formed during *in vitro* drug metabolism studies. The resulting assay is rapid, simple and reproducible and allows separation of domperidone and four major metabolites with a run time of less than 15 minutes.

Several assays were considered prior to the conduct of our *in vitro* drug metabolism studies with domperidone. Sensitivity (studies performed with limited amounts of human liver microsomes) and specificity (determination of four major metabolites of domperidone) were required characteristics of the selected assay. LC-MS and ESI-MS could have been appropriate but the required equipments were not readily available to us.^{5, 10, 15} We have also considered a radioimmunoassay procedure using antibodies raised against domperidone that was described for the quantification of domperidone in plasma. Although this assay would have provided enough sensitivity, it was known that hydroxylated metabolites of domperidone show cross-reactivity with the parent compound.^{3, 11, 13, 14} We also considered the HPLC assay by Meuldermans *et al.* for domperidone and its metabolites.³ Unfortunately, the mobile phase also had to be modified because of interfering peaks with the metabolites and sensitivity was not sufficient enough due to UV detection.³ Several studies have been developed using ¹⁴C-labelled domperidone.^{3, 11-13} HPLC chromatography coupled with liquid scintillation spectrometry does not offer great peak separation or requires very long time run. Some metabolites may also be missed depending on the labelling site of the parent drug.

Kobylnska *et al.* described a quantitative HPLC assay for the determination of domperidone in plasma using fluorescence detection.⁹ Detection limit for domperidone was also 1 ng/mL (2.37 nmol/L) but required a post-column photoreactor. Post-column derivatization is generally associated with a decrease in peak resolution which would have prevented base peak resolution of the four metabolites of domperidone or would have required longer run time.

Our assay suffers from an important limitation. Indeed, none of the pure substances of the metabolites of domperidone were available for the conduct of our experiments. For quantitative purposes, we therefore had to use standard curves constructed for domperidone and applied them to metabolites. The risk for potential error was limited by the fact that elution times and characteristics of domperidone and its metabolites were very similar. Retention times varied only from 4.2 to 12.1 minutes for all 5 compounds. Peaks were all very symmetrical and no tailing was observed. The ratio of peak width at half peak height over retention time was 0.35 for M1 (retention time 4.2 min), 0.32 for N-dealkylated domperidone (M2, 4.7 min), 0.29 for a minor hydroxylated metabolite (M4, 5.1 min), 0.35 for 5-hydroxydomperidone (M3, 5.7 min) and 0.33 for domperidone. To estimate the potential error, we analysed several incubation mixtures with various concentrations of domperidone (as substrate) and its metabolites and we compared it to respective control incubations at the same concentrations of domperidone. We could demonstrate that the sum of the area under the curve of the peak of each metabolite added to that of domperidone (AUC of domperidone plus AUCs of its metabolites) in incubations mixtures was similar to AUC of corresponding control incubations. Different concentrations were analysed and various incubations were performed with different enzymatic sources (human liver microsomes, mouse liver microsomes, Supersomes) to evaluate relative peak intensities of metabolites. Results obtained converged and suggested that fluorescence coefficients of domperidone and its metabolites are similar.

CONCLUSION

In summary, the herein described assay is the first HPLC method that permits determination of domperidone and three of its major metabolites in *in vitro* incubation mixtures. This HPLC method is simple, specific and reproducible, requires minimal sample preparation and is suitable for the conduct of *in vitro* drug-drug interaction studies.

REFERENCES

1. Barone JA. Domperidone: a peripherally acting dopamine₂-receptor antagonist. *Ann Pharmacother.* Apr 1999;33(4):429-440.
2. Brogden RN, Carmine AA, Heel RC, et al. Domperidone. A review of its pharmacological activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy in the symptomatic treatment of chronic dyspepsia and as an antiemetic. *Drugs.* Nov 1982;24(5):360-400.
3. Meuldermans W, Hurkmans R, Swysen E, et al. On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man III. Comparative study on the excretion and metabolism of domperidone in rats, dogs and man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1981;6(1):49-60.
4. Simard C, Michaud V, Gibbs B, et al. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of domperidone. *Xenobiotica.* Nov-Dec 2004;34(11-12):1013-1023.
5. Ward BA, Morocho A, Kandil A, et al. Characterization of human cytochrome P450 enzymes catalyzing domperidone N-dealkylation and hydroxylation in vitro. *Br J Clin Pharmacol.* Sep 2004;58(3):277-287.
6. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul 1994;270(1):414-423.
7. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* Apr 2001;27(4):383-391.
8. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, et al. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation.* Oct 17 2000;102(16):1883-1885.
9. Kobylinska M, Kobylinska K. High-performance liquid chromatographic analysis for the determination of domperidone in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* Jul 7 2000;744(1):207-212.
10. Zavitsanos AP, MacDonald C, Bassoo E, et al. Determination of domperidone in human serum and human breast milk by high-performance liquid

- chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* Jun 25 1999;730(1):9-24.
11. Heykants J, Knaeps A, Meuldermans W, et al. On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. I. Plasma levels of domperidone in rats and dogs. Age related absorption and passage through the blood brain barrier in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1981;6(1):27-36.
 12. Heykants J, Hendriks R, Meuldermans W, et al. On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. IV. The pharmacokinetics of intravenous domperidone and its bioavailability in man following intramuscular, oral and rectal administration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1981;6(1):61-70.
 13. Michiels M, Hendriks R, Heykants J. On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man II. Tissue distribution, placental and milk transfer of domperidone in the Wistar rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1981;6(1):37-48.
 14. Huang YC, Colaizzi JL, Bierman RH, et al. Pharmacokinetics and dose proportionality of domperidone in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* Nov-Dec 1986;26(8):628-632.
 15. Wu MS, Gao L, Cai XH, et al. Determination of domperidone in human plasma by LC-MS and its pharmacokinetics in healthy Chinese volunteers. *Acta Pharmacol Sin.* Mar 2002;23(3):285-288.
 16. Smit MJ, Sutherland FC, Hundt HK, et al. Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of domperidone in human plasma. *J Chromatogr A.* Mar 8 2002;949(1-2):65-70.
 17. Yamamoto K, Hagino M, Kotaki H, et al. Quantitative determination of domperidone in rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* Dec 11 1998;720(1-2):251-255.

TABLE I

Accuracy and precision associated with the quantification of domperidone in standard curves.

<u>Domperidone (duplicate)</u>		
Spiked concentration (nmol/mL)	Observed Concentration (nmol/mL)	Accuracy (%)
Low concentration curve		
0.1	0.13	128.2
0.25	0.24	97.1
0.5	0.49	97.8
1	1.0	100.9
2.5	2.3	92.7
5	4.8	96.7
10	10.9	109.3
20	19.6	98.0
High concentration curve		
10	9.2	92.3
20	19.3	96.6
30	28.3	94.2
50	47.5	94.9
75	71.9	95.8
100	106.6	106.6
150	149.2	99.5
250	247.3	98.9

TABLE II

Reproducibility of domperidone analysis.

a) **Intraday coefficients of variation (n=6)**

METABOLITE 1		METABOLITE 2		METABOLITE 3		DOMPERIDONE	
Concentrations ($\mu\text{mol/L}$)	Coefficient of variation (%)						
0.3	6.6	0.1	7.4	1.5	2.1	0.6	2.0
0.5	6.1	0.3	5.1	2.5	1.6	1.7	1.0
1.7	1.4	1.0	4.9	7.9	1.3	9.4	1.3
3.5	2.6	2.3	1.4	12.5	2.4	31.7	0.7
6.4	1.7	4.8	2.9	16.4	2.6	71.5	0.4

b) Interday coefficients of variation (n=3)

METABOLITE 1		METABOLITE 2		METABOLITE 3		DOMPERIDONE	
Concentrations ($\mu\text{mol/L}$)	Coefficient of variation (%)						
0.3	10.8	0.14	10.5	1.5	6.1	0.6	8.8
0.5	6.1	0.3	7.2	2.5	4.9	1.7	7.8
1.7	2.9	1.0	8.4	7.9	5.6	9.4	5.8
3.5	2.9	2.3	8.0	12.5	6.1	31.7	7.7
6.4	9.1	4.8	8.8	16.4	7.5	71.5	8.0

TABLE III

Comparison of the herein described and previously reported assays for domperidone.

	YAMAMOTO et al.	KOBYLINSKA et al.	WARD et al.	MICHAUD et al.
Accuracy	<110%	94-105.6%	ND	100.5±9.9%
Intra-day variability	5%	<10%	ND	<8%
Inter-day variability	ND	<10%	ND	<11%
LOQ	1 ng/mL	1 ng/mL	ND	0.06 µmol/L (25 ng/mL)
Sample preparation	Liquid-liquid extraction.	Solid-phase extraction using nitrile SPE cartridges.	No extraction required.	No extraction required.
Analysis time	Total analysis time of 8.6 min for domperidone only.	Total analysis time of 7.62 min for domperidone only.	Baseline resolution of domperidone and 3 metabolites within 15 minutes.	Baseline resolution of domperidone and 4 metabolites within 13 minutes.
Medium	Suitable for detection of domperidone in plasma.	Suitable for detection of domperidone in plasma.	Suitable for <i>in vitro</i> drug metabolism studies.	Suitable for <i>in vitro</i> drug metabolism studies.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Major metabolic pathways of domperidone.

Figure 2: A) Typical chromatogram of domperidone and its four major metabolites. Retention time are 4.2, 4.7, 5.1, 5.7, 6.5 and 12.1 minutes for a hydroxylated metabolite (M1), a N-dealkylated metabolite (M2), a minor hydroxylated metabolite (M4), a major 5-hydroxylated metabolite (M3), internal standard (encainide) and domperidone, respectively. B) Typical chromatogram obtained from a blank and control incubation (incubation performed without NADPH regenerating system).

Figure 3: Representative kinetic plots for the inhibition of the formation rate of major metabolites of domperidone. Each data point represents the mean of duplicate experiments. M1; hydroxylated metabolite, M2; N-dealkylated metabolite and M3; major 5-hydroxylated metabolite.

FIGURE 1

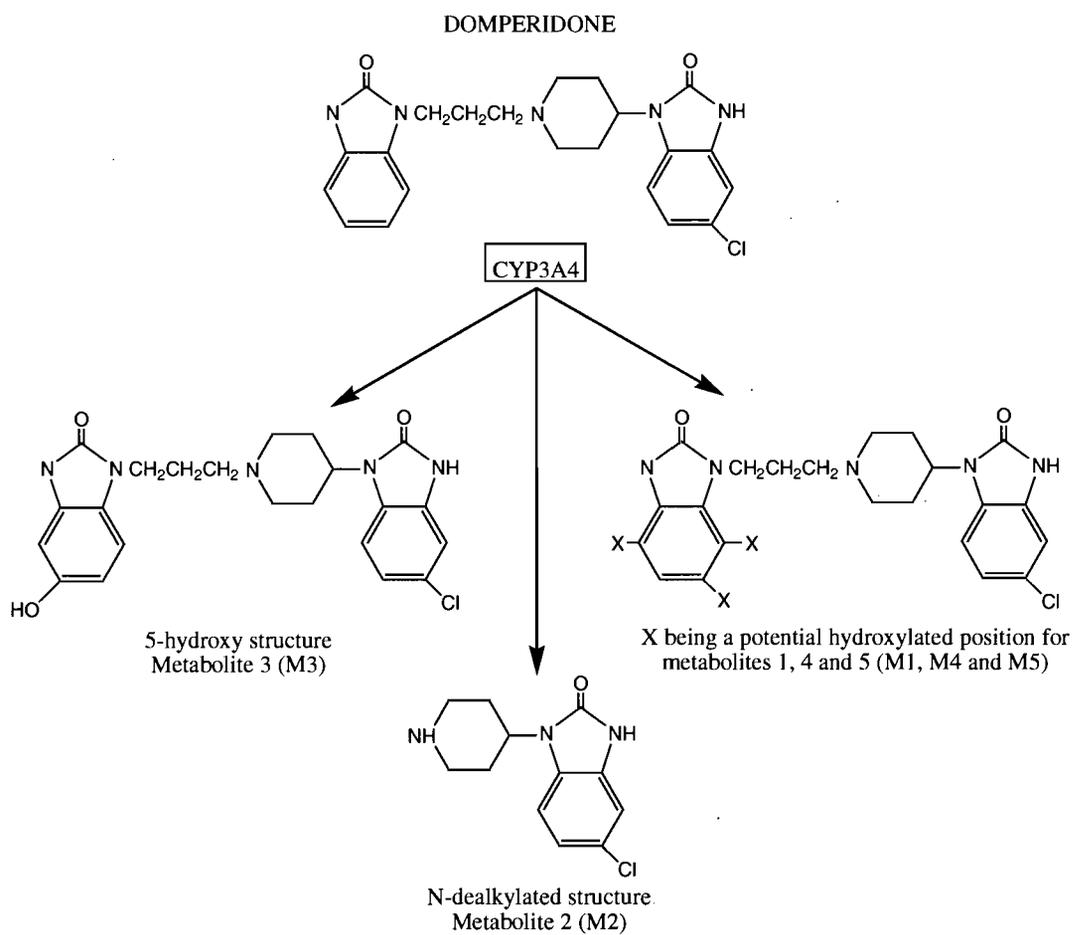
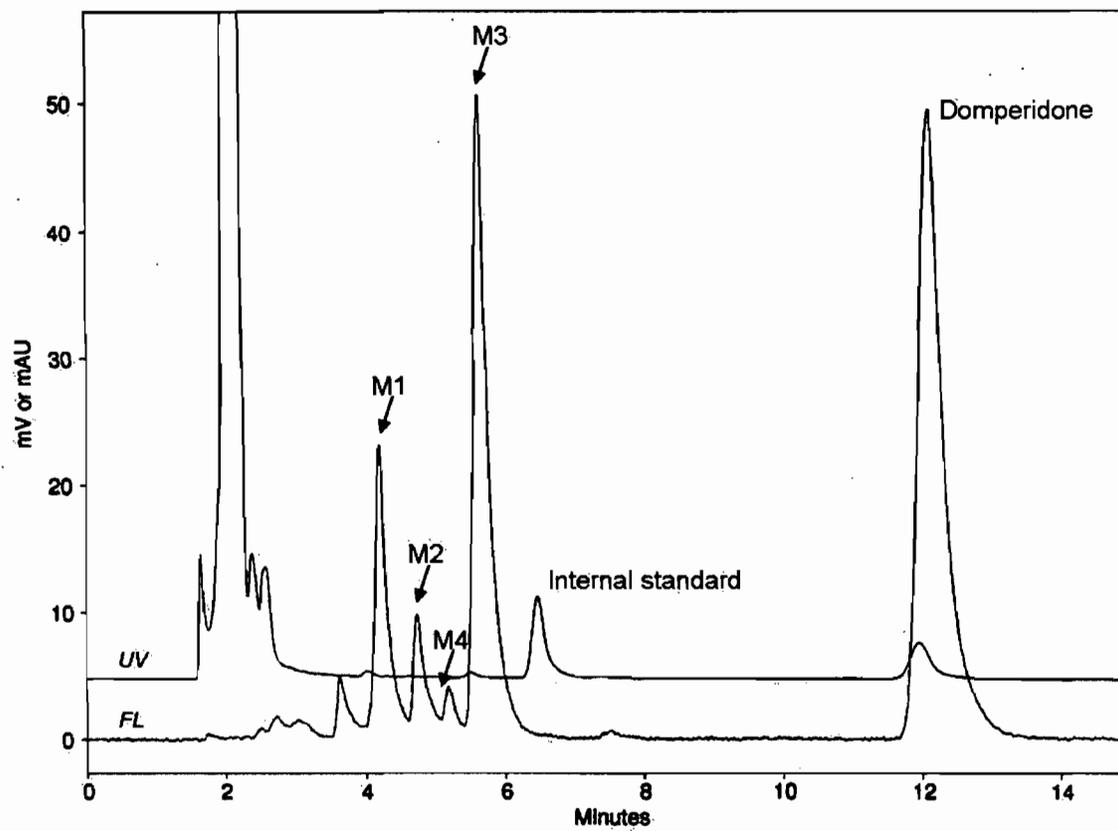


FIGURE 2

A)



B)

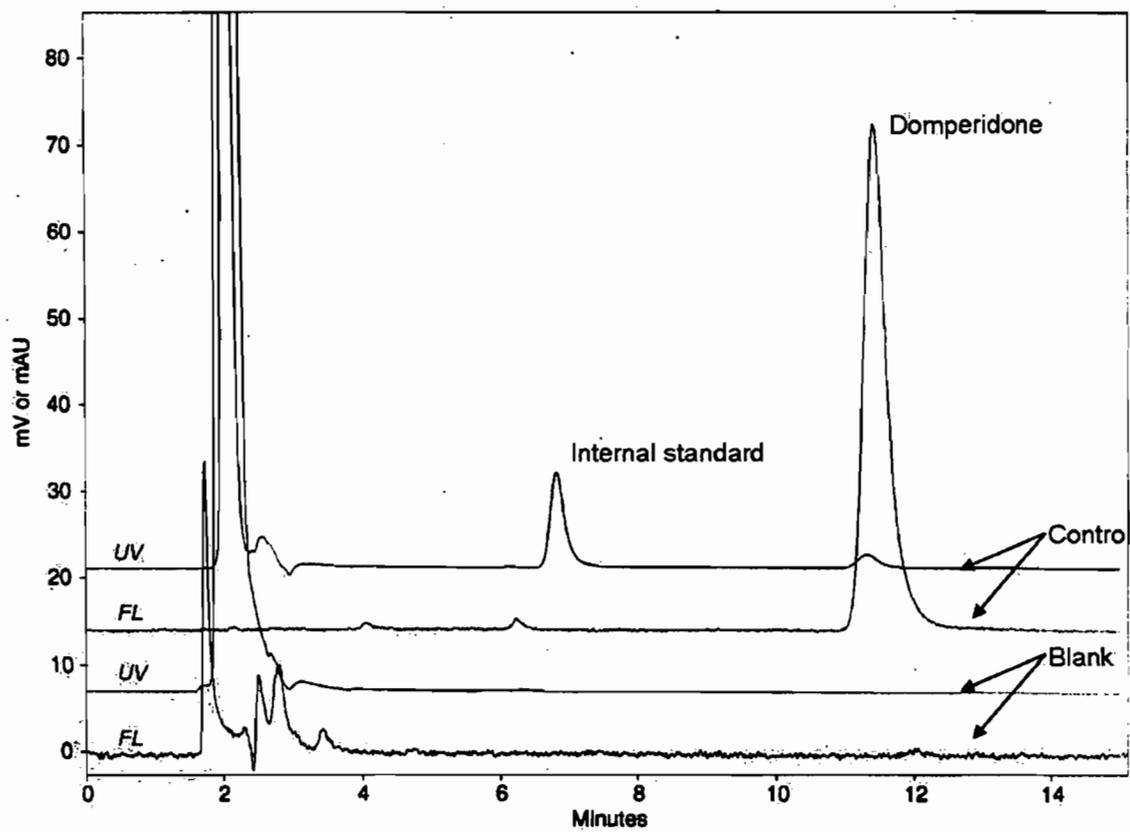
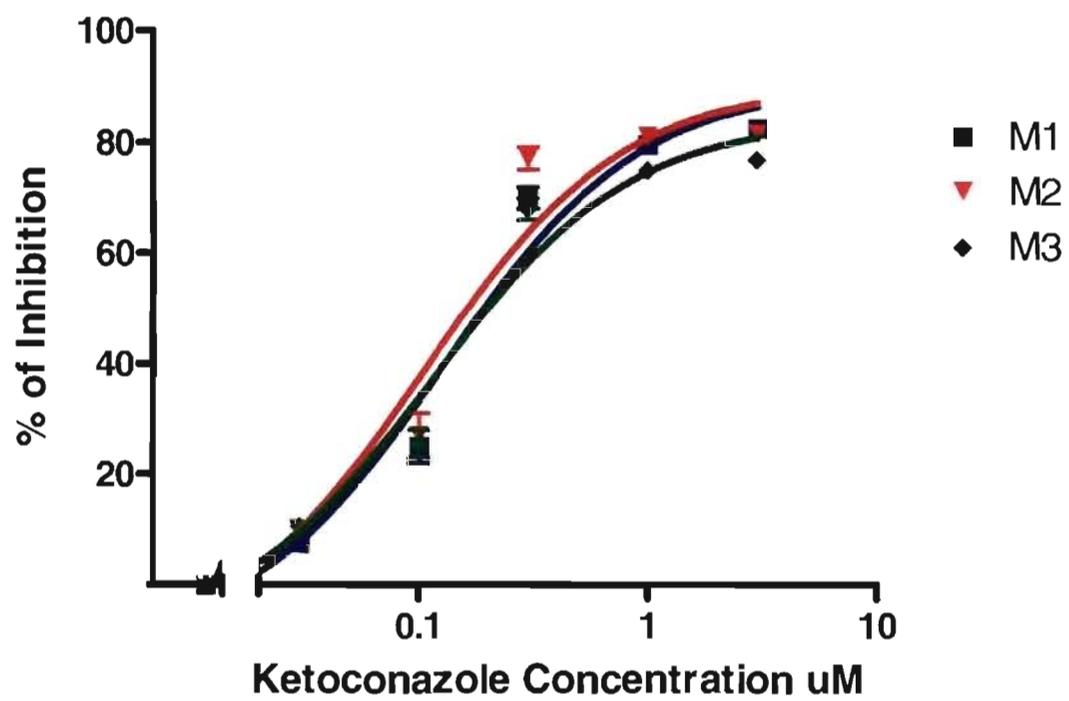


FIGURE 3



iv) DISCUSSION

Tel que discuté dans l'article, il existe peu de méthodes d'analyse publiées dans la littérature pour la détection et la quantification de la dompéridone et de ses métabolites. Il faut noter que nous étions aussi limités par le type d'appareils disponibles dans le laboratoire à ce moment. Le manque de littérature relative à la dompéridone et ses métabolites peut s'expliquer par le fait que 1) ce médicament fut commercialisé au Canada il y a déjà plus de 30 ans (à la fin des années 70) et 2) qu'il n'est pas disponible aux États-Unis. Une des limites de notre étude est qu'elle ne permet pas la caractérisation des métabolites lesquels ne sont pas disponibles commercialement. Par conséquent, tel que rapporté dans l'article de Simard *et al.*, nous avons fait identifier et caractériser les métabolites à l'aide d'une expertise externe à l'aide de LC-MS TOF, soit par chromatographie liquide couplé à un spectre de masse de type «time of flight». Cet appareil est particulièrement utile pour l'identification de composés inconnus. Par la suite, la correspondance entre les métabolites identifiés avec cette technologie et les métabolites détectés par HPLC a été réalisée. Ainsi, l'identification et la correspondance des métabolites étant réalisées, la méthode HPLC n'est plus contraignante et devient adéquate pour nos études de métabolisme *in vitro* subséquentes.

Il faut également ajouter qu'une limite des analyses par HPLC est la sensibilité lorsqu'on compare cette dernière à des technologies telles que la spectrométrie de masse. Tout d'abord, cette technologie n'était pas disponible dans le laboratoire. De plus, cette contrainte de sensibilité est peu problématique lors d'étude *in vitro* puisque les concentrations avec lesquelles ces expériences sont effectuées sont élevées comparativement aux matrices biologiques obtenues lors des études *in vivo*. Également, l'utilisation d'un détecteur à fluorescence permet en plus de limiter les interférences, d'obtenir davantage de spécificité comparativement à d'autres types de détecteurs comme l'ultraviolet. Effectivement, aucun interférant n'a été détecté tant avec les métabolites qu'avec la dompéridone et cela, avec différentes sources enzymatiques et différents milieux d'incubation.

Finalement, nous avons mis au point une méthode d'analyse simple, efficace, rapide, suffisamment sensible et spécifique pour effectuer des études de pharmacocinétiques *in vitro*.

SECTION 2.1.1

ARTICLE #2

Comprehensive characterization of CYP3A isozymes involved in the metabolism of domperidone: comparison with the probe drug substrate midazolam, role of cytochrome b5 and inhibition by ketoconazole.

i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Cette partie de mes études doctorales a pour objectif 1) de caractériser les isoenzymes spécifiques de la famille CYP3As impliquées dans le métabolisme de la dompéridone et d'évaluer leur contribution respective au métabolisme de la dompéridone, 2) d'étudier l'effet de l'addition de cytochrome b5 sur le profil cinétique des isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5, 3) de déterminer l'influence du cytochrome b5 sur l'inhibition par le kétoconazole, un inhibiteur puissant des CYP3As et finalement, 4) de répéter et comparer les résultats avec un substrat marqueur du CYP3A4, le midazolam.

Mise en contexte du projet :

Une brève mise en perspective du projet dans le temps sera d'abord présentée afin d'expliquer le cheminement logique de l'étude. Premièrement, des expériences de métabolisme *in vitro* en présence d'isoenzymes purifiées de CYP3A4 et de CYP3A5 ont été effectuées avec la dompéridone. La quantité de métabolites produits de la dompéridone étant plus faible qu'attendue, une évaluation de l'activité enzymatique a été réalisée en utilisant le midazolam comme substrat marqueur. L'activité demeurant faible, les éléments du milieu d'incubation ont été comparés à ceux utilisés dans la littérature avec ces isoenzymes. Le cytochrome b5 a alors été ajouté comme cofacteur au milieu d'incubation. La formation des métabolites de la dompéridone était alors plus proche de celle obtenue précédemment avec les microsomes de foie humain. Les cinétiques obtenues avec les CYP3A4 et CYP3A5 en présence ou en absence de cytochrome b5 ont pu être évaluées et comparées pour la dompéridone et le midazolam. Toutefois, certains profils cinétiques observés ne correspondaient pas à une cinétique simple de Michaelis-Menten et ne permettaient pas de dériver adéquatement les paramètres cinétiques *in vitro*. Ainsi, une approche non conventionnelle dite «atypique» apparaissait mieux concorder avec certains des profils observés. Par la suite, des études d'inhibition avec le kétoconazole, un inhibiteur puissant des CYP3As, ont été réalisées afin d'étudier l'influence du cytochrome b5 sur l'inhibition par le kétoconazole.

ii) INTRODUCTION

Les lignes directrices relatives au traitement de nombreuses pathologies (exemple; l'hypertension, le diabète, l'insuffisance cardiaque, les soins palliatifs...) favorisent le recours à une polythérapie exposant ainsi les patients à un potentiel important d'interactions médicamenteuses.. Ceci n'est pas sans conséquences cliniques. Il faut noter que les effets secondaires aux médicaments entraînent un bon nombre d'hospitalisations annuellement et que les interactions médicamenteuses sont en grande partie responsables de ces effets secondaires. Lors de l'administration concomitante de médicaments, une compétition au sein de leur métabolisme ou de leur élimination peut survenir provoquant généralement une augmentation des concentrations plasmatiques de l'un des médicaments. Cette augmentation peut entraîner des effets indésirables d'importance clinique. Les interactions pharmacocinétiques liées au métabolisme des médicaments sont fréquemment observée en clinique. D'où l'intérêt de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux interactions médicamenteuses afin de réduire les effets secondaires, le nombre d'hospitalisations mais également afin d'améliorer la fidélité des patients à leur traitement pharmacologique .

L'identification des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments et des molécules investigatrices («produits candidats» lors du développement des médicaments) peut aider à identifier la meilleure alternative quant au médicament à administrer pour un patient en fonction de son profil pharmacologique ou encore à cibler la meilleure molécule en investigation à développer.²⁵¹ Ceci peut également aider à déterminer les études *in vivo* spécifiques à réaliser. Finalement, une identification précise des isoenzymes peut aussi aider à expliquer et à élucider des mécanismes responsables de la variabilité interindividuelle dans la réponse ou la toxicité aux médicaments.²⁵¹ Le défi est de comprendre l'impact relatif des différentes formes de CYP450s humains afin d'obtenir un reflet globale et précis du métabolisme complet du composé. Diverses approches ont été développées pour étudier les isoformes spécifiques des CYP450s impliquées dans le métabolisme des médicaments. Ceci comprend l'utilisation de fractions de tissus humains, des cellules, des tranches de tissus, des enzymes exprimées à partir de cellules clonées.

L'isoforme CYP3A4 est l'une des isoenzymes majeures des CYP450s due à son expression abondante dans le foie et les intestins chez l'humain, son éventail large

dans la spécificité des substrats et son implication fréquente dans les interactions médicamenteuses cliniquement significatives.

Les résultats obtenus suite aux études de métabolisme effectuées dans notre laboratoire avaient montré que la voie majeure du métabolisme de la dompéridone est la famille CYP3A. Il existe un intérêt particulier à caractériser le métabolisme des médicaments par les différentes isoenzymes des CYP3As. Ceci s'explique par le fait que les CYP3A4 et CYP3A5 présentent un chevauchement dans la spécificité de leurs substrats et qu'une variabilité importante dans le métabolisme des médicaments substrats des CYP3A4/5 est observée en clinique. Cette variabilité est due entre autres à la présence d'un polymorphisme génétique pour le CYP3A5.

Les stratégies utilisées afin de prédire la clairance *in vivo* des médicaments de même que la prédiction des interactions médicamenteuses potentielles sont basées sur les données cinétiques *in vitro* du métabolisme des médicaments. D'où l'importance de caractériser spécifiquement le métabolisme des médicaments.

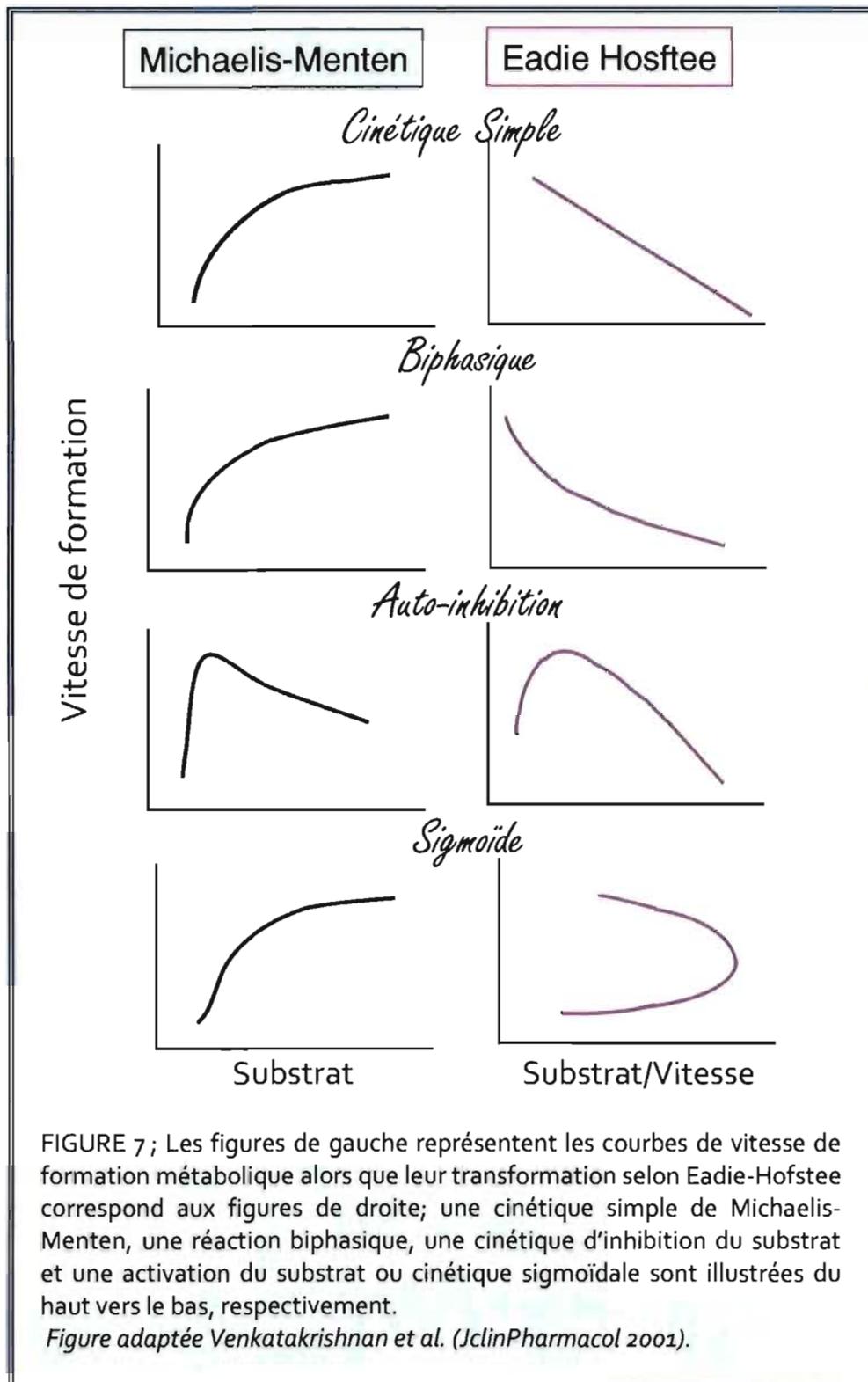
iii) CINÉTIQUE ATYPIQUE

La relation entre l'activité métabolique et les concentrations du substrat peut généralement être décrite par le modèle classique de Michaelis-Menten. Le modèle de Michaelis-Menten assume que le site actif de l'enzyme comporte un seul site de liaison où le processus enzymatique a lieu et que la vitesse avec laquelle la réaction s'exécute peut être caractérisée par une courbe de saturation de forme hyperbolique. Généralement, cette approche peut être appliquée à la majorité des enzymes biologiques retrouvées dans l'environnement.²⁵² De fait, plusieurs réactions catalysées par les CYP450s suivent une cinétique simple de Michaelis-Menten dont les constantes cinétiques sont facilement dérivées. Toutefois, certaines isoenzymes des CYP450s, particulièrement le CYP3A4, présentent des propriétés cinétiques non-conventionnelles dites atypiques. Déjà au début des années 1980, des études rapportaient des cinétiques non-hyperboliques avec des CYP450s.^{253, 254} Il est bien démontré que certaines isoenzymes des CYP450s incluant les CYP1A2, CYP2C9/8, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4 peuvent présenter des cinétiques *in vitro* atypiques et non artéfactuelles. Les cinétiques «allostériques» peuvent influencer

l'interprétation et la prédiction du métabolisme et des interactions médicamenteuses.

Des modèles à plusieurs sites de liaison ont été proposés et sont utilisés pour décrire les cinétiques enzymatiques atypiques. L'existence possible de différents sites de liaison à l'isoenzyme CYP3A4 a été proposée par le fait que le site de liaison au CYP3A4 est très large suggérant que le site actif puisse accommoder deux ou plusieurs molécules du même substrat ou d'une autre entité chimique. Alors que des interactions compétitives étaient attendues, de nombreux substrats du CYP3A4 ont plutôt présenté un comportement différent et non conforme aux interactions compétitives conventionnellement prévues.

Les effets nommés «atypiques» peuvent être positifs ou négatifs, sont variés et peuvent résulter de la fixation à différents sites de liaison sur l'enzyme par plus d'une molécule du même substrat (on parle alors d'homotropie) ou de différents substrats (on réfère alors à l'hétérotropie). En particulier, la cinétique complexe du CYP3A4 observée avec certains substrats est expliquée par les phénomènes de coopération (activation ou inhibition) homotrope et hétérotrope. Les effets homotropiques consistent en des modifications soit dans l'affinité et/ou dans la vitesse de formation des métabolites produits suite à la liaison d'une seconde molécule du même substrat au site actif de l'enzyme. L'effet final est soit une activité augmentée de l'isoenzyme CYP450 décrite par une cinétique sigmoïde (définie comme une autoactivation ou homotropie positive) ou soit, une activité enzymatique réduite décrite par un profil cinétique convexe (définie comme une auto-inhibition ou homotropie négative). Le profil typique le plus fréquent est une sigmoïde ou courbe en «S» (Figure7). La complexité des effets allostériques est supérieure pour les interactions hétérotropiques lesquelles impliquent deux molécules différentes. Contrairement à une simple inhibition compétitive, la seconde molécule peut entraîner soit une activation, soit une inhibition affectant l'affinité ou l'activité métabolique, mais également une combinaison des deux c'est-à-dire une activation et une inhibition peuvent être observées. Le phénomène d'hétérotropie se complexifie davantage puisque les effets seront dépendants du substrat.



Le manque d'inhibition compétitive observé avec les combinaisons de testostérone et de diazépam ou d'aflatoxin B1 et d' α -naphthoflavone ont suggéré la présence d'un site distinct et différent pour la liaison de l'effecteur. De plus, les études de mutagenèse dirigée ont indiqué que le site de métabolisme et de régulation peut différer pour le même substrat.^{152, 255-257} Les effets des interactions seront dépendantes du/des substrat(s) présent(s) au site actif, du chevauchement possible au niveau de la liaison et de leur concentration.

Il semble que le CYP3A4 soit particulièrement sensible aux ligands pour les sites non-actifs ainsi qu'aux conditions liées au tampon.^{258, 259} Schrag et Wienckers ont rapporté que l'addition de magnésium au milieu d'incubation en présence de CYP3A4 et du substrat pyrène a entraîné une conversion du profil cinétique hyperbolique en une cinétique homotropique positive. Ainsi, des changements de conformation seraient induits par des ligands comme le magnésium agissant sur des sites non-actifs.²⁶⁰ De plus, le cytochrome b5 de même que le cytochrome réductase pourraient aussi contribuer à des changements de conformation (ceci constituerait l'un des mécanismes allostériques).

iv) CYTOCHROME b5

Les CYP450s ne sont pas des enzymes dites auto-suffisantes c'est-à-dire, les isoenzymes microsomales nécessitent la présence d'une réductase, la NADPH réductase, comme porteur d'électron pour obtenir un système catalytique fonctionnel. Une autre protéine «hème», le cytochrome b5, est également reconnue pour avoir un rôle important dans les réactions de monooxygénation dépendantes des CYP450s. D'ailleurs les CYP450s humains peuvent utiliser le cytochrome b5 comme source d'électrons où le NADH est le réducteur et le flot d'électrons est médié par une FAD-oxydoréductase cytochrome b5. Bien que les fonctions du cytochrome b5 soient encore hypothétiques, il est proposé que le cytochrome b5; 1) soit impliqué dans le transfert direct d'électrons, 2) puisse former un complexe avec le CYP pour permettre un second transfert d'électrons lors de l'interaction avec la réductase, 3) diminue le «uncoupling» ou 4) agisse à titre d'effecteur augmentant ainsi la formation de produits, indépendamment de l'effet d'oxydoréduction.²⁶¹ Depuis plusieurs années, les résultats de différentes études supportent le rôle effecteur du cytochrome b5 dans la réaction de monooxygénation des CYP450s.²⁶²⁻

²⁶⁵ Cette hypothèse est basée sur le fait que le cytochrome b5 facilite la dégradation du complexe oxycytochrome P450 favorisant la formation du produit et du CYP450 ferrique. L'apo-cytochrome b5 a montré être aussi actif à titre d'effecteur sur l'oxycytochrome P450.

Des expériences *in vitro* effectuées à partir d'enzymes CYP450 recombinantes ou de cellules coexprimant le cytochrome b5 avec une réductase ont montré que la présence de cytochrome b5 pouvait moduler l'activité spécifique de plusieurs isoenzymes du CYP450. Ainsi, le cytochrome b5 a augmenté l'activité des CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/19, CYP2E1 et CYP3A4. Il faut souligner que l'effet du cytochrome b5 est dépendant de l'isoforme de CYP450, mais également dépendant du substrat.²⁶⁶ Plusieurs études soutiennent grandement les effets allostériques du cytochrome b5 lesquels seraient en partie expliqués par un effet sur le «spin» du CYP450. Les effets modulateurs du cytochrome b5 sont appuyés par le fait que ce cytochrome peut non seulement augmenter l'activité du CYP450 mais il peut aussi inhiber son activité. En effet, le cytochrome b5 active l'oxydation de nombreux substrats des CYP3A4 et CYP3A5, tandis qu'il inhibe l'activité du CYP3A7.²⁶⁶

Des études ont rapporté une influence marquée du cytochrome b5 sur l'activité des isoenzymes de la sous-famille CYP3As. Diverses expériences effectuées avec l'isoforme CYP3A4 humaine indiquaient que la liaison du cytochrome b5 avec le CYP450 spécifique entraînait des changements structuraux lesquels avaient un impact sur la capacité de la monooxygénase à subir des changements d'oxydoréduction.²⁶¹ D'ailleurs dans des systèmes reconstitués *in vitro*, en présence de substrats comme la testostérone ou la nifédipine, l'«input» du premier électron du NADPH à la monooxygénase (laquelle passe d'un état ferrique à ferreux), ainsi que le taux de produits formés étaient minimales en absence de cytochrome b5.^{267, 268} De plus, l'apo-cytochrome b5 a démontré une efficacité comparable à l'holoprotéine en rapport à la réduction du CYP3A4 et dans la formation des métabolites produits. Ceci suggère que le rôle du cytochrome b5 ne requerrait pas de transfert d'électrons ou de changements d'oxydoréduction.²⁶⁹ Effectivement, Yamazaki *et al.* ont observé que l'augmentation de l'hydroxylation de la 6- β -testostérone et de l'oxydation de la nifédipine était réalisée aussi efficacement par l'apo-cytochrome b5 que par l'holoenzyme suggérant que le cytochrome b5 peut activer l'isoenzyme CYP3A4 en induisant un changement de conformation et non par l'augmentation du flot d'électrons.²⁶⁹ D'ailleurs, plusieurs études suggèrent que le cytochrome b5 ait davantage un rôle «conformationnel» qu'un effet sur le transfert d'électrons, puisque

le transfert de l'électron du cytochrome b5 ferreux au CYP450 ferrique apparaît très lent.²⁶⁹⁻²⁷¹

L'interaction entre les CYP450s et le cytochrome b5 peut aussi entraîner la production d'une cinétique atypique. Il est probable que la liaison de l'effecteur augmente ou améliore l'interaction avec le cytochrome b5 ou l'oxydoréductase ou les deux.

v) ARTICLE

Comprehensive Characterization of CYP3A Isozymes Involved in the Metabolism of Domperidone : Comparison with the Probe Drug Substrate Midazolam, role of Cytochrome b₅ and inhibition by ketoconazole.

Article soumis: Metabolism Drug and Disposition

Véronique Michaud, Chantale Simard et Jacques Turgeon.

**COMPREHENSIVE CHARACTERIZATION OF CYP3A ISOZYMES INVOLVED IN THE METABOLISM
OF DOMPERIDONE : ROLE OF CYTOCHROME b₅, INHIBITION BY KETOCONAZOLE AND
COMPARISON WITH THE PROBE DRUG SUBSTRATE MIDAZOLAM.**

Véronique Michaud¹, B.Pharm., M.Sc., Chantale Simard², B.Pharm., Ph.D.
and Jacques Turgeon¹, B.Pharm., Ph.D.

¹ Faculty of Pharmacy, Université de Montréal and CRCHUM, Centre Hospitalier de
l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Faculty of Pharmacy, Université Laval and Research Center, Institut Universitaire de
Cardiologie et Pneumologie, Hôpital Laval, Québec, Québec, Canada.

CORRESPONDANCE: Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Hôtel-Dieu, Masson Pavilion
3850 St. Urbain street, room 8-107
Montréal, Québec, Canada
H2W 1T7

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

RUNNING TITLE: CYP3A isoforms involved in the metabolism of domperidone.

NUMBER OF TEXT PAGES: 22

NUMBER OF TABLES: 3

NUMBER OF FIGURES: 4

NUMBER OF REFERENCES: 40

NUMBER OF WORDS IN THE ABSTRACT: 232

NUMBER OF WORDS IN THE INTRODUCTION: 650

NUMBER OF WORDS IN THE DISCUSSION: 1124

ABSTRACT

Previous studies have indicated that CYP3As are involved in the metabolism of the prokinetic agent domperidone. The objective of our study was to characterize further the role of specific CYP3A isoforms in the metabolism of this drug using various enzymatic sources. The modulatory role of cytochrome b_5 as well as inhibition by ketoconazole were assessed and compared with the probe drug midazolam. Intrinsic clearances for the formation of domperidone major metabolite (M3) was the highest with rCYP3A4 (0.4 mL/min/nmol CYP450) compared with rCYP3A5 (0.04 mL/min/nmol CYP450). In contrast, much similar intrinsic clearance values were determined for the respective formation of either 1-OH or 4-OH-midazolam by rCYP3A4 (1.51 and 0.04 mL/min/nmol CYP450) or rCYP3A5 (1.80 and 0.06 mL/min/nmol CYP450), although intrinsic clearances were much higher for 1-OH compared to 4-OH-midazolam. The addition of cytochrome b_5 to recombinant enzymes (rCYP3A4 or rCYP3A5) increased 1.5- to 6-fold the V_{max} for the formation of domperidone M3, midazolam 1-OH and midazolam 4-OH metabolites. Our results also demonstrate that ketoconazole exhibit preferred inhibition of CYP3A4 compared to CYP3A5 for both domperidone and midazolam. Interestingly, the addition of cytochrome b_5 to the incubation mixture appeared to decrease the inhibitory potency of ketoconazole towards CYP3A4 for domperidone but not for midazolam. Thus our results confirm the role of CYP3As in the metabolism of domperidone but more specifically that CYP3A4 is the major enzyme involved in the metabolism of the drug.

INTRODUCTION

The cytochrome P450 (CYP450) is a superfamily of enzymes involved in the metabolism of endogenous and exogenous compounds.(Rendic, 2002) This superfamily comprises in humans 44 subfamilies and 57 genes (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>). One of these subfamilies, the CYP3A, with its four known members (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43), is the major subfamily of enzymes involved in the biotransformation of xenobiotics and the most abundant drug metabolizing enzyme in the liver.(Guengerich et al., 1986; Komori et al., 1989; Shimada et al., 1994; Gellner et al., 2001) Indeed, CYP3As are responsible for the metabolism of about 50% of therapeutic compounds currently used clinically.(Rendic, 2002)

Wide inter-individual differences in the expression or activity of CYP3As contribute to variations in both the clearance and efficacy of CYP3A substrates. This is mostly explained by factors such as variability in the intestinal and hepatic content of various CYP3A isoforms, discrete sensitivity to genetic polymorphisms, the presence of more than one catalytic or binding sites on CYP3A isoforms, complex substrate-enhancer interactions and overlap substrate selectivity between CYP3A isoforms.(Shimada et al., 1994; Harlow and Halpert, 1998; Domanski et al., 2001; Kenworthy et al., 2001; Kuehl et al., 2001; Schrag and Wienkers, 2001a; Emoto and Iwasaki, 2006; Paine et al., 2006)

In vitro studies with CYP3A isoforms are generally performed to estimate the relative *in vivo* intestinal/hepatic clearance of CYP3A substrates and their potential for drug-drug interactions. In the most conventional way, a Michaelis-Menten model is employed to describe the rate-of-metabolism to substrate-concentration relationship. The addition to the incubation mixture of CYP450 effectors that could activate or inhibit the enzymatic activity may lead to unusual kinetics.(Shou et al., 2001) Hence, under these conditions, certain CYP450 isozymes, but in particular CYP3As, exhibit atypical kinetic profiles for the metabolism of substrates such as verapamil, testosterone, nifedipine, diazepam and midazolam.(Kenworthy et al., 2001; Galetin et al., 2003; Shen et al., 2004) For instance, it is known that more than one molecule of CYP3A substrates or a substrate plus an effector can co-localize within the CYP3A catalytic site at any given time.(Shou et al., 1994; Schrag and Wienkers, 2001b) Endogenous effectors such cytochrome b₅ can

provoke atypical kinetics to occur which phenomenon can confound the estimation of drug metabolism or inhibitory constants.

Domperidone is principally used in Canada and European countries for its antiemetic properties and for the treatment of motility disorders. For years, the drug was a second choice to cisapride but removal of the latter from the market has been associated with a significant increase in the clinical use of domperidone. Domperidone possesses cardiac electrophysiological effects similar to those of cisapride: the drug has high affinity for HERG, blocks the rapid component of the delayed rectifier potassium current (I_{Kr}) and prolongs cardiac repolarization. (Drolet et al., 1998; Drolet et al., 2000) Indeed, QT prolongation and sudden deaths have been reported following the intravenous administration of domperidone or following overdosing. (Giaccone et al., 1984; Rocha and Barbosa, 2005) These effects prevented approval of the drug by the FDA and its access to the market in USA. Previous studies conducted in our laboratory and by others have indicated that CYP3As are the major enzymes involved in the metabolism of domperidone. (Simard et al., 2004; Ward et al., 2004) Hence, considering the toxicity profile of domperidone, drug-drug interactions leading to inhibition of CYP3As can provoke increase in plasma levels of the drug and predispose patients to QT prolongation or torsades de pointes.

In this study, we further examine and characterize the metabolism of domperidone by specific CYP3A isoforms looking more closely at the relative contribution of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7. Metabolic activities and kinetic constants are compared to those of midazolam for the formation of its 1-hydroxy- (1-OH) and 4-hydroxymetabolite (4-OH). We have also evaluated the modulatory role of cytochrome b_5 – as an effector – on the metabolism of domperidone and midazolam and characterized the effects of cytochrome b_5 on the inhibition potency of ketoconazole towards CYP3A4 and CYP3A5.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Domperidone was purchased from Janssen Pharmaceutica N.V. (Beerse, Belgium). Ketoconazole was obtained from ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA).

Midazolam and encainide were generously provided by Sabex Laboratories (Montreal, Canada) and Bristol Myers Squibb Pharmaceutical Research (Wallingford, CT, USA), respectively. 1-Hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam and cofactors (NADP⁺, D-glucose 6-phosphate and glucose 6-phosphate dehydrogenase) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Human liver microsomes were purchased from Human Biologics International (Scottsdale, AZ, USA). Microsomes from lymphoblast-expressed human CYP3A4, from baculovirus-infected insect cells expressing CYP3A4 (rCYP3A4) or CYP3A5 (rCYP3A5), and from baculovirus-expressed human cytochrome b₅ (CYP b₅) were obtained from BD Gentest (Woburn, MA, USA). These microsomes were coexpressed with human CYP450 reductase. We also obtained from the same source microsomes from baculovirus-infected insects that coexpress CYP3A7, cytochrome b₅ (rCYP3A7+b₅) and human CYP450 reductase. Mouse monoclonal antibodies raised against human CYP3A4 were also obtained from BD Gentest (Woburn, MA, USA). Other chemicals used were of highest qualities commercially available.

HPLC analysis. The HPLC system (Thermo Separation products, Fremont, CA) consisted of a SpectraSystem P4000 pump, a SpectraSystem AS3000 autosampler, a model FL3000 fluorescence detector, a SpectraSystem UV3000 ultraviolet detector and a model PC1000 System Software. Quantification of domperidone major metabolites was performed after chromatographic separation according to the previously published method.(Michaud et al., 2007) Quantitative analysis of midazolam metabolites (1-OH-midazolam and 4-OH-midazolam) was performed after slight adjustments to the assay described by Perloff et al.(Perloff et al., 2000) Briefly, separation of 1-OH-midazolam and 4-OH-midazolam was achieved on an Ultrasphere ODS column (5 μ M x 250 mm x 4.6 mm; Beckman Coulter, Fullerton, CA) using a mobile phase containing potassium acetate buffer (0.01M, pH 7.4), acetonitrile, methanol, tetrahydrofuran (45: 25: 23: 7) and triethylamine (0.5 mL/L of potassium acetate buffer). Eluent was monitored by ultraviolet absorbance at $\lambda = 220$ nm. Intraday and interday coefficients of variation were less than 5% and 10%, respectively.

Microsomal incubations. All microsomal incubations were performed in duplicate. The standard incubation mixture (final volume, 500 μ L) consisted of microsomes (20 μ L), 375 μ L of phosphate buffer 50 mM (pH 7.4), 100 μ L of NADPH-regenerating system

solution and 5 μL of substrate (domperidone dissolved in DMSO and midazolam dissolved in methanol; 1% final reaction volume). The NADPH-regenerating solution (100 μL) contained NADP⁺ (498 μg), D-glucose 6-phosphate (502 μg), MgCl₂ 25 mM and 0.2 U glucose 6-phosphate dehydrogenase. The final concentration of domperidone in the incubation mixture varied from 0.5 to 500 μM whereas that of midazolam varied from 0.5 to 300 μM . Substrates were incubated with different enzymatic sources: human liver microsomes, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4, and microsomes from baculovirus-expressed human rCYP3A4, rCYP3A5 or rCYP3A7+b₅. Incubations were performed with various amounts of CYP450 in the reaction mixture: 0.172 nmoles were used with human liver microsomes, 0.016 nmoles with microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4, 0.040 nmoles with microsomes from rCYP3A4, rCYP3A5 or rCYP3A7+b₅.

Incubations containing microsomes, buffer and NADPH-regenerating system solution were pre-incubated at 37°C for 10 minutes. Reactions were initiated by the addition of the substrate to the incubation mixture. The enzymatic process was stopped by adding 500 μL of ice-cold acetonitrile after 45 minutes or 20 minutes, for domperidone and midazolam, respectively. Encainide (60 μL ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution) was added as the internal standard to domperidone incubation milieu while diazepam (20 μL ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution) was used as the internal standard for midazolam incubations. Incubation mixtures were centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes. The supernatant, 10 to 50 μL , was injected onto the HPLC system and the major ring-hydroxylated metabolite of domperidone (M3) or 1-OH- and 4-OH-midazolam were monitored.

To evaluate the modulatory effects of cytochrome b₅ on the metabolism of domperidone and midazolam, microsomes from baculovirus-expressed recombinant human cytochrome b₅ (CYP b₅; 80 pmol) were added to incubation mixtures containing microsomes from rCYP3A4 or rCYP3A5. Incubation mixtures and procedures were similar to those described above; potassium buffer, NADPH-regenerating system solution and enzymatic sources with or without CYP b₅ were pre-incubated at 37°C for 10 minutes before the addition of the substrate solution to initiate metabolic reactions. Unfortunately, rCYP3A7 alone is not commercially available and the role of cytochrome b₅ on the activity of rCYP3A7 could not be determined.

Immunoinhibition studies. Mouse monoclonal antibodies raised against human CYP3A4 were used to confirm major isozymes involved in domperidone metabolism. Microsomes from rCYP3A4 or rCYP3A5 were pre-incubated on ice for 15 minutes in the presence of CYP b₅ and increasing amounts of antibodies directed against human CYP3A4 (0-20 µL). Thereafter, potassium buffer and NADPH-regenerating system solution were added to the mixture containing microsomes and prewarmed at 37°C as described earlier (for 10 minutes) prior to the addition of domperidone. Extent of domperidone metabolism was measured as percentage of control activity (20 µL of Tris buffer provided for antibody dilutions).

Inhibition studies. Effects of the CYP3A chemical inhibitor ketoconazole on the metabolism of domperidone and midazolam were studied in human liver microsomes, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 and microsomes from rCYP3A4 or rCYP3A5, with or without CYP b₅. Ketoconazole was dissolved in methanol (final concentration of methanol in the reaction mixture was 1%). The final concentration of ketoconazole ranged from 0.03 to 3 µM. Briefly, the reaction mixtures containing enzymatic sources, potassium buffer, NADPH-regenerating system and ketoconazole were prewarmed at 37°C for 10 minutes, as described previously, before the addition of the substrate (either domperidone or midazolam). Final concentration of domperidone was fixed at 200 µM in experiments with microsomes from human livers, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 or microsomes from rCYP3A4 but was fixed at 300 µM in experiments conducted with microsomes from rCYP3A5. Final concentration of midazolam was fixed at 50 µM for inhibition studies measuring the formation of 1-OH-midazolam and at 200 µM for inhibition studies looking at 4-OH-midazolam. Formation rates of the major ring-hydroxylated metabolite of domperidone (M3), 1-OH-midazolam and 4-OH-midazolam were expressed as a percentage of metabolite formed relative to amounts of the same metabolites formed in incubations containing no inhibitor.

Data analysis. Enzyme kinetic parameters were determined by non-linear regression analysis using Michaelis-Menten equation while inhibitor potencies (IC₅₀ values) were determined by non-linear regression analysis using Hill's equation. Sigmoidal velocity vs substrate data was described numerically (n) by Hill equation. Substrate inhibition kinetic parameters were calculated by the following equation (Houston and Kenworthy, 2000);

$$v = V_{\max} / (1 + (K_m / S) + (S / K_{si}))$$

When the metabolic profile was consistent with a positive or negative homotropic behavior, the clearances were calculated by the appropriate equations.

For sigmoidal rate plot; $v/S = V_{\max} * S^{n-1} / (S_{50}^n + S^n)$

For negative substrate plot; $v/S = V_{\max} / (S + K_m + (S^2 / K_{si}))$

IC₅₀ was defined as the concentration of ketoconazole that resulted in 50% inhibition of metabolite formation.

RESULTS

Formation of domperidone and midazolam metabolites by CYP3A isoforms in the absence of cytochrome b₅.

Comprehensive characterization of CYP3A isoforms involved in the formation of domperidone M3-hydroxylated metabolite was undertaken using human liver microsomes, lymphoblast-expressed human CYP3A4, rCYP3A4 and rCYP3A5. Km and Vmax values for each enzymatic source are summarized in Table I. Formation rates of domperidone M3-metabolite by human liver microsomes, CYP3A4, rCYP3A4 and rCYP3A5 were of the same order of magnitude. Intrinsic clearance determined for the formation of domperidone M3 metabolite was the highest with rCYP3A4 ($Cl_{int \text{ CYP3A4}} = 0.43 \text{ mL/min/nmol CYP450}$) and more than 10-times higher than that determined for rCYP3A5 ($Cl_{int \text{ CYP3A5}} = 0.04 \text{ mL/min/nmol CYP450}$). This highlighted the much greater affinity (Km) of domperidone for CYP3A4 compared to CYP3A5 for the formation of domperidone M3 metabolite.

Similarly, kinetic parameters were determined for the formation of 1-OH-midazolam and 4-OH-midazolam in human liver microsomes, rCYP3A4 or rCYP3A5. (Table II). The formation rate of midazolam 1-OH-metabolite was much higher with the rCYP3A5 isoform compared to rCYP3A4 (Vmax values: 6.13 vs 1.81 nmol/nmol CYP450/min). On the other hand, much smaller differences were noted for the intrinsic clearance values between these enzymatic sources. Similar intrinsic clearance values for rCYP3A4 and rCYP3A5 despite much higher Vmax for rCYP3A5 were mostly explained

by the greater affinity of midazolam for rCYP3A4 compared to rCYP3A5 ($K_m=1.2 \mu\text{M}$ vs $3.4 \mu\text{M}$).

Affinity of midazolam for the CYP3A isoforms was also much greater (5 to 40-fold) for the formation of the 1-OH-metabolite compared to the formation of 4-OH-midazolam (K_m or S_{50} values were much lower for 1-OH-midazolam; Table II). Consequently, intrinsic clearance values were 10 to 35-fold greater for the formation of 1-OH-midazolam compared to the formation of the 4-OH-metabolite.

Kinetics for the formation of domperidone M3 metabolite and for the formation of 4-OH-midazolam by human liver microsomes, rCYP3A4 and rCYP3A5 were best described by a classical Michaelis-Menten model (Figures 1 and 2). In contrast, kinetics for the formation of 1-OH-midazolam were best described by a negative homotropic model based on convex Eadie-Hofstee plots (Figure 2 A and B). Thus, a negative cooperativity situation was observed for the formation of this metabolite suggesting autoinhibition in the kinetic profiles obtained with rCYP3A4 and rCYP3A5 (in the absence of cytochrome b_5).

Determination of the optimal molar ratio between cytochrome b_5 and CYP3As.

The optimal amount of cytochrome b_5 to be added to a fixed amount of rCYP3A isoforms was established using domperidone as a substrate. Figure 3 illustrates the rate of domperidone oxidation measured as a function of increasing ratios of cytochrome b_5 /rCYP3A4. As can be seen, the activity of rCYP3A4 towards the oxidation of domperidone was enhanced significantly by the addition of even small amounts of cytochrome b_5 . The rate of metabolism reached a maximum when the molar ratio of cytochrome b_5 to rCYP3A4 was around 2.

Modulatory effects of cytochrome b_5 added to the incubation mixture on the metabolism of domperidone and midazolam by human rCYP3A isoforms.

The effects of cytochrome b_5 on rCYP3A activities were investigated by measuring the rate of formation of domperidone M3-metabolite, 1-OH-midazolam and 4-OH-midazolam (Tables I and II). Cytochrome b_5 was added at a molar ratio of 2:1 as determined previously. V_{max} for the formation of domperidone M3 metabolite increased 6-fold when cytochrome b_5 was added to rCYP3A4. On the other hand, V_{max} for the

formation of this metabolite was increased only 2-fold when cytochrome b₅ was added to rCYP3A5. For midazolam, addition of cytochrome b₅ increased the enzymatic activity of both rCYP3A4 and rCYP3A5 by ~2- to 3-fold, and to a similar extent for both 1-OH-midazolam and 4-OH-midazolam.

Following the addition of cytochrome b₅, a decrease in binding affinity (K_m) was observed for domperidone with rCYP3A4 (15.3±1.7 vs 49±5 μM) whereas binding affinity to rCYP3A5 slightly increased (129±13 vs 94±11 μM). Consequently, the addition of cytochrome b₅ increased the intrinsic clearance of domperidone by rCYP3A5 by almost 4-fold (from 0.04 to 0.16 mL/min/nmol CYP450) whereas that measured for rCYP3A4 increased only by 2-fold. Nevertheless, the intrinsic clearance measured with rCYP3A4+CYP b₅ was the highest and 5-times higher than that measured in human liver microsomes (0.86 vs 0.16 mL/min/nmol CYP450).

The addition of cytochrome b₅ did not modify to a significant extent the binding affinity of midazolam for rCYP3A4 or rCYP3A5 (Table II). There were however small increases in the intrinsic clearance for both 1-OH and 4-OH midazolam formation with either rCYP3A4 or rCYP3A5, ranging from 1.2- to 2.8-fold.

The formation rate of domperidone M3 metabolite by rCYP3A7+CYP b₅ was 10- to 35-fold lower than that measured for rCYP3A5+CYP b₅ or rCYP3A4+CYP b₅, respectively (Table 1). The same difference was observed for the intrinsic clearance values of domperidone by rCYP3A7+CYP b₅ compared to rCYP3A4+CYP b₅ or rCYP3A5+CYP b₅ since affinity of domperidone to rCYP3A7 was of the same order of magnitude as that of rCYP3A4 or rCYP3A5 (when cytochrome b₅ was added).

For midazolam, similar kinetic parameters were determined for the formation of either 1-OH or 4-OH-midazolam by rCYP3A7+CYP b₅. However, binding affinity and activity towards the 1-OH metabolite of midazolam were much lower for this isoform compared to rCYP3A4+CYP b₅ or rCYP3A5+CYP b₅. Consequently, the intrinsic clearance of midazolam to its 1-OH metabolite by rCYP3A7+CYP b₅ (0.12 mL/min/nmol CYP450) was 10-fold lower than that measured for rCYP3A4+CYP b₅ or rCYP3A5+CYP b₅ (1.51 and 2.47 mL/min/nmol CYP450).

Inhibition of domperidone and midazolam metabolism by ketoconazole in the presence and absence of cytochrome b₅

Data obtained confirmed that ketoconazole is a potent inhibitor of domperidone and midazolam metabolism (Figure 4). IC₅₀ of ketoconazole for domperidone M3 metabolite, 1-OH-midazolam and 4-OH-midazolam formation varied 40-fold, from 0.05 to 1.99 µM, with the various enzymatic sources tested: IC₅₀s where the lowest for rCYP3A4 (Table III). Addition of cytochrome b₅ to rCYP3A4 increased IC₅₀ of ketoconazole for the inhibition of domperidone M3 formation from 0.05 to 0.27 µM. In contrast, addition of cytochrome b₅ did not alter IC₅₀ of ketoconazole for the metabolism of midazolam by either rCYP3A4 or rCYP3A5. Irrespective of the enzymatic source tested, formation of 1-OH- and 4-OH-midazolam exhibited similar sensitivity to inhibition by ketoconazole (IC₅₀s are similar for the two metabolites for each enzymatic source).

DISCUSSION

The involvement of specific CYP3A isoforms in the metabolism of domperidone was investigated in the present study using midazolam as a reference substrate marker. Intrinsic clearance values differed greatly between the three rCYP3A isoenzymes tested but results obtained indicate that CYP3A4 is the most important enzyme involved in the formation of domperidone major metabolite (M3). The addition of cytochrome b₅ increased the activity of rCYP3As, especially when domperidone was used as a substrate. Ketoconazole demonstrated preferred inhibition of CYP3A4 compared to CYP3A5 for both domperidone and midazolam. Interestingly, cytochrome b₅ appeared to decrease the inhibitory potency of ketoconazole towards CYP3A4 only for domperidone but not for midazolam. Thus, our results confirm the role of CYP3As in the metabolism of domperidone but more specifically that CYP3A4 is the major enzyme involved in the metabolism of the drug.

In our first series of experiments, the metabolism of domperidone and that of midazolam by rCYP3A4 and rCYP3A5 were characterized in the absence cytochrome b₅. Under these conditions, affinity of domperidone for CYP3A4 was the highest while formation rates for domperidone M3-metabolite by rCYP3A4 and rCYP3A5 were similar (6.6 vs 5.7 nmol/nmol CYP450/min). Thus, the resulting intrinsic clearance for

domperidone was ~10-fold higher in the presence of rCYP3A4 compared to rCYP3A5. In contrast, intrinsic clearances of midazolam towards its 1-OH and 4-OH-metabolites were slightly higher for rCYP3A5. Previous studies had also indicated that midazolam is preferentially metabolized by CYP3A5 over CYP3A4.(Kronbach et al., 1989; Ghosal et al., 1996)

It is well accepted that cytochrome b_5 constitutes an electron transfer component in many oxidative reactions such as CYP450 monooxygenations.(Schenkman and Jansson, 2003) However, mechanisms underlying the cytochrome b_5 -mediated stimulation of CYP450 activities remain controversial. Some hypotheses propose that cytochrome b_5 only helps electron transfer, others propose complexation between cytochrome b_5 and CYP450 allowing acceptance of electrons without the need of two interactions with CYP450 reductases; while others suggest structural influences of cytochrome b_5 binding on some cytochrome P450s.(Yamazaki et al., 1996) These influences would appear to be substrate and isoform dependent.(Shet et al., 1995; Yamazaki et al., 1996; Yamazaki et al., 2002; Yamaori et al., 2003) Allosteric stimulation by cytochrome b_5 has been proposed for CYP3As such that binding of cytochrome b_5 to CYP3As caused structural influences that affect ability of the monooxygenase to undergo redox changes.(Yamazaki et al., 1996)

Hence, in our second series of experiments, the addition of cytochrome b_5 to the incubation mixtures was studied. Catalytic activities determined for the formation of M3-domperidone with microsomes from rCYP3A4 or rCYP3A5 increased 6-fold (rCYP3A4) and 2.6-fold (rCYP3A5) following addition of cytochrome b_5 . Without cytochrome b_5 added, V_{max} corrected for the amount of CYP450 added was comparable to V_{max} measured with human liver microsomes or microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4. These observations are consistent with results from other studies that demonstrated that cytochrome b_5 can stimulate CYP3A4 and CYP3A5 activities and that addition of cytochrome b_5 differs between rCYP3A4 and rCYP3A5.(Hirota et al., 2001; Nakajima et al., 2002; Yamazaki et al., 2002) Our results also showed that the addition of cytochrome b_5 decreased 3-fold affinity of domperidone for rCYP3A4; the K_m increased from 15.3 μM (without cytochrome b_5) to 49 μM , a value similar to K_m determined from human liver microsomes (36 μM) or with microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 (34 μM).

The addition of cytochrome b_5 to the incubation mixture also changed the affinity and activity of CYP3A isoforms towards the formation of midazolam 1-OH metabolite. Consequently, the intrinsic clearance of midazolam to its 1-OH-metabolite was increased. These results are in agreement with data previously reported by Yamaori et al. who indicated that V_{max} values for the formation of 1-OH-midazolam by rCYP3A4 and rCYP3A5 were increased by 1.9 and 2.3-times by the addition of cytochrome b_5 , respectively.(Yamaori et al., 2003) Furthermore, Galetin et al. reported marked differences in pathway ratios between CYP3A5 and CYP3A4 for several benzodiazepines including midazolam.(Galetin et al., 2004) In the present study, the most significant change in pathway ratio between rCYP3A4 and rCYP3A5 intrinsic clearances was observed for domperidone; a 10- to a 5- fold difference in the absence vs in the presence of cytochrome b_5 , respectively.

The inhibitory potency of ketoconazole towards rCYP3A4 was much stronger than that measured for rCYP3A5. These results are in agreement with data previously reported for other CYP3A substrates (IC_{50} of 0.01-0.2 and 0.1-1 μ M for rCYP3A4 and rCYP3A5, respectively).(Patki et al., 2003; Allqvist et al., 2007) The addition of cytochrome b_5 to the incubation mixture significantly decreased the apparent inhibitory potency (IC_{50}) of ketoconazole for the formation of domperidone M3-metabolite by microsomes from rCYP3A4. However, selectivity towards a greater inhibitory potency for CYP3A4 over CYP3A5 was conserved in the presence of cytochrome b_5 . Our results suggest that the omission of cytochrome b_5 to the incubation mixture may be associated with an overestimation of the inhibitory potency of ketoconazole towards CYP3As for certain substrates such as domperidone while for other substrates such as midazolam, inhibition by ketoconazole is not modified.

With respect to midazolam, greater affinities of this substrate for CYP3A4 and CYP3A5 were observed for the formation of its 1-OH metabolite compared to its 4-hydroxylation. In addition, V_{max} were higher for the 1-OH metabolite compared to the 4-OH metabolite. As a result, the intrinsic clearance of midazolam towards its 1-OH metabolite was 24-38 fold higher than for its 4-OH metabolite. As reported in previous studies, the 1-hydroxylation is the preferential elimination pathway of

midazolam.(Heizmann and Ziegler, 1981; Williams et al., 2002; Emoto and Iwasaki, 2006)

The activity of CYP3A enzymes is highly variable among individuals and contributes greatly to the inter-subject variation in oral bioavailability and systemic clearance of CYP3A substrates. Genetic polymorphisms in CYP3A4 have failed to explain the inter-subject variability in drug disposition. On the other hand, CYP3A5 is polymorphically expressed and livers with the *CYP3A5*1* allele contain higher amounts of the native CYP3A5 protein than livers homozygous for the mutant *CYP3A5*3* and **6* alleles.(Kuehl et al., 2001) Results obtained in this study suggest that domperidone would be less sensitive to CYP3A5 genetic metabolisms for its oral clearance in human while being more sensitive to drug-drug interactions with inhibitors such as ketoconazole which target more selectively CYP3A4. On the other hand, midazolam clearance to its major 1-OH-metabolite would be more sensitive to genetic polymorphism associated with *CYP3A5*.

In conclusion, we and other had previously indicated that CYP3As are major enzymes involved in the metabolism of domperidone. Our current study now clearly demonstrates a 10 to 1 ratio in the intrinsic clearance of domperidone by CYP3A4 over CYP3A5. Furthermore, we have obtained confirmatory data on the effector role of cytochrome b_5 for CYP3As. Our results also further support observations suggesting allosteric kinetics for CYP3A4 and CYP3A5. Finally, ketoconazole is a more potent inhibitor of CYP3A4 compared to CYP3A5.

ACKNOWLEDGMENTS

Veronique Michaud is the recipient of a studentship from the Canadian Institutes of Health Research. Chantale Simard is the recipient of a chercheur boursier clinicien award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The laboratory of Dr Jacques Turgeon is funded by the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

- Allqvist A, Miura J, Bertilsson L and Mirghani RA (2007) Inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 catalyzed metabolism of alprazolam and quinine by ketoconazole as racemate and four different enantiomers. *Eur J Clin Pharmacol* **63**:173-179.
- Domanski TL, He YA, Khan KK, Roussel F, Wang Q and Halpert JR (2001) Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effect on substrate oxidation and cooperativity. *Biochemistry* **40**:10150-10160.
- Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA and Turgeon J (1998) Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation* **97**:204-210.
- Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R and Turgeon J (2000) Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation* **102**:1883-1885.
- Emoto C and Iwasaki K (2006) Enzymatic characteristics of CYP3A5 and CYP3A4: a comparison of in vitro kinetic and drug-drug interaction patterns. *Xenobiotica* **36**:219-233.
- Galetin A, Brown C, Halifax D, Ito K and Houston JB (2004) Utility of recombinant enzyme kinetics in prediction of human clearance: impact of variability, CYP3A5, and CYP2C19 on CYP3A4 probe substrates. *Drug Metab Dispos* **32**:1411-1420.
- Galetin A, Clarke SE and Houston JB (2003) Multisite kinetic analysis of interactions between prototypical CYP3A4 subgroup substrates: midazolam, testosterone, and nifedipine. *Drug Metab Dispos* **31**:1108-1116.
- Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntfuss D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP, Kleine K, Meyer UA and Wojnowski L (2001) Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* **11**:111-121.
- Ghosal A, Satoh H, Thomas PE, Bush E and Moore D (1996) Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* **24**:940-947.

- Giaccone G, Bertetto O and Calciati A (1984) Two sudden deaths during prophylactic antiemetic treatment with high doses of domperidone and methylprednisolone. *Lancet* **2**:1336-1337.
- Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T and Waxman DJ (1986) Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* **261**:5051-5060.
- Harlow GR and Halpert JR (1998) Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:6636-6641.
- Heizmann P and Ziegler WH (1981) Excretion and metabolism of ¹⁴C-midazolam in humans following oral dosing. *Arzneimittelforschung* **31**:2220-2223.
- Hirota N, Ito K, Iwatsubo T, Green CE, Tyson CA, Shimada N, Suzuki H and Sugiyama Y (2001) In vitro/in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Biopharm Drug Dispos* **22**:53-71.
- Houston JB and Kenworthy KE (2000) In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metab Dispos* **28**:246-254.
- Kenworthy KE, Clarke SE, Andrews J and Houston JB (2001) Multisite kinetic models for CYP3A4: simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism. *Drug Metab Dispos* **29**:1644-1651.
- Komori M, Nishio K, Fujitani T, Ohi H, Kitada M, Mima S, Itahashi K and Kamataki T (1989) Isolation of a new human fetal liver cytochrome P450 cDNA clone: evidence for expression of a limited number of forms of cytochrome P450 in human fetal livers. *Arch Biochem Biophys* **272**:219-225.
- Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ and Meyer UA (1989) Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol* **36**:89-96.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS and Schuetz E (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* **27**:383-391.

- Michaud V, Simard C and Turgeon J (2007) An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to in vitro drug metabolism studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **852**:611-616.
- Nakajima M, Tane K, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H and Yokoi T (2002) Evaluation of approach to predict the contribution of multiple cytochrome P450s in drug metabolism using relative activity factor: effects of the differences in expression levels of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5) in the expression system and the differences in the marker activities. *J Pharm Sci* **91**:952-963.
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE and Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos* **34**:880-886.
- Patki KC, Von Moltke LL and Greenblatt DJ (2003) In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5. *Drug Metab Dispos* **31**:938-944.
- Perloff MD, von Moltke LL, Court MH, Kotegawa T, Shader RI and Greenblatt DJ (2000) Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: relative contribution of CYP3A and CYP2C isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* **292**:618-628.
- Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* **34**:83-448.
- Rocha CM and Barbosa MM (2005) QT interval prolongation associated with the oral use of domperidone in an infant. *Pediatr Cardiol* **26**:720-723.
- Schenkman JB and Jansson I (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther* **97**:139-152.
- Schrag ML and Wienkers LC (2001a) Covalent alteration of the CYP3A4 active site: evidence for multiple substrate binding domains. *Arch Biochem Biophys* **391**:49-55.
- Schrag ML and Wienkers LC (2001b) Triazolam substrate inhibition: evidence of competition for heme-bound reactive oxygen within the CYP3A4 active site. *Adv Exp Med Biol* **500**:347-350.

- Shen L, Fitzloff JF and Cook CS (2004) Differential enantioselectivity and product-dependent activation and inhibition in metabolism of verapamil by human CYP3As. *Drug Metab Dispos* **32**:186-196.
- Shet MS, Faulkner KM, Holmans PL, Fisher CW and Estabrook RW (1995) The effects of cytochrome b5, NADPH-P450 reductase, and lipid on the rate of 6 beta-hydroxylation of testosterone as catalyzed by a human P450 3A4 fusion protein. *Arch Biochem Biophys* **318**:314-321.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:414-423.
- Shou M, Grogan J, Mancewicz JA, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV and Korzekwa KR (1994) Activation of CYP3A4: evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* **33**:6450-6455.
- Shou M, Lin Y, Lu P, Tang C, Mei Q, Cui D, Tang W, Ngui JS, Lin CC, Singh R, Wong BK, Yergey JA, Lin JH, Pearson PG, Baillie TA, Rodrigues AD and Rushmore TH (2001) Enzyme kinetics of cytochrome P450-mediated reactions. *Curr Drug Metab* **2**:17-36.
- Simard C, Michaud V, Gibbs B, Masse R, Lessard E and Turgeon J (2004) Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of domperidone. *Xenobiotica* **34**:1013-1023.
- Ward BA, Morocho A, Kandil A, Galinsky RE, Flockhart DA and Desta Z (2004) Characterization of human cytochrome P450 enzymes catalyzing domperidone N-dealkylation and hydroxylation in vitro. *Br J Clin Pharmacol* **58**:277-287.
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD and Wrighton SA (2002) Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* **30**:883-891.
- Yamaori S, Yamazaki H, Suzuki A, Yamada A, Tani H, Kamidate T, Fujita K and Kamataki T (2003) Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7. *Biochem Pharmacol* **66**:2333-2340.
- Yamazaki H, Johnson WW, Ueng YF, Shimada T and Guengerich FP (1996) Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of

cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome b5. *J Biol Chem* **271**:27438-27444.

Yamazaki H, Nakamura M, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, Shimada N, Guengerich FP, Shimada T, Nakajima M and Yokoi T (2002) Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **24**:329-337.

TABLE I

Kinetic parameters for the formation of major hydroxylated metabolite (M3) of domperidone. (mean \pm standard error; 95% confidence interval)

Enzymatic Sources	Km or S₅₀[*] (μ M)	Vmax (nmol/nmolP450/min)	CLint (mL/min/nmolP450)
Pool HLM	36 \pm 3	5.6 \pm 0.1	0.16
CYP3As	34 \pm 5	8.1 \pm 0.7	0.24
CYP3A4	15.3 \pm 1.7 (11.6-19.0)	6.6 \pm 0.2 (6.2-7.0)	0.43
CYP3A5	129 \pm 13 (102-157)	5.7 \pm 0.2 (5.3-6.2)	0.04
CYP3A4 plus CYP b ₅	49 \pm 5 (39.0-60.1) (n=1.3)	41.9 \pm 1.5 (38.7-45.0)	0.86
CYP3A5 plus CYP b ₅	94 \pm 11 (72-117)	14.9 \pm 0.6 (13.7-16.0)	0.16
CYP3A7 plus CYP b ₅	26.1 \pm 2.8 (20.1-32.2) (n=1.6)	1.19 \pm 0.05 (1.1-1.3)	0.05

*S₅₀ were calculated under conditions of positive or negative homotropic behavior. Hill's slope factor (N) is specified under such conditions.

TABLE II

Kinetic parameters for the formation of 1-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam. (mean \pm standard error; 95% confidence interval)

<i>Enzymatic Sources</i>	<i>1-OH midazolam</i>			<i>4-OH midazolam</i>		
	Km or S₅₀ (μ M)	Vmax (nmol/nmolP450/min)	CLint (mL/min/nmolP450)	Km or S₅₀ (μ M)	Vmax (nmol/nmolP450/min)	CLint (mL/min/nmolP450)
Pool HLM	7.5 \pm 1.6 (4.2-10.8)	3.54 \pm 0.3 (3.0-4.1)	0.47	45 \pm 5 (35-55)	1.35 \pm 0.05 (1.25-1.46)	0.030
CYP3A4	1.2 \pm 0.2 (0.7-1.7)	1.81 \pm 0.06 (1.67-1.94)	1.51	50 \pm 7 (35-66)	2.04 \pm 0.11 (0.93-2.26)	0.041
CYP3A5	3.4 \pm 0.5 (2.4-4.4)	6.13 \pm 0.17 (5.8-6.5)	1.80	21 \pm 1 (18.6-23.0)	1.37 \pm 0.02 (1.33-1.41)	0.065
CYP3A4 plus CYP b ₅	2.3 \pm 0.6 (1.0-3.6)	4.70 \pm 0.26 (4.15-5.24)	2.04	37 \pm 2 (33-40)	4.36 \pm 0.07 (4.21-4.52)	0.118
CYP3A5 plus CYP b ₅	4.2 \pm 0.7 (2.7-5.7)	10.45 \pm 0.38 (9.64-11.25)	2.47	24 \pm 2 (18.1-28.9) (n=1.3)	2.08 \pm 0.08 (1.90-2.27)	0.087
CYP3A7 plus CYP b ₅	16 \pm 2 (11.7-19.5)	1.81 \pm 0.07 (1.67-1.96)	0.12	13 \pm 1 (9.6-15.4) (n=1.5)	1.62 \pm 0.07 (1.46-1.78)	0.125

*S₅₀ were calculated under conditions of positive or negative homotropic behavior. Hill's slope factor (n) is specified under such conditions.

TABLE III

IC₅₀ values of ketoconazole determined for various enzymatic sources. (95% confidence intervals)

<i>Enzymatic Sources</i>	<i>M3-Domperidone</i> (μM)	<i>1-OH midazolam</i> (μM)	<i>4-OH midazolam</i> (μM)
Pool HLM	0.11 (0.05-0.24)	0.19 (0.13-0.29)	0.17 (0.13-0.21)
CYP3As	0.25 (0.15-0.44)	0.33 (0.19-0.58)	0.74 (0.47-1.16)
CYP3A4	0.05 (0.02-0.11)	0.12 (0.09-0.16)	0.10 (0.08-0.13)
CYP3A5	1.00 (0.56-1.79)	1.56 (0.68-3.54)	1.41 (0.41-4.8)
CYP3A4 plus CYP b ₅	0.27 (0.20-0.35)	0.07 (0.06-0.09)	0.08 (0.06-0.11)
CYP3A5 plus CYP b ₅	1.99 (0.38-10.4)	1.71 (0.66-4.46)	1.58 (0.65-3.84)

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Formation of the major hydroxylated domperidone metabolite (M3) by rCYP3A4 and rCYP3A5 with and without cytochrome b₅ (CYP b₅).

Figure 2 : Formation of hydroxylated metabolites of midazolam by A) rCYP3A4 and B) rCYP3A5, with and without cytochrome b₅ (CYP b₅).

Figure 3: Effects of cytochrome b₅ on the catalytic activity of CYP3A4 towards hydroxylation of major metabolite of domperidone (M3).

Figure 4: Inhibition by ketoconazole on the formation of A) domperidone major ring-hydroxylated metabolite (M3), B) 1-OH-midazolam and C) 4-OH-midazolam, in human liver microsomes (HLM), microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 (CYP3A), microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 (rCYP3A4) and CYP3A5 (rCYP3A5) with or without cytochrome b₅ (CYP b₅).

FIGURE 1

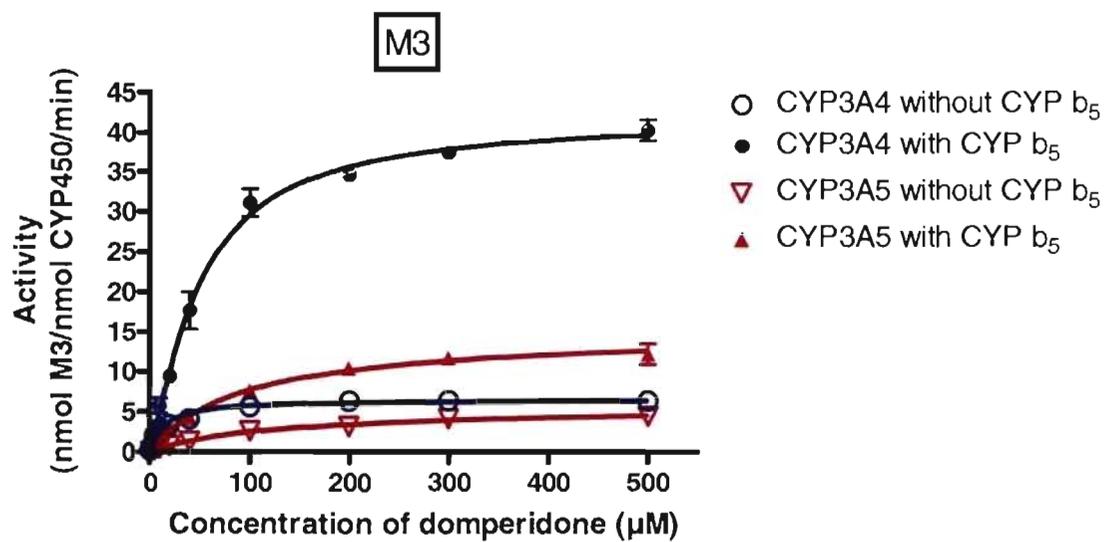
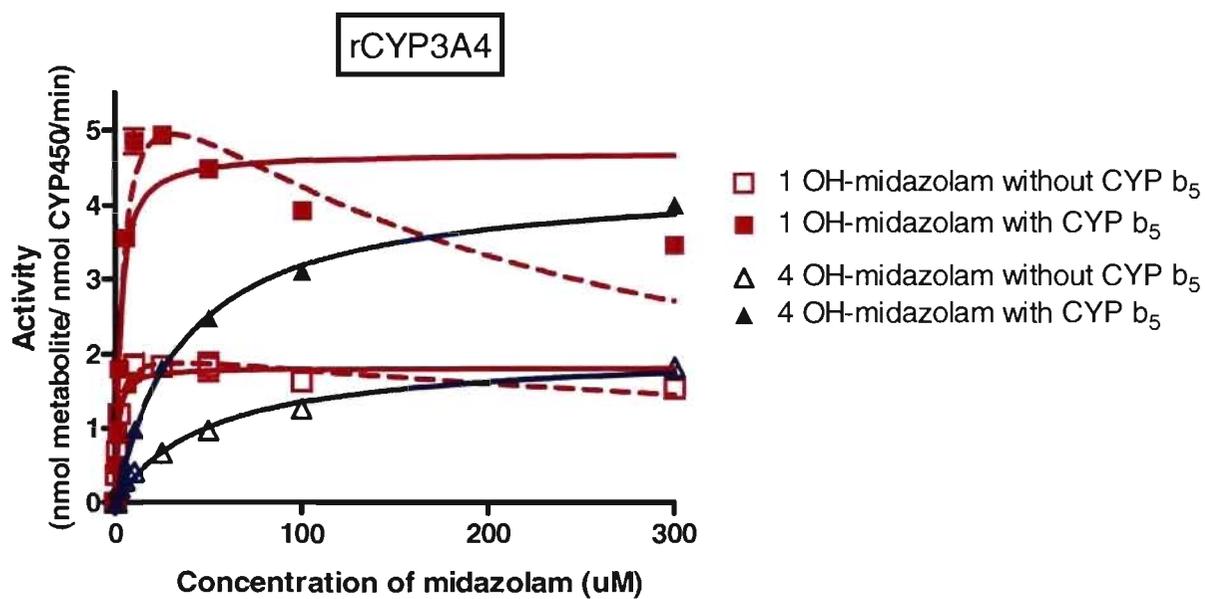


FIGURE 2

A)



B)

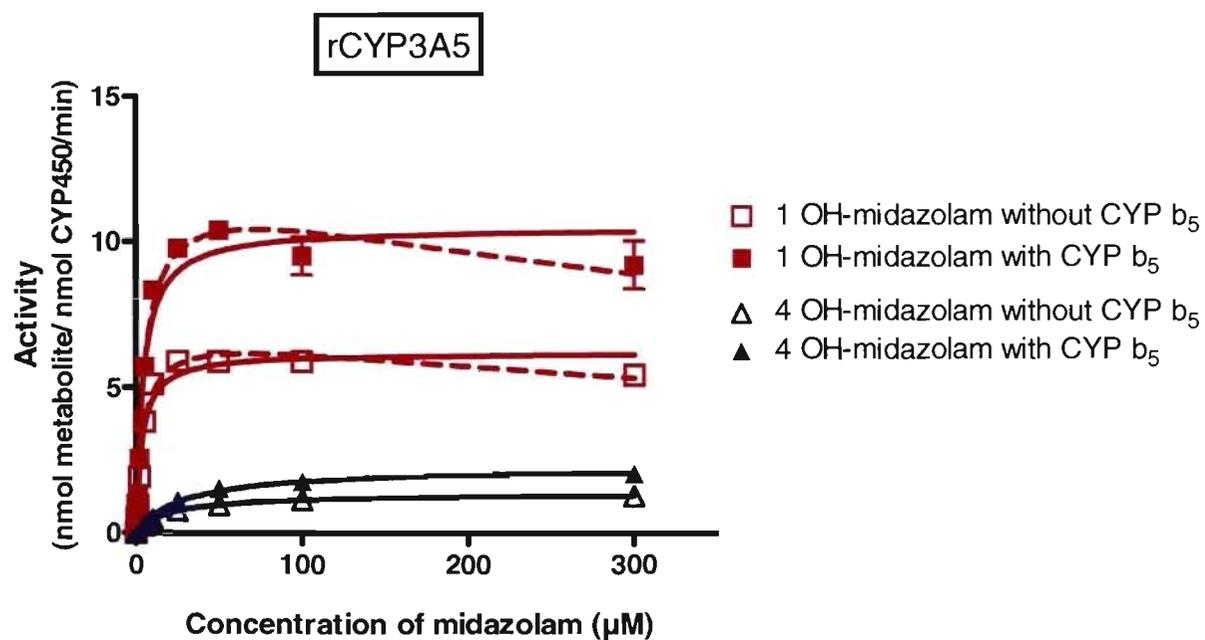


FIGURE 3

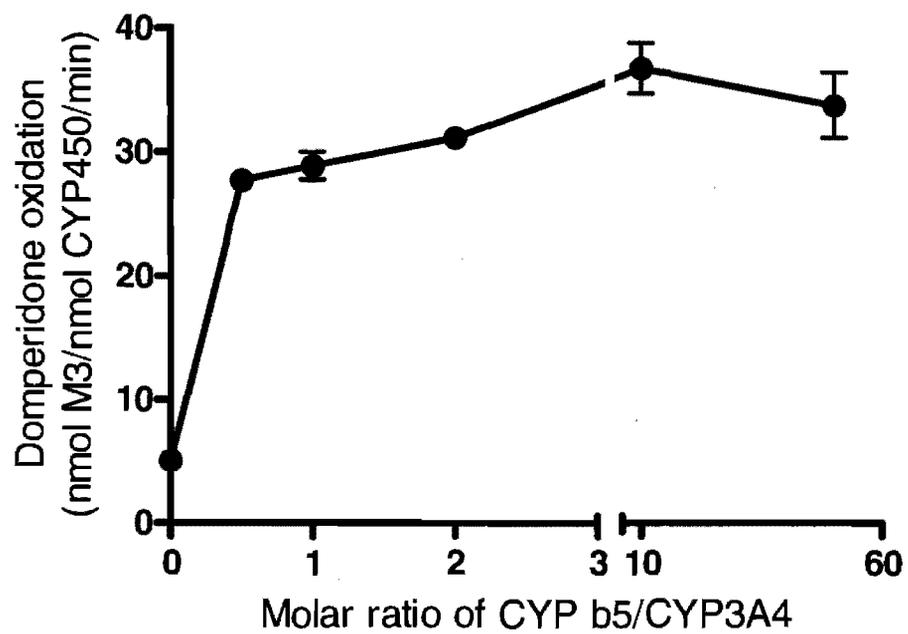
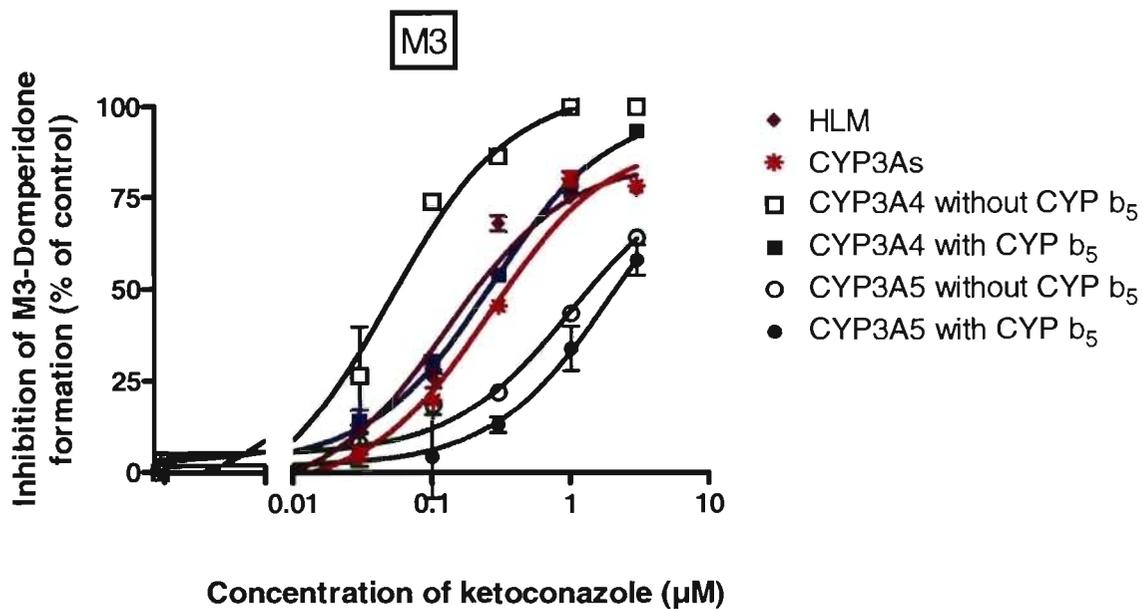


FIGURE 4

A)



B)

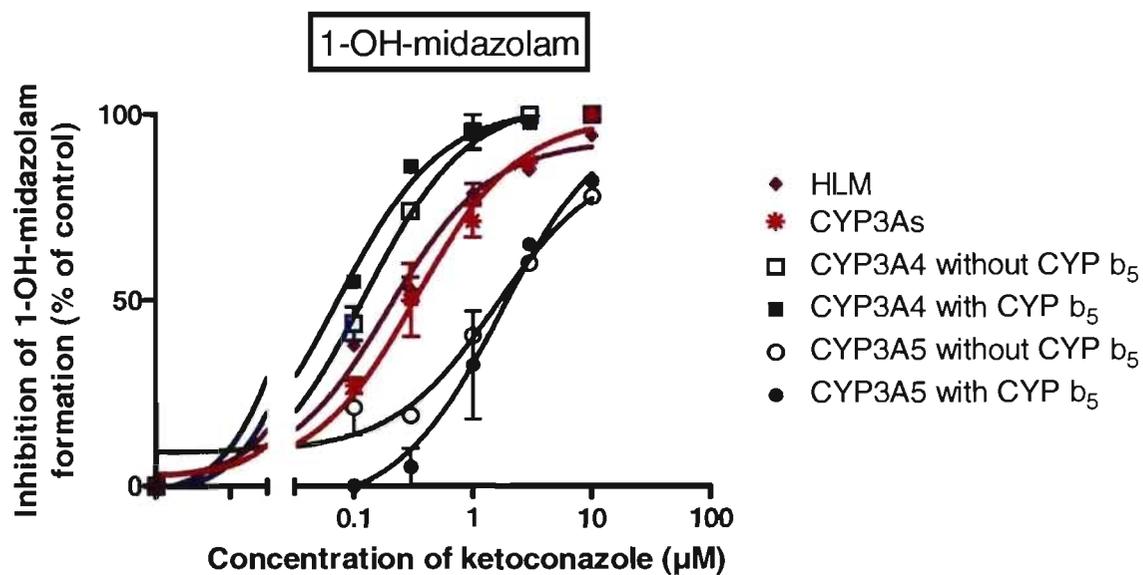
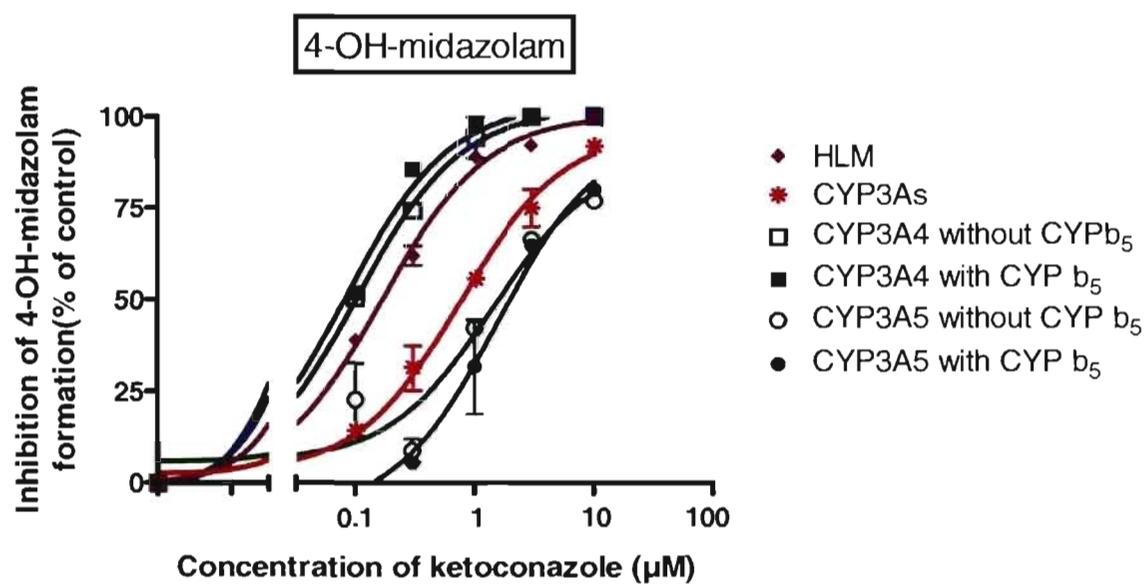


FIGURE 4

C)



vi) DISCUSSION

Brièvement, nos résultats montrent que la dompéridone est un substrat des CYP3A4 et CYP3A5 avec des affinités qui sont moindres en présence de cytochrome b5. Au contraire, en absence de cytochrome b5, la valeur du K_m est environ 8 fois supérieure en faveur du CYP3A4 comparativement au CYP3A5. De plus, l'ajout de cytochrome b5 augmente significativement l'activité des isoenzymes et cela, avec les deux substrats (dompéridone et midazolam) et avec les deux isoenzymes, soit CYP3A4 et CYP3A5. En présence de cytochrome b5, la formation du métabolite hydroxylé de la dompéridone, M3, est supérieure avec le CYP3A4 comparativement au CYP3A5. La dompéridone présente un profil cinétique relativement simple correspondant à une cinétique de Michaelis-Menten alors que la cinétique du midazolam est surtout caractérisée par des cinétiques atypiques. De plus, on observe que l'ajout de cytochrome b5 influence également l'inhibition par le kétoconazole. De fait, la valeur d' IC_{50} du kétoconazole est augmentée en présence de cytochrome b5 dans les études d'inhibition avec la dompéridone. À l'opposé, l'ajout de cytochrome b5 ne semble pas affecter la constante d'inhibition du kétoconazole (IC_{50}) obtenue avec le midazolam.

Les données concernant l'activité catalytique obtenue dans les systèmes composés d'enzymes recombinantes de CYP450 humains dans le but de prédire l'activité au sein des hépatocytes sont des déterminants majeurs du rôle des isoenzymes du CYP450 impliquées dans le métabolisme des médicaments. De fait, les études *in vitro* de métabolisme sont principalement réalisées avec des CYP450s recombinants provenant de différentes sources comme les microsomes préparés à partir de cellules lymphoblastiques, de levures, des cellules d'insectes transfectées par un baculovirus et des membranes d'*Escherichia coli* coexprimant des CYP450s. Cependant, il faut noter que l'activité et les paramètres cinétiques de plusieurs CYP450s diffèrent selon la source enzymatique utilisée. En effet, les différences observées avec les divers systèmes enzymatiques des CYP450s sont expliquées entre autres par un milieu de reconstitution différent (par exemple; les lipides) et la présence ou non de certains cofacteurs (par exemple; le cytochrome b5) qui ne sont pas similaires entre les différentes sources de CYP450. En particulier, suivant l'utilisation de différentes sources de CYP3A4 et CYP3A5, les résultats publiés montrent des variations importantes dans le métabolisme qui demeureraient souvent inexpliquées. Il est maintenant connu que l'activité des isoenzymes recombinantes

CYP3A4 et CYP3A5 peut être influencée par les conditions de reconstitution. Puisque les différentes sources enzymatiques présentent des conditions non uniformes et que les milieux de reconstitution sont très variables selon les différentes études, la comparaison des paramètres cinétiques rapportés dans ces études demeure très limitée.

Il existe des isoenzymes purifiées de CYP3A4 et CYP3A5 préparées à partir de cellules d'insectes infectées par un baculovirus qui coexpriment du cytochrome b5. Toutefois, le ratio cytochrome b5 : CYP450 n'est pas uniformisé et la proportion de CYP450 réductase a également tendance à varier dans ces préparations comparativement aux milieux sans coexpression de cytochrome b5. De plus, il est reconnu que les ratios de cytochrome b5 ou de réductase influencent le niveau d'interaction ce qui limite les comparaisons entre les expériences réalisées avec des isoenzymes coexprimant ou pas de cytochrome b5. Afin de limiter les variations possibles et d'être en mesure de comparer les données des expériences réalisées avec les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 en présence et en absence de cytochrome b5, des isoenzymes purifiées sans coexpression de cytochrome b5 ont été sélectionnées auxquelles des quantités variables puis fixes de cytochrome b5 purifiés ont été ajoutées.

L'effet du cytochrome b5 seul en présence des substrats comme la dompéridone et le midazolam a été évalué à titre de contrôle. Le cytochrome b5 seul n'a aucun effet sur la biotransformation des médicaments. Toutes les expériences menées avec du cytochrome b5 seules (en absence de CYP450) ont été négatives. De fait, ces expériences servaient de contrôles négatifs au même titre que les expériences effectuées sans le système régénérateur NADPH.

Comme il est décrit dans l'article, l'ajout de cytochrome b5 a augmenté les valeurs de clairance intrinsèque tant pour la dompéridone que pour le midazolam. Ainsi, l'utilisation d'enzymes recombinantes sans cytochrome b5 ne permet pas une estimation adéquate des paramètres pharmacocinétiques *in vitro*. Ces résultats sont en accord avec les données démontrant les effets allostériques et modulateurs du cytochrome b5. Kumar *et al.* ainsi que Yamada *et al.* ont proposé que l'interaction du cytochrome b5 avec le CYP450 entraînait un changement de conformation.^{272, 273} De plus, nos données montrent que l'inhibition par le kétoconazole peut également être affectée par la présence de cytochrome b5. Effectivement, la puissance inhibitrice du kétoconazole était supérieure envers le CYP3A4 en absence de

cytochrome b5 pour la dompéridone. Ceci suggère encore une fois le rôle modulateur du cytochrome b5 sur le CYP3A.

Une application inadéquate du modèle de cinétique à partir des expériences *in vitro* peut affecter de façon majeure l'estimation de la clairance intrinsèque d'un produit donné. Tel que décrit par Houston et Kenworthy, l'application du modèle de Michaelis-Menten à un profil cinétique décrivant une auto-inhibition du substrat (courbe convexe) peut résulter en une sous-estimation des valeurs du K_m et du V_{max} , alors que l'application du modèle de Michaelis-Menten à une cinétique de type sigmoïde cause une surestimation des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) à des concentrations faibles des substrats.^{274, 275} Il est important de noter que plusieurs études portant sur le métabolisme du midazolam ont rapporté une cinétique simple avec des paramètres cinétiques inférieurs à ceux obtenus dans notre étude. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une sous-estimation des paramètres cinétiques comme le V_{max} peut avoir lieu lorsqu'une auto-inhibition est observée si les données (correspondant aux concentrations plus élevées) ont été ignorées ou non évaluées. Cependant, il faut noter qu'un profil de cinétique atypique pour le midazolam décrivant une courbe convexe a déjà été rapporté par les groupes de Kronbach *et al.*, de même que Ghosal *et al.*^{276, 277}

Houston et Kenworthy suggèrent qu'un minimum de dix points (avec une échelle de concentrations de très faibles à très élevées) est requis afin d'établir clairement une cinétique atypique.²⁷⁴ Une autre étude a même proposé que 20 à 30 points seraient encore plus adéquats pour définir et dériver une courbe atypique et cela, particulièrement au niveau des points d'inflexion.²⁷⁸ Bien que le nombre de points soient dans la limite inférieure ($n=10$), nos données suggèrent fortement une cinétique atypique pour le 1-hydroxymidazolam. Par ailleurs, nos données ne permettent pas de conclure et de confirmer un profil atypique pour le 4-hydroxymidazolam en raison d'une quantité insuffisante de données à faibles concentrations de substrat. De plus, soulignons qu'une différence dans le profil cinétique pour le 4-hydroxymidazolam semble présente entre les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5. Une cinétique biphasique apparaît représenter plus adéquatement les paramètres pour le CYP3A4 avec ou sans cytochrome b5, alors qu'en présence de CYP3A5 avec cytochrome b5, une tendance pour une cinétique de type sigmoïde est observée. Cependant, cette affirmation demeure à confirmer dû encore une fois à un nombre important mais insuffisant de données. De fait, des données additionnelles en dessous du point d'inflexion correspondant à des

concentrations plus faibles de 4-hydroxymidazolam seraient nécessaires afin de vérifier correctement cette hypothèse. Il faut se rappeler que l'objectif n'était pas de caractériser ni de définir la présence de cinétique atypique des substrats à l'étude, mais plutôt d'évaluer leur métabolisme par les différentes isoenzymes des CYP3As. Les courbes obtenues avec le midazolam ne pouvant être décrites correctement par une cinétique simple de Michaelis-Menten, nous avons alors tenté de dériver adéquatement la courbe par une cinétique non Michaelis-Menten.

Plusieurs questions demeurent quant aux avantages biologiques du phénomène «d'allostérisme» des CYP450s. Plusieurs scientifiques se questionnent sur les raisons pour lesquelles certaines isoenzymes des CYP450s possèderaient des substrats qui seraient métabolisés plus efficacement alors que d'autres seraient métabolisés moins efficacement en présence d'effecteurs allostériques comme le cytochrome b5. Les résultats de notre étude suggèrent que les études de métabolisme *in vitro* réalisées avec des isoenzymes purifiées de CYP3A4 et CYP3A5 devraient évaluer l'effet du cytochrome b5 afin d'obtenir une estimation adéquate de la clairance intrinsèque.

De plus, nos résultats suggèrent que les études *in vitro* devraient évaluer la contribution des différentes isoenzymes des CYP3As puisqu'elles ne présentent pas les mêmes caractéristiques bien qu'elles soient similaires. Également, cette étude a montré que l'effet du cytochrome b5 devrait être évalué afin de déterminer adéquatement les paramètres pharmacocinétiques *in vitro* pour des substrats des CYP3As. L'effet modulateur du cytochrome b5 qui diffère selon les substrats et l'isoenzyme étudiée (CYP3A4 vs CYP3A5 vs CYP3A7) est en accord avec le caractère «allostérique» proposé dans la littérature pour les CYP3As.^{163, 266}

Nous proposons donc que les effets du cytochrome b5 et que le type de cinétique soient décrits afin d'établir les paramètres pharmacocinétiques *in vitro* de façon précise et de permettre une extrapolation *in vivo* adéquate.

SECTION 2.1.1

ARTICLE #3

Competitive and mechanism-based inhibition of CYP3As by clarithromycin: comparison between various enzymatic sources including a new-cell based assay using freshly isolated human hepatocytes.

i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Mise en contexte du projet : L'utilisation de la dompéridone a connu une recrudescence suite au retrait du marché du cisapride, un modulateur de la motilité gastro-intestinale qui était alors largement prescrit. La dompéridone, déjà sur le marché canadien depuis de nombreuses années, a alors été proposée en remplacement du cisapride. Toutefois, il existe plusieurs similitudes entre ces deux molécules qui soulèvent des interrogations quant à l'innocuité de la dompéridone. De fait, la dompéridone et le cisapride sont des substrats des CYP3As. De plus, des études antérieures menées dans le laboratoire ont montré que ces deux molécules possèdent une action inhibitrice sur des canaux potassiques responsables de la repolarisation cardiaque pouvant ainsi prolonger l'intervalle QT. Sachant que des interactions médicamenteuses significatives et majeures sont rapportées en clinique avec la clarithromycine et des médicaments substrats des CYP3As et connaissant le profil d'effets indésirables associé à la dompéridone, il y a donc un intérêt à identifier la possibilité d'interaction suivant la co-administration de cet antibiotique avec la dompéridone.

Objectifs : Les objectifs de ce projet de recherche sont d'évaluer *in vitro* l'interaction médicamenteuse potentielle entre la clarithromycine et la dompéridone. Dans un premier temps, nous voulons identifier la présence possible d'une interaction, la quantifier et finalement, expliquer le mécanisme sous-jacent en proposant et en mettant au point un modèle *in vitro*.

ii) INTRODUCTION

L'administration concomitante de xénobiotiques peut entraîner une réduction de l'activité catalytique des CYP450s par différents types d'inhibition. Les étapes du cycle catalytique où les CYP450s sont particulièrement vulnérables à l'inhibition sont : 1) la liaison du substrat, 2) la liaison de la molécule d'oxygène suivant le transfert du premier électron et 3) l'étape dans laquelle le substrat est oxydé. Les inhibiteurs des CYP450s sont divisés en trois classes distinctes incluant les inhibiteurs réversibles, quasi-irréversibles et irréversibles :

Les composés interférant avec le site catalytique avant la réaction d'oxydation sont principalement des inhibiteurs réversibles de nature compétitive. Brièvement, l'inhibition compétitive constitue une inhibition où l'inhibiteur entre en compétition avec le médicament pour le même site de liaison au site catalytique de l'enzyme. Par ailleurs, on retrouve des inhibiteurs non-compétitifs qui se lient également de manière réversible. L'inhibition non-compétitive, laquelle est peu fréquente, possède un profil d'inhibition caractérisé par une liaison de l'inhibiteur avec la même enzyme que le médicament substrat mais dont le site de liaison diffère : l'inhibiteur et le substrat n'entrent donc pas en compétition pour leur fixation à l'enzyme. L'inhibiteur non-compétitif entraîne une modification de la conformation du site actif, ce qui empêche la transformation du substrat, mais n'influence pas la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat. Le degré d'inhibition par des inhibiteurs non-compétitifs sera indépendant de la concentration du substrat contrairement à l'inhibiteur compétitif. En présence d'un inhibiteur non-compétitif, une diminution de la vitesse de réaction métabolique (V_{max}) est observée tandis que l'inhibiteur compétitif cause un changement de la constante d'affinité (K_m apparent augmenté).

Les agents agissant durant ou suivant l'étape du transfert de la molécule d'oxygène sont généralement des inhibiteurs irréversibles ou quasi-irréversibles dont plusieurs d'entre eux sont sous-catégorisés comme des «mechanism-based inactivators». Succinctement, certaines molécules nécessitent une activation métabolique par l'enzyme pour former des métabolites intermédiaires lesquels peuvent former des complexes très stables avec le groupement prosthétique confinant l'enzyme dans un état inactif. L'importance de ce complexe est telle qu'il est considéré comme quasi-irréversible. Bien qu'*in vitro* ces complexes métaboliques intermédiaires puissent être renversés libérant ainsi le métabolite intermédiaire du site actif, en situation *in vivo* ces complexes sont excessivement stables et l'activité enzymatique ne semble pouvoir être rétablie que par la synthèse de nouvelles enzymes.²⁷⁹ Quant à l'inhibition irréversible, elle résulte de la formation de liens covalents ne pouvant être rompus afin de régénérer une enzyme fonctionnelle. De fait, certains inhibiteurs irréversibles requièrent aussi une activation par l'enzyme formant des métabolites intermédiaires. Ces derniers causent une inactivation irréversible de l'enzyme avant qu'ils soient libérés du site actif de l'enzyme. Le présent chapitre portera particulièrement sur les inhibitions classifiées irréversibles et quasi-irréversibles de type «mechanism-based inhibition» (plusieurs termes sont utilisés pour désigner ce type d'inhibition : «mechanism-based inactivation», «enzyme-activated irreversible inhibition», «catalysis-dependent inactivators» et «suicide-inactivation»).

Les substances métabolisées par les CYP450s génèrent soit un métabolite stable, soit un métabolite réactif ou un métabolite intermédiaire. Ces entités réactives peuvent former un lien covalent avec des macromolécules hépatiques ce qui peut induire de la toxicité hépatique. Les enzymes des CYP450s peuvent d'une part générer ces entités chimiques réactives et d'autre part, elles peuvent aussi être leur cible et former une liaison covalente avec ces dernières. Les composés transformés via l'activité des CYP450s en des entités réactives ou intermédiaires qui se lient de façon covalente au site catalytique ou au niveau d'un site critique de l'enzyme causent une inactivation ou une inhibition irréversible. Un inhibiteur «mechanism-based inhibitor» se lie au site actif et devient alors activé par l'enzyme.²⁸⁰ La forme activée de la molécule se liera de façon irréversible à l'enzyme la retirant ainsi du pool actif d'enzymes disponibles.

Dans les années 80, Rando et Silverman ont défini les critères décrivant les «mechanism-based inactivators».^{281, 282} Parmi les «mechanism-based inactivators» des CYP450s, on considère généralement les quatre classes suivantes; 1) les composés se liant de façon covalente à l'apoprotéine, 2) les composés alkylant la structure porphyrine du groupement hème, 3) les composés qui détruisent le groupement prosthétique hème et finalement, 4) les composés désignés comme quasi-irréversibles lesquels forment un complexe métabolique intermédiaire avec l'atome de fer du groupement hème du CYP450.²⁸³ Cette classification n'est pas rigide en ce sens que le métabolisme d'un composé peut simultanément se subdiviser et partager deux ou plusieurs trajectoires inhibitrices.

On tend à attribuer une spécificité enzyme-substrat hautement supérieure pour les inhibiteurs de type «mechanism-based inhibitor». Ceci est expliqué par le fait que ces inhibiteurs doivent satisfaire à certains critères dont 1) ils doivent se lier de façon réversible à l'enzyme et donc satisfaire aux contraintes imposées à tous les substrats normaux de cette enzyme, 2) ils doivent ensuite être acceptés à titre de substrat et ainsi subir l'activation catalytique et finalement, 3) l'entité intermédiaire réactive formée doit altérer l'enzyme de façon irréversible ou quasi-irréversible la retirant ainsi du pool catalytique actif.²⁸³

Le concept de complexe métabolique intermédiaire fut décrit pour la première fois dans les années soixante-dix. Il avait été rapporté que plusieurs composés aminés, dont des dérivés d'amphétamines, étaient métabolisés par un système enzymatique microsomal oxydatif hépatique en des composés intermédiaires. Ces derniers se

liaient aux CYP450s produisant un complexe qui était détectable par spectrométrie avec une absorbance maximum à une longueur d'onde à ~455 nm. Les études menées par Franklin avaient également montré que la capacité à former des complexes métaboliques intermédiaires était augmentée suivant un traitement avec le phénobarbital, mais légèrement diminué avec des inducteurs comme le 3-méthylcholantrène.^{284, 285} Le même groupe a aussi rapporté que la quantité de complexes métaboliques intermédiaires formés pouvait différer entre les tissus et que la formation de complexes métaboliques intermédiaires dans les tissus extra-hépatiques était peu affectée par la présence d'inducteurs comparativement au foie.²⁸⁶

Il faut également souligner que le complexe métabolique intermédiaire, catalytiquement inactif, est incapable de lier le monoxyde de carbone.²⁸⁷ De plus, le complexe peut être détruit lorsque le fer est oxydé à un état ferrique. Ce déplacement est seulement possible sous des conditions expérimentales non-physiologiques. En effet, il a été observé que l'ajout de ferricyanide de potassium en présence de microsomes oxydait le fer, détruisait le complexe et libérait la forme active du CYP450.²⁸⁸⁻²⁹⁰ Donc, le recouvrement de la forme active de l'enzyme permettait alors de lier le monoxyde de carbone et ainsi, d'évaluer quantitativement la forme complexée de celle non-complexée.

Plusieurs médicaments inhibiteurs utilisés en clinique sont des «mechanism-based inactivators» en raison de la formation d'un complexe métabolique intermédiaire avec une isoforme des CYP450s. Parmi ces médicaments inhibiteurs, on retrouve des antibiotiques macrolides, des bloqueurs des canaux calciques et des inhibiteurs sélectifs de la sérotonine. Il faut souligner que le concept de polythérapie médicamenteuse est une réalité en clinique. Par conséquent, en présence d'une co-administration de médicaments, l'inactivation des CYP450s par l'un des médicaments résultera en une inhibition du métabolisme du médicament lui-même ainsi que celui des médicaments co-administrés métabolisés via cette isoenzyme. Il est important de réaliser que ces régimes thérapeutiques basés sur une polypharmacie comportant des inhibiteurs potentiels et des substrats augmentent le potentiel d'interactions médicamenteuses cliniquement significatives.

Il faut aussi noter que la nature irréversible (ou pratiquement irréversible) de la liaison du métabolite intermédiaire avec l'enzyme cible du CYP450 permet une inhibition prolongée et cela, même après l'arrêt du médicament causant un complexe intermédiaire. Par conséquent, une interaction médicamenteuse pourra

persister au-delà du temps d'administration du médicament qui a inactivé l'enzyme par la formation de complexes métaboliques intermédiaires. Ainsi, l'activité catalytique globale de l'enzyme pour les autres médicaments substrats de celle-ci étant réduite causera une diminution de leur clairance métabolique qui perdurera dans le temps. En effet, la réversibilité de l'effet inhibiteur sera fonction de la présence de l'inactivateur et de la resynthèse de nouvelles protéines fonctionnelles. Le «turnover» de l'enzyme est déterminé par deux processus ; soit la dégradation de la protéine et la dégradation de l'hème. L'approche permettant une mesure directe de la cinétique de dégradation de l'enzyme nécessite un échantillonnage invasif de tissus hépatiques. Toutefois,, cette approche ne fut évaluée qu'auprès de rongeurs fournissant par exemple chez le rat, une estimation de la demi-vie (turnover half-lives) qui varie entre 10h (Correia *et al.*), 6-7h (Robert *et al.*) et 14h (Watkins *et al.*) pour différentes isoformes dont les CYP1A2, CYP2E1 et CYP3A.²⁹¹⁻
²⁹⁵ Il est estimé que les demi-vies des CYP450s chez le rat sont probablement plus courtes que leurs homologues chez l'humain. Par conséquent, l'extrapolation de ces données calculées chez le rat à l'humain risque de sous-évaluer le potentiel d'interactions médicamenteuses par «mechanism-based inhibition» puisque les modèles mathématiques estimant l'interaction médicamenteuse par ce type de mécanisme nécessitent entre autres l'utilisation de la constante de dégradation.

Pour être qualifié de «mechanism-based inhibitors», les inhibiteurs doivent satisfaire à certains critères incluant ; 1) une inhibition influencée par une préincubation temps-dépendante, 2) aucune inhibition en absence de cofacteurs dans le milieu de préincubation lesquels sont nécessaires pour l'activation de l'inhibiteur (c'est-à-dire que la formation du métabolite intermédiaire requiert un CYP450 fonctionnel dont l'activité est dépendante du NADPH), 3) une potentialisation de l'inhibition selon la concentration de l'inhibiteur, 4) une activité enzymatique qui n'est pas régénérée suivant une filtration sur gel ou une dialyse et finalement, 5) une stochiométrie d'inactivation 1 pour 1 (inhibiteur-site actif de l'enzyme).²⁹⁶

iii) COMPLEXE MÉTABOLIQUE INTERMÉDIAIRE ET CYP3A4

Les isoenzymes de la famille CYP3A sont responsables du métabolisme d'une grande variété de substrats appartenant à différentes classes thérapeutiques et de structures très diverses. En plus d'être impliqués dans la biotransformation d'un

nombre important de médicaments largement prescrits, cette faible spécificité des substrats rend les CYP3As davantage susceptibles aux inhibitions réversibles et irréversibles par une variété de médicaments.²⁹⁷ Les médicaments qui inhibent les CYP3As par la formation de complexes métaboliques intermédiaires comprennent des antibiotiques (érythromycine, clarithromycine et isoniazide), des agents anticancéreux (tamoxifène et ironotécan), des antirétroviraux (ritonavir et delavirdine), des antihypertenseurs bloquant des canaux calciques (vérapamil et diltiazem), des hormones stéroïdiennes et certains constituants retrouvés dans des produits naturels (bergamottin). Il est logique d'anticiper que l'inactivation des CYP3As par divers médicaments pourraient augmenter la biodisponibilité de médicaments co-administrés qui sont principalement métabolisés par les CYP3As. Ceci pourrait s'expliquer par l'inhibition intestinale et hépatique des CYP3As.²⁹⁸

Plusieurs des inactivateurs du CYP3A sont également des inducteurs, des substrats ou des inhibiteurs de transporteurs comme la glycoprotéine-P. Ceci a créé une confusion importante lors de l'extrapolation des données *in vitro* à la situation *in vivo*. La prédiction des interactions médicamenteuses impliquant une inhibition par formation de complexes métaboliques intermédiaires est très difficile. De plus, le résultat clinique final sera dépendant de facteurs associés tant au patient (par exemple, les polymorphismes génétiques, le niveau d'expression des isoenzymes, la co-médication) qu'au médicament inhibiteur (par exemple, le temps d'exposition médicament-enzyme, les paramètres pharmacocinétiques comme la constante d'inhibition et la constante d'inactivation, la vitesse de la resynthèse de l'isoenzyme). De fait, un point important à souligner est que ce type d'inhibition et par conséquent l'interaction qui en découlera, est dépendante de la concentration et du temps. De plus, il a été remarqué qu'*in vivo*, l'effet inhibiteur par «mechanism-based inactivation» était davantage observé suivant l'administration répétée du médicament et la durée d'inhibition était plus étendue que celle des inhibiteurs réversibles.²⁹⁹ L'étendue d'une interaction médicamenteuse secondaire à une inactivation de CYP3As est dépendante du temps pour le début, c'est-à-dire le temps prérequis pour voir l'inhibition s'installer mais également du temps nécessaire pour voir disparaître l'inhibition.

Par exemple, il a été rapporté que la diminution de la clairance de l'alfentanil n'était pas significative suite à la première dose d'érythromycine alors que la clairance était diminuée de 25% après 7 jours de co-administration.³⁰⁰ Okudaira *et al.* ont évalué l'effet de doses répétées d'érythromycine dans le temps sur l'activité des CYP3As

chez des sujets volontaires sains. Le midazolam était utilisé comme substrat de l'activité des CYP3As. Ils ont observé une prolongation significative et supérieure de la demi-vie d'élimination du midazolam suivant un prétraitement de 4 et 7 jours d'érythromycine comparé à 2 jours d'exposition à l'antibiotique. Ils rapportent une relation entre la durée du traitement à l'érythromycine et la clairance totale du midazolam. Leurs données indiquent qu'un traitement de 4 jours et plus avec l'érythromycine est nécessaire pour atteindre le plateau maximal d'inhibition.³⁰¹

Il ne semble pas exister une structure commune déterminant si un composé est un «mechanism-based inhibitor» des CYP3As. Toutefois, il est connu que plusieurs de ces inhibiteurs partagent plusieurs caractéristiques communes comme la présence d'une amine primaire (des amines secondaires et tertiaires peuvent aussi être des précurseurs), d'un anneau furane et d'un groupement acétylène.^{283, 302} L'amine primaire est hydroxylée puis l'hydroxylamine subit une oxydation de l'azote entraînant la formation d'un composé nitroso lequel serait responsable de la chélation avec le fer. Pour les macrolides qui sont des amines secondaires, il semble que la formation de ces complexes métaboliques soit initiée et dépendante d'une N-déméthylation. Toutefois, les macrolides ne produisent pas tous des complexes métaboliques inactivant les CYP450s. En effet, Miura *et al.* ont rapporté que les macrolides «16-membered» ne forment généralement pas de complexes métaboliques intermédiaires.³⁰³ D'ailleurs, les auteurs mentionnent que les interactions médicamenteuses cliniques surviennent moins fréquemment avec les macrolides «16-membered» comparativement aux macrolides «14-membered».³⁰³ Par exemple, l'administration de doses répétées chez le rat de dirithromycine, josamycine, midecamycine, miocamycine ou de roxithromycine n'a produit aucun complexe intermédiaire.^{287, 304-306}

Quelques études récentes ont suggéré qu'il existe une différence quant à l'inhibition par «mechanism-based inhibition» entre les CYP3A4 et CYP3A5.^{307, 308} Wang *et al.* ont étudié l'ampleur de l'inhibition et la formation de complexes métaboliques intermédiaires du S- et R-vérapamil en présence de CYP3A4 ou de CYP3A5.³⁰⁷ Contrairement au CYP3A4, aucun pic d'absorption caractéristique à 455 nm n'a été identifié avec le CYP3A5 lorsqu'incubés avec le vérapamil. Ceci indique que le CYP3A5 n'a pas formé de complexes métaboliques intermédiaires en présence de vérapamil. De plus, aucune différence quant à l'absorbance n'a été observée avec l'augmentation des temps de préincubation. Également, ils ont évalué l'effet de l'expression du CYP3A5 dans des microsomes hépatiques humains sur la capacité

d'inhibition du vérapamil. La capacité du vérapamil à inhiber l'activité totale des CYP3As était réduite lorsque du CYP3A5 étaient présents dans les microsomes hépatiques. Ils ont même rapporté que l'efficacité d'inactivation de vérapamil était 30 fois moindre dans les microsomes exprimant du CYP3A5 comparativement aux microsomes exprimant seulement du CYP3A4. Le groupe de McConn *et al.* a aussi noté ce phénomène décrivant une inactivation plus efficace dans les microsomes dépourvus de CYP3A5.³⁰⁸ De même, aucun pic de formation de complexes métaboliques intermédiaires n'était discernable suivant les incubations de CYP3A5 avec les différents inhibiteurs évalués soit : l'érythromycine, le diltiazem et la nicardipine lesquels ont tous montrés leur capacité à former des complexes intermédiaires avec le CYP3A4.^{304, 308-310}

Étant donné le rôle crucial des isoenzymes des CYP450s dans le métabolisme des médicaments, une inactivation significative de l'une des isoformes et particulièrement du CYP3A4 (isoenzyme majeure hépatique et intestinale) peut causer des interactions médicamenteuses et des effets indésirables majeurs. Les interactions médicamenteuses les plus fréquentes impliquent principalement une inhibition par inactivation des CYP3As.²⁹⁸ Lors du développement des médicaments, l'évaluation précoce des inhibitions par inactivation («mechanism-based inhibition») des CYP3As pourrait jouer un rôle important dans le design des études *in vitro*. Tel que mentionné par Zhou *et al.*, la reconnaissance tardive d'interactions médicamenteuses dues à une modulation des CYP3As exposent les patients à des risques de toxicité.^{298, 311} Actuellement, il est impossible de prédire quels médicaments seront associés à la formation de métabolites réactifs intermédiaires avec une inactivation des CYP3As. Il existe donc un intérêt à évaluer correctement par des études *in vitro* ce type d'inhibition puisque les conséquences cliniques peuvent être majeures.

iv) ARTICLE

Competitive and mechanism-based inhibition of CYP3As by clarithromycin: comparison between various enzymatic sources including a new-cell based assay using freshly isolated human hepatocytes.

Article soumis: Drug Metabolism and Disposition

Véronique Michaud and Jacques Turgeon

**COMPETITIVE AND MECHANISM-BASED INHIBITION OF CYP3As BY CLARITHROMYCIN:
COMPARISON BETWEEN VARIOUS ENZYMATIC SOURCES INCLUDING A NEW CELL-BASED
ASSAY USING FRESHLY ISOLATED HUMAN HEPATOCYTES.**

Veronique Michaud B.Pharm., M.Sc. and Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.
CRCHUM, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and
Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

CORRESPONDANCE: Jacques Turgeon, B.Pharm., PhD.
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Hotel-Dieu, Masson Pavilion
3850 St. Urbain street, Room 8-107
Montréal, Québec, Canada
H2W 1T7

NUMBER OF TEXT PAGES: 17
NUMBER OF TABLES: 0
NUMBER OF FIGURES: 8
NUMBER OF REFERENCES: 34
NUMBER OF WORDS IN THE ABSTRACT: 282
NUMBER OF WORDS IN THE INTRODUCTION: 714
NUMBER OF WORDS IN THE DISCUSSION: 1204

ABSTRACT

Clarithromycin is involved in a large number of clinically relevant drug-drug interactions with CYP3A substrates. Discrepancies are observed between the magnitude of drug interactions predicted from *in vitro* competitive inhibition studies and changes observed clinically in the plasma levels of affected CYP3A substrates. The formation of metabolic-intermediate complexes has been proposed to explain these differences. The objectives of our study were 1) To determine the competitive inhibition potency of clarithromycin on the metabolism of two CYP3A probe drugs (midazolam and domperidone) using human recombinant CYP3A4 and CYP3A5 isoenzymes, human liver microsomes and cultured human hepatocytes, 2) To establish the modulatory role of cytochrome b5 on the competitive inhibition potency of clarithromycin on the metabolism of these two CYP3A probe drugs, 3) To demonstrate the clarithromycin-induced formation of cytochrome P450 metabolic-intermediate complexes in human liver microsomes, and 4) To determine the extent of CYP3A inhibition due to metabolic-intermediate complex formation using human liver microsomes and freshly isolated and cultured human hepatocytes. Clarithromycin at high concentrations (70 μ M-100 μ M) had weak inhibition potency towards CYP3A4 and CYP3A5. Inhibition potency was further decrease by the addition of cytochrome b5 which is in agreement with very weak inhibition (0-9%) observed with human liver microsomes. Clarithromycin-induced metabolic-intermediate complexes were revealed by a spectrophotometric analysis and time- and concentration-dependent mechanism-based inhibitions were easily revealed using human liver microsomes and hepatocytes. These results indicate that mechanism-based not competitive inhibition of CYP3As is a major constituent of the underlying mechanism of drug-drug interactions observed clinically with clarithromycin. Drug interactions between clarithromycin and CYP3A substrates are predicted to be insidious as the risk of severe adverse events would increase over time and persists during few days after cessation of the drug.

INTRODUCTION

The CYP3A family – especially CYP3A4 and CYP3A5 – recognises a wide range of substrates and mediates the metabolism of approximately half of currently marketed drugs. Consequently, CYP3A isozymes are involved in a large number of clinically relevant drug-drug interactions which constitute an important issue in clinical practice (~4.6% of hospitalisations/year).¹ Indeed, severe adverse drug events caused by drug-drug interactions have received a lot of attention lately due to malignant ventricular arrhythmias and deaths reported following the concomitant administration of CYP3A inhibitors such as ketoconazole, erythromycin or clarithromycin and drugs such as terfenadine, astemizole, pimozide or cisapride. All of these drugs are CYP3A substrates which undergo extensive first-pass metabolism when administered orally and all of them display I_{Kr} blocking properties associated with a prolongation of the QT interval.²⁻⁸

Reversible competitive inhibition is *a priori* the most generally anticipated, considered and recognized mechanism underlying drug-drug interactions involving the CYP450 system. Hence, competitive inhibition of one CYP450 isozyme by a potent inhibitor or by a high affinity substrate often translates clinically into significant changes in the pharmacokinetic profile of another drug substrate of the same isozyme. The extent of changes observed in the overall clearance, maximal concentration (C_{max}) or half-life of that drug depends on its characteristics (partial metabolic clearance through this isozyme and hepatic-intestinal extraction ratio) as well as on the competitive inhibitor potency. When reversible competitive inhibition is the major mechanism of drug interactions, extrapolation of *in vitro* kinetics data (K_i or IC₅₀) obtained for various CYP450 isozymes with various conventional enzymatic systems (human microsomes, yeast or insect human recombinant enzymes) to the clinical situation is rather satisfactory.

However, the quantitative prediction of drug-drug interactions involving CYP3As is rather difficult because CYP3A4 substrates and inhibitors often exhibit atypical non-Michaelis-Menten complex kinetics. Furthermore, it is now recognized that a series of CYP3A4 substrates act as mechanism-based inhibitors, a characteristic that may be difficult to detect using conventional *in vitro* enzymatic systems. This should not be underestimated since drug-drug interactions that happen through mechanism-based inhibition of CYP450s are associated with a reduction in the metabolic

clearance of a substrate that can be more severe and long-lasting than reversible competitive inhibition.⁹⁻¹¹

Mechanism-based inhibitors cause the inactivation of CYP450 isozymes through the formation of a metabolite that is not released but that rather binds covalently to the enzyme leading to its inactivation (formation of metabolic-intermediate complexes). Reports accumulate suggesting that CYP3A inhibition by macrolide antibiotics (mostly erythromycin, clarithromycin and troleandomycin) is mostly explained by inactivation of enzymes attributable to the formation of metabolic-intermediate complexes. The *in vitro* characterization of metabolic-intermediate complexes is often difficult and imprecise. This is mostly due to the low detectable levels of Soret peaks associated with CYP450 metabolic-complexes and poor reproducibility of these assays. Moreover, the *in vitro* to *in vivo* extrapolation of drug-drug interactions under conditions of metabolic-intermediate complex formation is often inaccurate. This could be explained by the following characteristics: 1) mechanism-based inhibition is time-dependent; its maximum inhibition effects dependent on the formation and accumulation of metabolic-intermediate complexes and 2) the recovery of enzyme activity depends not only on the disposition of the inactivator but also on the re-synthesis of newly functional enzymes. For example, it has been proposed that the exposure time to erythromycin should be considered while predicting *in vivo* interactions from *in vitro* studies. In fact, Okudaira *et al.* have shown that the maximum level of CYP3A inhibition is achieved after 4 days or more of erythromycin treatment.¹² Such considerations cannot be taken into account while using conventional *in vitro* models (human liver microsomes) or standard spectrophotometric methods to measure the formation of metabolic-intermediate complexes since the required experiment durations exceed viability of the enzymatic system.

The aims of the present study were 1) To determine the competitive inhibition potency of clarithromycin on the metabolism of two CYP3A probe drugs (midazolam and domperidone) using human recombinant CYP3A4 and CYP3A5 isoenzymes, human liver microsomes and cultured human hepatocytes (domperidone only), 2) To establish the modulatory role of cytochrome b5 on the competitive inhibition potency of clarithromycin on the metabolism of these two CYP3A probe drugs using human recombinant CYP3A4 and CYP3A5, 3) To demonstrate the clarithromycin-induced formation of cytochrome P450 metabolic-intermediate complexes in human liver microsomes, and 4) To determine the extent of CYP3A inhibition due to

metabolic-intermediate complex formation using human liver microsomes and freshly isolated and cultured human hepatocytes.

MATERIALS & METHODS

Reagents; Domperidone was purchased from Janssen Pharmaceutica N.V. (Beerse, Belgium). Clarithromycin and clarithromycin intravenous formulation (Klaricid®) were a gift from Abbott Laboratories Limited (Montreal, Canada and Queenborough, United Kingdom, respectively). Midazolam and encainide were generously provided by Sabex Laboratories (Montreal, Canada) and Bristol Myers Squibb Pharmaceutical Research (Wallingford, CT, USA), respectively. 1-Hydroxymidazolam, 4-hydroxymidazolam, lactobionic acid, sodium dithionite and incubation cofactors (NADP⁺, D-glucose 6-phosphate and glucose 6-phosphate dehydrogenase) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Human liver microsomes were purchased from Human Biologics International (Scottsdale, AZ, USA). Microsomes from lymphoblast-expressed human CYP3A4, from baculovirus-infected insect cells expressing CYP3A4 (rCYP3A4) or CYP3A5 (rCYP3A5) and from baculovirus-expressed human cytochrome b5 (CYP b5) were obtained from BD Biosciences Gentest (Woburn, MA, USA). These microsomes were coexpressed with human CYP450 reductase. Freshly isolated and cultured human hepatocytes and Hepato-Stim culture media were also obtained from BD Biosciences Gentest (Woburn, MA, USA). Other chemicals used were of highest qualities commercially available.

HPLC analysis. The HPLC system (Thermo Separation products, Fremont, CA) consisted of a SpectraSystem P4000 pump, a SpectraSystem AS3000 autosampler, a model FL3000 fluorescence detector, a SpectraSystem UV3000 ultraviolet detector and a model PC1000 System Software. Chromatographic separations for domperidone and its major metabolites were performed according to the method described previously.¹³ Quantitative analysis of the metabolites of midazolam (1-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam) was performed according to the assay described by Perloff *et al* with small modifications.¹⁴ Briefly, separation of 1-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam was achieved on an Ultrasphere ODS column (5 µM x 250 mm x 4.6 mm; Beckman Coulter, Fullerton, CA) using a mobile phase consisting of potassium acetate buffer (0.01M, pH 7.4), acetonitrile, methanol,

tetrahydrofuran (45: 25: 23: 7) and triethylamine (0.5 mL/L of potassium acetate buffer). Eluent was monitored by ultraviolet absorbance at $\lambda=220$ nm.

Competitive inhibition studies.

Incubation system: Competitive inhibition of domperidone and midazolam metabolism by clarithromycin was studied using freshly isolated and cultured human hepatocytes, human liver microsomes and microsomes from recombinant CYP3A4 or CYP3A5 (rCYP3A4 and rCYP3A5, respectively). Experiments with rCYP3A4 and rCYP3A5 microsomes were performed with microsomes deficient in or supplemented with cytochrome b5. Experiments were all performed in duplicate (microsomes) or in triplicate (hepatocytes).

Incubations with freshly isolated and cultured human hepatocytes.

Micro-plates of human hepatocytes containing 24 wells (2.0×10^5 viable cells per cm^2) were used and incubated in a humidified 37°C incubator with 95% air/5% CO_2 atmosphere (BD Biosciences Gentest). Hepatocytes were cultured in Hepato-STIM hepatocyte cell culture medium and pre-treated with rifampin $20 \mu\text{M}$ for three days (total volume per well $400 \mu\text{L}$) prior to their use. On study day, the cell-culture medium was gently removed and $400 \mu\text{L}$ of a modified Krebs-Henseleit buffer containing clarithromycin (0, 1, 10 and $100 \mu\text{M}$) and domperidone ($200 \mu\text{M}$) were added to hepatocytes. Incubations were immediately performed at 37°C for 45 minutes. Then, $200 \mu\text{L}$ of a 60 mM sodium acetate buffer (pH 4.5) containing β -glucuronidase enzyme (Helix Pomatia, type 2; 170 units) were added and incubations continued for another 60 minutes at 37°C . Finally, $400 \mu\text{L}$ of ice-cold acetonitrile were added and incubation mixture removed and transferred into a conical tube. Internal standard (3 μg of encainide) was added, the mixture centrifuged (12,000 rpm for 5 minutes), the supernatant injected onto the HPLC system and the major ring-hydroxylated metabolite of domperidone namely, 5-hydroxydomperidone, was quantified.

Incubations with human liver microsomes, and microsomes expressing recombinant human CYP3A4 or CYP3A5.

Microsomes (0.172 nmoles human liver microsomes, and 0.040 nmoles rCYP3A4 or rCYP3A5) were added to a reaction mixture (final volume, $500 \mu\text{L}$) containing a NADPH-regenerating system (1.3 mM NADP^+ , 3.3 mM D-glucose 6-phosphate, 0.2 U glucose 6-phosphate dehydrogenase in 25mM magnesium chloride; $100 \mu\text{L}$),

phosphate buffer 50 mM pH 7.4 (380 μ L) and 5 μ L of clarithromycin dissolved in methanol (1-70 μ M). This mixture was pre-incubated for 10 minutes at 37°C prior to the addition of 5 μ L of a substrate (domperidone 200 or 300 μ M, dissolved in DMSO; or midazolam 25 or 100 μ M, dissolved in methanol). After incubation in a shaking heat block for 45 minutes (domperidone) or 20 minutes (midazolam), the enzymatic process was stopped by adding 500 μ L of ice-cold acetonitrile. Internal standard was added (3 μ g of encainide for domperidone and 2 μ g of diazepam for midazolam). The incubation mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes. The supernatant was injected onto the HPLC system and the 5-hydroxydomperidone or 1- and 4-hydroxymidazolam were monitored.

Cytochrome b5.

The modulatory role of cytochrome b5 on the inhibitory potency of clarithromycin was also assessed during our studies. For this purpose, incubation mixtures containing microsomes from human rCYP3A4 or rCYP3A5 were supplemented with microsomes from baculovirus-expressed recombinant human cytochrome b5 (1:2 rCYP450/CYP b5 molar ratio). Incubation mixture and procedures were similar to those described above; potassium buffer, NADPH-regenerating system solution, clarithromycin and enzymatic sources with or without cytochrome b5 were prewarmed at 37°C for 10 minutes prior to the addition of the substrate to initiate metabolic reactions.

Inhibitory potency of lactobionic acid.

The intravenous formulation of clarithromycin contains excipients such as lactobionic acid that may inhibit CYP450 activities. Incubations were performed with human liver microsomes and domperidone or midazolam as described above (with a 10 min pre-incubation). The final concentration of lactobionic acid (dissolved in phosphate buffer) in the incubation mixture varied from 0.05% (1.4 mM) to 5% (140 mM).

Formation of metabolic-intermediate complexes by clarithromycin.

Spectrophotometric method using the CO-binding technique: The measurement of uncomplexed and total CYP450s was performed as described by Pessayre *et al.*¹⁵.

¹⁶ This technique is based on the concept that complexed CYP450 is unable to bind carbon monoxide. Human liver microsomes (2 mg of protein/mL) were suspended in 60 mM potassium phosphate buffer, 1 mM NADPH and 5 mM magnesium chloride

solutions. The reaction was initiated by the addition of clarithromycin (100 μM) or methanol (reference cuvette). The microsomal mixtures were maintained at 37°C for 0, 30 or 60 minutes. The spectrum of carbon monoxide-binding CYP450 was measured as reported by Omura and Sato.¹⁷ Briefly, after the addition of dithionite in both cuvettes and carbon monoxide in the sample cuvette, the absorption spectrum between 400 to 500 nm was recorded. Similar spectrophotometric analyses were also performed using the intravenous formulation of clarithromycin (100 μM) for 0, 30 and 60 minutes.

Incubation system: The formation of metabolic-intermediate complexes by clarithromycin and their effects on the metabolism of CYP3A substrates were studied using freshly isolated and cultured human hepatocytes (domperidone) and human liver microsomes (domperidone and midazolam). Experiments were performed in triplicate (hepatocytes) or duplicate (human liver microsomes). Incubation procedures were similar to those described previously.

Pre-incubation time.

The time-dependent effects of clarithromycin on the extent of inhibition of domperidone and midazolam metabolism was evaluated differently for freshly isolated hepatocytes vs human liver microsomes. Human hepatocytes were cultured for three days with rifampin 20 μM as described previously. Thereafter, cells were exposed to clarithromycin (0, 1, 10 and 100 μM) for different periods of time ranging from 0 to 72 hours. The milieu was removed (including clarithromycin) and incubations performed with domperidone.

In the case of human liver microsomes, a preincubation at 37°C was performed in the presence of clarithromycin (0-100 μM). Pre-incubation times varied (0-60 minutes) prior to the addition of substrate (domperidone or midazolam).

Inhibitory potency of different sources of clarithromycin.

Additional experiments were conducted to compare the inhibitory potency of two sources of clarithromycin (pure base powder vs intravenous formulation). These inhibition studies were performed with human liver microsomes using a 60 minutes pre-incubation time with clarithromycin (0-300 μM) prior to the addition of domperidone (200 μM).

Data analysis.

Formation rates of 5-hydroxydomperidone, 1-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam were expressed as a percentage of metabolite formed relative to incubations containing no inhibitor. Inhibitor potencies (IC_{50} values) were determined by non-linear regression analysis using Hill's equation. IC_{50} was defined as the concentration of clarithromycin that resulted in 50% inhibition of metabolite formation.

RESULTS**Assessment of the competitive inhibition of domperidone and midazolam metabolism by clarithromycin.**

Preliminary studies were performed with human liver microsomes to screen for the inhibitory potency of clarithromycin as a competitive inhibitor. Clarithromycin 70 μ M and substrates were added to the incubation mixture at the same time. Very limited inhibition in the formation of 5-hydroxydomperidone (<3%), 1-hydroxymidazolam (<9%) or 4-hydroxymidazolam (<1%) was observed with this enzymatic system (Figure 1A). We also performed studies with cultured hepatocytes induced by rifampin to which clarithromycin and domperidone were added at the same time. Using this enzymatic system, a slight inhibition ($8\pm 7\%$) in the formation of 5-hydroxydomperidone was observed with clarithromycin 10 μ M while greater inhibition ($32\pm 4\%$) could be noticed at a concentration of 100 μ M (Figure 1B).

In order to favour binding of clarithromycin to the enzyme, a pre-incubation period was introduced. Using human liver microsomes, we evaluated pre-incubation times varying from 0-60 minutes (Figure 2A and B). A certain degree of inhibition (~ 3-10%) could be detected with a pre-incubation time of 10 minutes for both domperidone and midazolam (clarithromycin 70 μ M). Inhibition appeared to increase as pre-incubation period increased from 10 to 60 minutes. However, we noticed that the overall efficiency of the system was decreasing with time since absolute values measured in control incubations were decreasing as the pre-incubation time was increasing. The extent of inhibition measured in incubations containing clarithromycin had to be corrected for the «apparent inhibition» observed in control incubations. This was suggesting that the efficiency of the system was not stable over time when the pre-incubation period was too long due to a degradation of co-factors or enzymes. Based on these results, we selected a pre-incubation period of 10 minutes for other experiments.

Concentration-dependent inhibition of domperidone and midazolam metabolisms by clarithromycin was assessed using various enzymatic systems. In all enzymatic systems used, limited concentration-dependent inhibition could be revealed between 1 and 70 μM . Maximum inhibition for the formation of 5-hydroxydomperidone reached $18\pm 3\%$ in human liver microsomes, $52\pm 8\%$ with human rCYP3A4 and $32\pm 5\%$ with rCYP3A5 (Figures 3 and 4). For 1-hydroxy and 4-hydroxymidazolam, maximum inhibitions were $27\pm 4\%$ and $11\pm 3\%$ with human liver microsomes, $23\pm 4\%$ and $15\pm 3\%$ with rCYP3A4, and $27\pm 4\%$ and $3\pm 1\%$ with rCYP3A5. Not only the concentration-dependent inhibition was limited but also, the maximum percent inhibition observed with the highest concentration of clarithromycin used was also small.

We decided to investigate the role of cytochrome b5 on the degree of inhibition observed. Cytochrome b5 was therefore added at a constant ratio (1:2) to either human rCYP3A4 or rCYP3A5. For both substrates and all metabolic pathways assessed, inhibition produced by clarithromycin was blunted and for rCYP3A4, became almost undetectable (Figure 5).

Clarithromycin exhibits low solubility characteristics in water and previous studies which evaluated the competitive inhibition properties of clarithromycin had used the intravenous formulation. We pursue further investigations to determine whether limited competitive inhibition observed was due to limited solubility of the pure drug powder. Using human liver microsomes, we observed that percent inhibition in the metabolism of domperidone was higher with the i.v. formulation ($50\pm 3\%$). A plateau appeared to be reached at $\sim 70\ \mu\text{M}$ and not much inhibition was gained even with concentrations as high as $300\ \mu\text{M}$. The intravenous formulation contains various excipients including lactobionic acid (12%) and experiments were planned to assess the inhibitory potency of this compound. The IC_{50} values (expressed in % of lactobionic acid concentration) obtained for 5-hydroxydomperidone, 1-hydroxymidazolam and 4-hydroxymidazolam were 0.28% (0.15-0.51), 1.7% (0.6-4.2) and 0.6% (0.3-1.2), respectively (90% of confidence intervals) (Figure 6).

Metabolite-intermediate complex formation and mechanism-based inhibition of domperidone metabolism by clarithromycin.

Binding spectra of CYP450 with clarithromycin

The formation of CYP3A metabolic-intermediate complexes by clarithromycin using human liver microsomes was investigated. The time course of formation of

metabolic-intermediate complexes between CYP450 and clarithromycin is shown in Figure 7A. Uncomplexed CYP450 was ~85% after 30 minutes and dropped to 70% after 60 minutes. It is important to note that with the technique used, only uncomplexed CYP450 is able to bind carbon monoxide. Therefore, these results indicate that 15% and 30% of CYP450s that were present in the incubation milieu were in a complexed state following exposure to clarithromycin for 30 and 60 minutes, respectively. We also repeated these experiments with the intravenous formulation of clarithromycin and observed that ~47% and 71% of CYP450s were sequestered in a metabolic-intermediate complex after 30 and 60 minutes, respectively (Figure 7B). Hence, the fraction of free CYP450 (uncomplexed form) was decreased with the intravenous formulation and was 1.6 to 2-times lower than that obtained with the pure drug powder of clarithromycin.

Inhibitory potency of prolonged exposure to clarithromycin in freshly isolated and cultured human hepatocytes

Domperidone metabolism was determined in hepatocytes in order to reveal and study more specifically the formation of metabolic-intermediate complexes with clarithromycin. As indicated previously, freshly isolated hepatocytes were cultured for three days while being exposed to rifampin to induce CYP450s activities. Then, clarithromycin was added to the incubation mixture at various concentrations (1-100 μM) and for various periods of time (1, 2, and 3 days). We previously discussed the results obtained when clarithromycin and domperidone were introduced concomitantly to the incubation mixture as a measure of competitive inhibition (Figure 1B). Figure 8 illustrates that much greater inhibition of domperidone metabolism was observed in a time-dependent and concentration-dependent manner when hepatocytes were exposed to clarithromycin for 1, 2 or 3 days. More than 80% inhibition of domperidone metabolism was observed with clarithromycin 10 μM after 3 days of exposure while the same concentration only provoked a <10% inhibition when both drugs were incubated concomitantly (a measure of competitive inhibition). Our results are in agreement with the previously reported mechanism-based inactivator characteristics of clarithromycin.

DISCUSSION

Results obtained in this study with human hepatocytes clearly demonstrate that a significant drug-drug interaction is to be expected between domperidone and clarithromycin in the course of a full length antibiotic treatment in patients. A profound reduction in domperidone metabolism was observed upon exposure of human hepatocytes to clarithromycin for 1 to 3 days. Our results suggest that the postulated increase in plasma levels of domperidone will not be sudden but rather insidious since the anticipated decrease in the intrinsic clearance of the drug would not be related to competitive inhibition but instead, to the formation of an intermediate metabolite complex and mechanism-based inhibition. Our observations are supported by *in vitro* experiments using human liver microsomes and human recombinant CYP3A4 and CYP3A5 enzymes. In these studies, clarithromycin exhibited a weak competitive inhibition potency towards two CYP3A substrates namely, domperidone and midazolam. Furthermore, our data demonstrate the modulatory role of cytochrome b5 on the extent of inhibition produced by CYP3A inhibitors such as clarithromycin.

CYP3A4 and CYP3A5 demonstrate a certain degree of substrate selectivity in the biotransformation of drugs although overlapping is often significant and no isoenzyme specific substrates have been found so far.¹⁸ On the other hand, data suggest that CYP3A4 and CYP3A5 could be differentially inhibited by compounds such as diltiazem, verapamil or macrolide antibiotics. For instance, Wang *et al.* demonstrated that verapamil, a mechanism-based inhibitor of CYP3As, and its metabolite inhibit CYP3A4 to a greater extent than CYP3A5.¹⁹ Williams *et al.* were able to demonstrate the formation of metabolic-intermediate complexes by diltiazem with CYP3A4 but not in the presence of CYP3A5. They suggested that regioselectivity differences between CYP3A4 and CYP3A5 isoforms could explain the lack of formation of metabolic-intermediate complex from diltiazem since the formation rate of N-desmethyldiltiazem by these two isoforms is the same. In the present study, we observed that the inhibitory potency of clarithromycin was substrate-dependent, isoenzyme-dependent and influenced by the presence of cytochrome b5. Hence, the rate of formation rate of 5-hydroxydomperidone by rCYP3A4 was much inhibited by clarithromycin compared to the formation of 4-hydroxymidazolam ($52\pm 8\%$ vs $15\pm 3\%$). Moreover, clarithromycin decreased the formation rate of 5-hydroxydomperidone 3 and 4-hydroxymidazolam much more with rCYP3A4 than with rCYP3A5 ($32\pm 5\%$ and $3\pm 1\%$, respectively). In contrast,

inhibition of 1-hydroxymidazolam by clarithromycin was similar for rCYP3A4 and rCYP3A5.

The addition of cytochrome b5 to the incubation mixture may influence CYP3As activity (V_{max} and/or K_m) as well as the inhibition profile of CYP3As inhibitors.²⁰⁻²³ We reported previously that cytochrome b5 had a significant effect of the inhibitory potencies (IC_{50}) of ketoconazole towards domperidone metabolism but to the contrary, no effects towards the formation of 1- and 4-hydroxymidazolam.²⁴ Results obtained with rCYP3A4 demonstrated clearly that cytochrome b5 modulated the degree of clarithromycin-mediated inhibition of domperidone and midazolam metabolism to the extent that no significant inhibition was observed even with high concentrations of clarithromycin (70 μ M). The magnitude of inhibition measured in incubations performed with rCYP3As supplemented with cytochrome b5 was close to that obtained with human liver microsomes. These observations confirm once again that cytochrome b5 is required in *in vitro* incubation mixture to reproduce pertinent physiological conditions.

Several research groups have demonstrated that clarithromycin can inhibit CYP450 activity by forming metabolic-intermediate complexes.^{25, 26, 27} It was also shown that this phenomenon can occur in human tissues.²⁸⁻³¹ We confirmed these observations using a CO-binding spectrum approach which demonstrated a time-dependent reduction in the amount of uncomplexed CYP450 during exposure to clarithromycin (0 to 60 minutes). The CO-binding spectrum of dithionite-reduced microsomes were reduced by 15% (30 minutes) and 30% (60 minutes) after exposure to clarithromycin which correlated with a 10-13% and 15-28% inhibition in the formation of domperidone and midazolam major metabolites under similar experimental conditions. These results are similar to those reported by Kanamitsu *et al.* who showed that the formation rate of α - and 4-hydroxytriazolam by human liver microsomes were reduced by 33% and 40% after a pre-incubation of 40 minutes in the presence of erythromycin (100 μ M).³²

Exposure-time to the mechanism-based inhibitor should be taken into account in the evaluation of drug-drug interactions involving the formation of metabolic-intermediate complexes. It is well known that *in vitro* characterization of mechanism-based inhibition with suspended liver microsomes can not be performed beyond ~1-2 hours due to important loss of the intrinsic CYP450 activity. For example, in the current study, a ~20% reduction in the catalytic activity was observed following a

pre-incubation period of 60-minutes followed by a 45 minute incubation period. We therefore explored the possibility of using freshly isolated human hepatocytes as an *in vitro* model to characterize mechanism-based inactivators. We first decided to increase the catalytic activity by exposing hepatocytes to the well known non-selective CYP450 inducer rifampin. Then, exposure to the inactivator clarithromycin was performed for 0-3 days. The advantages of this model are 1) a measure of competitive inhibition is obtained on Day 0, 2) the kinetics of mechanism-based inhibition can be tracked in a concentration-dependent manner, and 3) reversal of mechanism-based inactivation can be assessed by removing the inactivator from the culture milieu at different time-periods.

Clarithromycin has a low water solubility which renders characterization of its pharmacological properties difficult. We explored the possibility of using the intravenous formulation which is commercially available in Europe. We rapidly found that the iv formulation had a greater inhibitory potency of the metabolism of domperidone than the pure drug powder. Lactobionic acid, an antioxidant with iron chelating properties, is currently used in preservative solutions for organ transplantations. We showed that lactobionic acid was able to inhibit CYP3A activity with low molar range (0.3-1.7%: 8-47mM). Therefore, the intravenous formulations containing lactobionic acid should be used with care for conduct of *in vitro* incubation studies.

The degree of CYP3A inhibition and consequently the magnitude of the decrease in the oral clearance of CYP3A substrates are expected to be greater after repeated doses of a mechanism-based inhibitor. For instance, Bartkowski *et al.* studied the effects of a 1 or 7 day treatment with erythromycin on the pharmacokinetics of alfentanil.³³ A 7-day course of treatment with erythromycin produced significant prolongation of the elimination half-life and a decrease of the clearance of alfentanil. In contrast, no changes were observed after a 1-day treatment. Ohashi *et al.* have also reported similar effects using diltiazem as the mechanism-based inhibitor and nifedipine as the substrate.³⁴ Their results showed that the increase in the AUC of nifedipine was higher after 6 days of treatment with diltiazem compared to 3 days and 1 day (the increase in AUC was 181% vs 151% and 35%, respectively).³⁴

In conclusion, we have used a new cell-based assay that can easily detect the occurrence of mechanism-based inhibition. Moreover, we have demonstrated that clarithromycin exhibits a low competitive inhibition potency towards CYP3A4 and

CYP3A5 substrates (domperidone and midazolam) when the incubation mixture is supplemented with cytochrome b5. These results lead us to propose that attention should be paid during treatment with repeated doses of clarithromycin and CYP3A substrates. Especially, prolonged treatment with CYP3A mechanism-based inhibitors in combination with domperidone would enhance the occurrence of cardiac side effects associated with this gastrokinetic agent. This kind of drug-drug interaction is insidious and the risk of severe adverse events increases over time and continues during few days after removal of the mechanism-based inhibitor.

ACKNOWLEDGMENT

Veronique Michaud is the recipient of a studentship from the Canadian Institutes of Health Research. The laboratory of Dr Jacques Turgeon is funded by the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Becker ML, Kallewaard M, Caspers PW, et al. Hospitalisations and emergency department visits due to drug-drug interactions: a literature review. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* Jun 2007;16(6):641-651.
2. Hanrahan JP, Choo PW, Carlson W, et al. Terfenadine-associated ventricular arrhythmias and QTc interval prolongation. A retrospective cohort comparison with other antihistamines among members of a health maintenance organization. *Ann Epidemiol.* May 1995;5(3):201-209.
3. Paris DG, Parente TF, Bruschetta HR, et al. Torsades de pointes induced by erythromycin and terfenadine. *Am J Emerg Med.* Nov 1994;12(6):636-638.
4. Tsai WC, Tsai LM, Chen JH. Combined use of astemizole and ketoconazole resulting in torsade de pointes. *J Formos Med Assoc.* Feb 1997;96(2):144-146.
5. Desta Z, Kerbusch T, Flockhart DA. Effect of clarithromycin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pimozide in healthy poor and extensive metabolizers of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6). *Clin Pharmacol Ther.* Jan 1999;65(1):10-20.
6. Vitola J, Vukanovic J, Roden DM. Cisapride-induced torsades de pointes. *J Cardiovasc Electrophysiol.* Oct 1998;9(10):1109-1113.
7. Glassman AH, Bigger JT, Jr. Antipsychotic drugs: prolonged QTc interval, torsade de pointes, and sudden death. *Am J Psychiatry.* Nov 2001;158(11):1774-1782.
8. Zimmermann M, Duruz H, Guinand O, et al. Torsades de Pointes after treatment with terfenadine and ketoconazole. *Eur Heart J.* Jul 1992;13(7):1002-1003.
9. Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(3):279-304.
10. Zhou S, Chan E, Duan W, et al. Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab Rev.* 2005;37(1):41-213.
11. Zhou S, Chan E, Lim LY, et al. Therapeutic drugs that behave as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab.* Oct 2004;5(5):415-442.

12. Okudaira T, Kotegawa T, Imai H, et al. Effect of the treatment period with erythromycin on cytochrome P450 3A activity in humans. *J Clin Pharmacol*. Jul 2007;47(7):871-876.
13. Michaud V, Simard C, Turgeon J. An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to in vitro drug metabolism studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Jun 1 2007;852(1-2):611-616.
14. Perloff MD, von Moltke LL, Court MH, et al. Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: relative contribution of CYP3A and CYP2C isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*. Feb 2000;292(2):618-628.
15. Pessayre D, Tinel M, Larrey D, et al. Inactivation of cytochrome P-450 by a troleandomycin metabolite. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther*. Mar 1983;224(3):685-691.
16. Pessayre D, Descatoire V, Konstantinova-Mitcheva M, et al. Self-induction by triacetyloleandomycin of its own transformation into a metabolite forming a stable 456 nm-absorbing complex with cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol*. Mar 15 1981;30(6):553-558.
17. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. I. Evidence For Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem*. Jul 1964;239:2370-2378.
18. Benet LZ. There are no useful CYP3A probes that quantitatively predict the in vivo kinetics of other CYP3A substrates and no expectation that one will be found. *Mol Interv*. Apr 2005;5(2):79-83.
19. Wang YH, Jones DR, Hall SD. Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil. *Drug Metab Dispos*. May 2005;33(5):664-671.
20. Yamazaki H, Nakamura M, Komatsu T, et al. Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of Escherichia coli. *Protein Expr Purif*. Apr 2002;24(3):329-337.
21. Hirota N, Ito K, Iwatsubo T, et al. In vitro/in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Biopharm Drug Dispos*. Mar 2001;22(2):53-71.
22. Yamaori S, Yamazaki H, Suzuki A, et al. Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of

- CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7. *Biochem Pharmacol.* Dec 15 2003;66(12):2333-2340.
23. Allqvist A, Miura J, Bertilsson L, et al. Inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 catalyzed metabolism of alprazolam and quinine by ketoconazole as racemate and four different enantiomers. *Eur J Clin Pharmacol.* Feb 2007;63(2):173-179.
 24. Michaud V, Simard C, Turgeon J. Comprehensive Characterization of CYP3A Isozymes Involved in the Metabolism of Domperidone: Comparison with the Probe Drug Substrate Midazolam, role of Cytochrome b5 and inhibition by ketoconazole. *Drug Metabolism and Disposition.* 2008;Submitted.
 25. Ohmori S, Ishii I, Kuriya S, et al. Effects of clarithromycin and its metabolites on the mixed function oxidase system in hepatic microsomes of rats. *Drug Metab Dispos.* Mar-Apr 1993;21(2):358-363.
 26. Tinel M, Descatoire V, Larrey D, et al. Effects of clarithromycin on cytochrome P-450. Comparison with other macrolides. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug 1989;250(2):746-751.
 27. Mayhew BS, Jones DR, Hall SD. An in vitro model for predicting in vivo inhibition of cytochrome P450 3A4 by metabolic intermediate complex formation. *Drug Metab Dispos.* Sep 2000;28(9):1031-1037.
 28. Lindstrom TD, Hanssen BR, Wrighton SA. Cytochrome P-450 complex formation by dirithromycin and other macrolides in rat and human livers. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb 1993;37(2):265-269.
 29. Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, et al. Diltiazem inhibition of cytochrome P-450 3A activity is due to metabolite intermediate complex formation. *J Pharmacol Exp Ther.* Sep 1999;290(3):1116-1125.
 30. Ernest CS, 2nd, Hall SD, Jones DR. Mechanism-based inactivation of CYP3A by HIV protease inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* Feb 2005;312(2):583-591.
 31. Larrey D, Funck-Brentano C, Breil P, et al. Effects of erythromycin on hepatic drug-metabolizing enzymes in humans. *Biochem Pharmacol.* Mar 15 1983;32(6):1063-1068.
 32. Kanamitsu S, Ito K, Green CE, et al. Prediction of in vivo interaction between triazolam and erythromycin based on in vitro studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4. *Pharm Res.* Apr 2000;17(4):419-426.

33. Bartkowski RR, Goldberg ME, Larijani GE, et al. Inhibition of alfentanil metabolism by erythromycin. *Clin Pharmacol Ther.* Jul 1989;46(1):99-102.
34. Ohashi K, Sudo T, Sakamoto K, et al. The influence of pretreatment periods with diltiazem on nifedipine kinetics. *J Clin Pharmacol.* Mar 1993;33(3):222-225.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1: Competitive inhibition by clarithromycin A) Formation of 5-hydroxydomperidone, 1- and 4-hydroxymidazolam in the presence of clarithromycin in human liver microsomes. Results are presented as percent of control activity. B) Formation activity of domperidone in human hepatocytes exposed for 3 days to rifampin. On the study day, rifampin was removed and clarithromycin (1-100 μM) and domperidone (200 μM) were added at the same time to assess competitive inhibition.

FIGURE 2: Variation in the extent of inhibition caused by clarithromycin 70 μM on CYP3A substrates as a function of pre-incubation time. Substrates (A: domperidone 200 μM and B: midazolam 50 μM) were added at the end of the pre-incubation period with clarithromycin. A certain degree of time-dependant decreases in the overall enzymatic activity were observed in control incubations (triangles). Net inhibition caused by clarithromycin is illustrated by the dashed line.

FIGURE 3: Percent inhibition in the metabolism of CYP3A substrates by clarithromycin in human liver microsomes.

FIGURE 4: Percent inhibition in the metabolism of CYP3A substrates by clarithromycin with A) rCYP3A4 and B) rCYP3A5.

FIGURE 5: Percent inhibition in the metabolism of CYP3A substrates by clarithromycin in the presence of cytochrome b5 with A) rCYP3A4, and B) rCYP3A5.

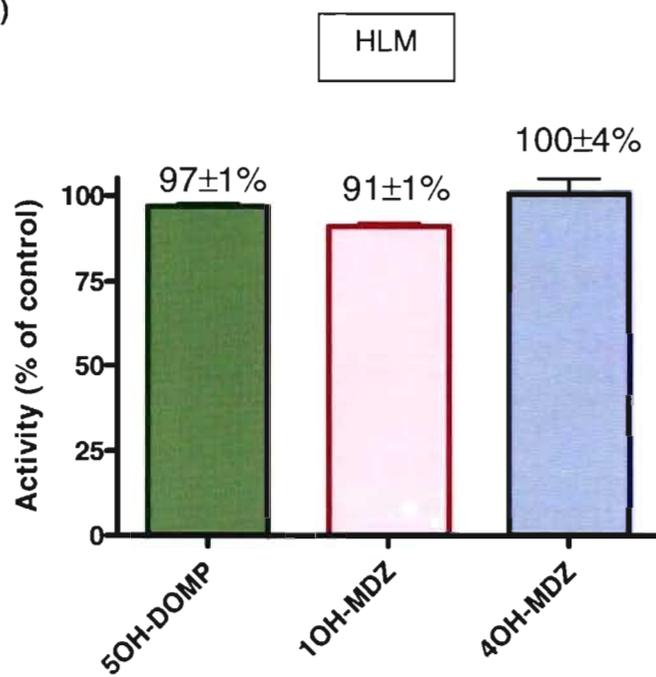
FIGURE 6: Percent inhibition in the metabolism of CYP3A substrates by lactobionic acid in human liver microsomes.

FIGURE 7: Spectrophotometric determination of uncomplexed CYP450s by CO-binding after exposure for various periods of time to A) clarithromycin pure drug substance, and B) intravenous formulation of clarithromycin.

FIGURE 8: Percent inhibition in domperidone metabolism in human hepatocytes following various periods of exposure to clarithromycin.

FIGURE 1

A)



B)

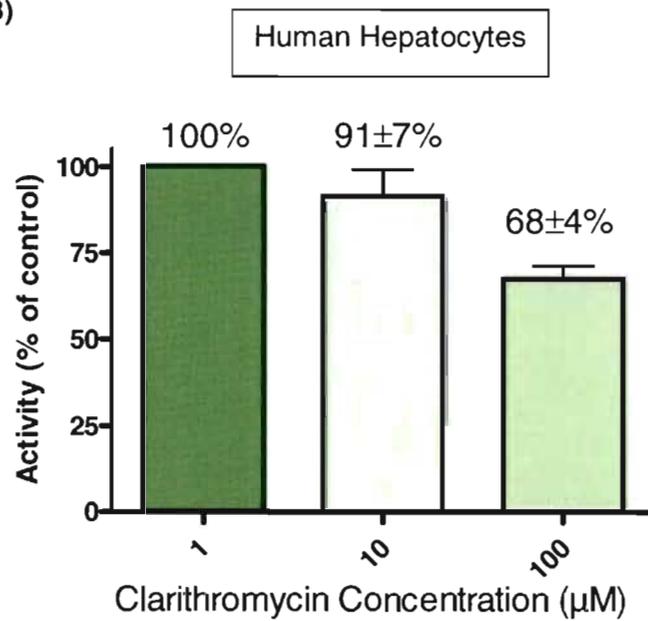
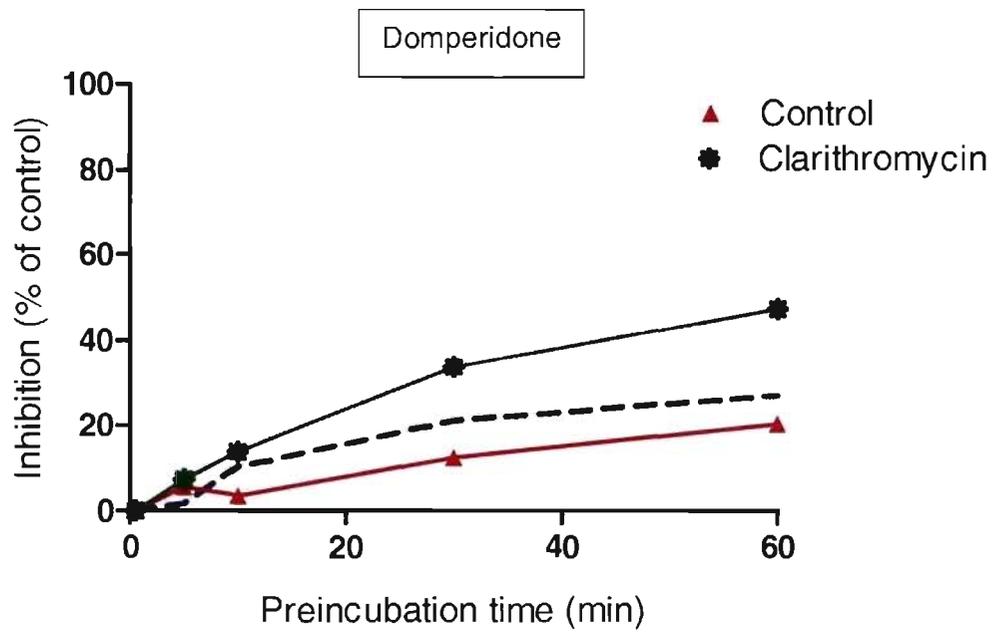


FIGURE 2

A)



B)

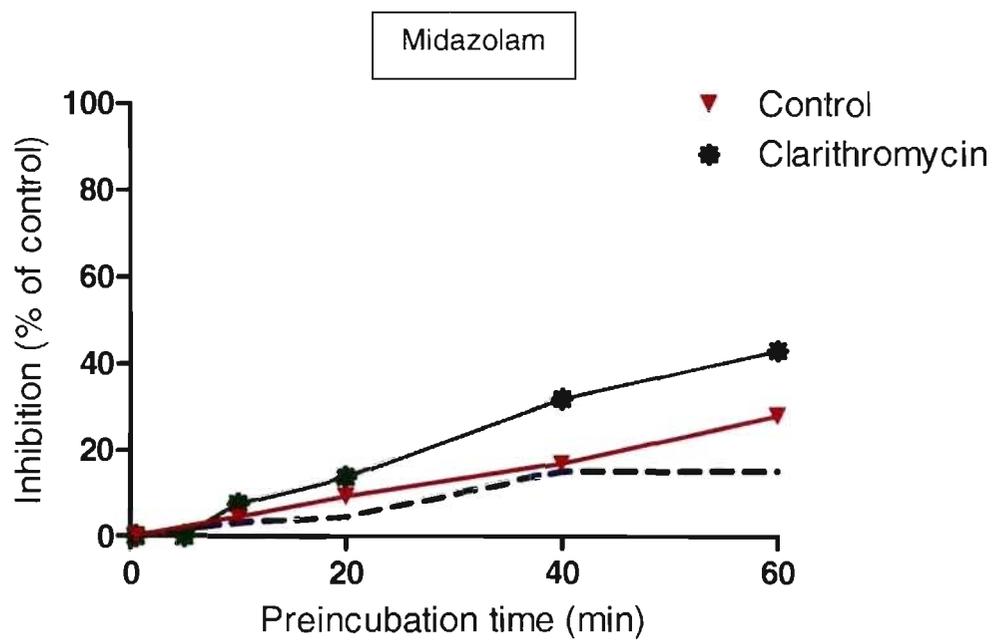


FIGURE 3

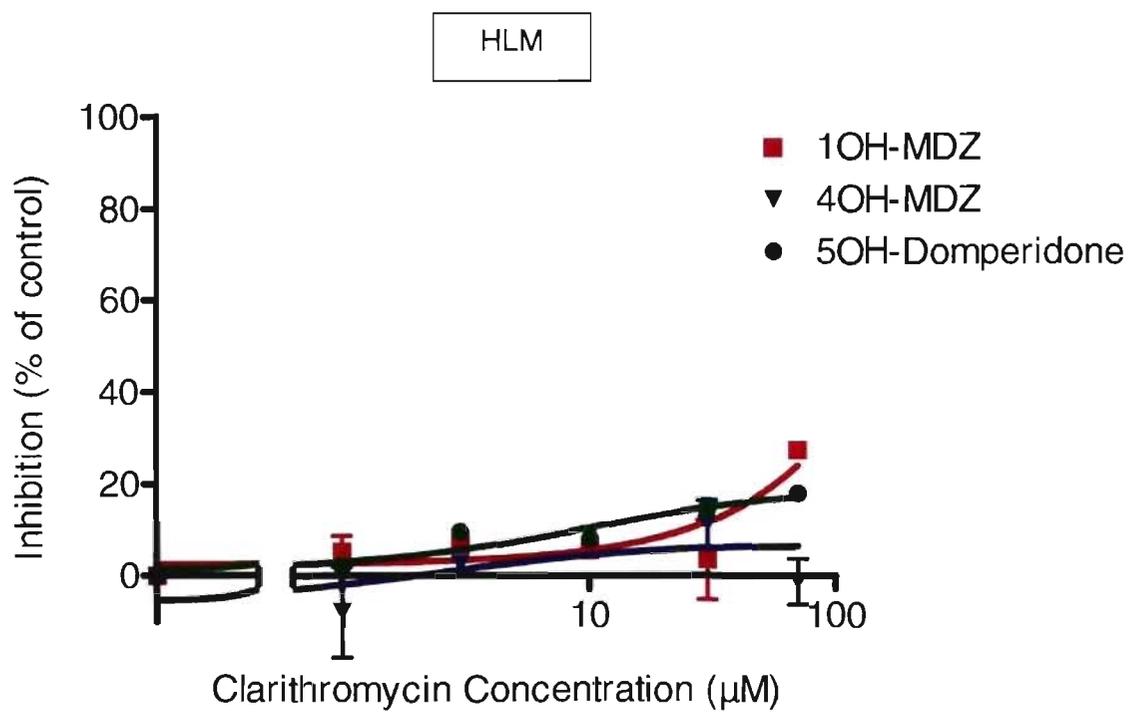
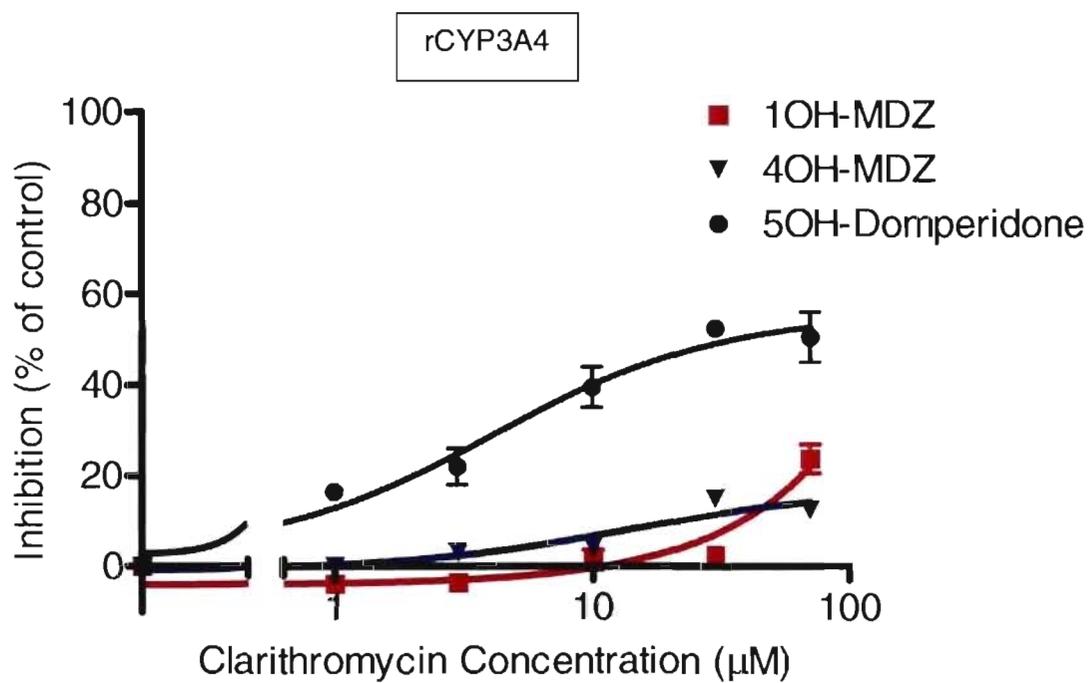


FIGURE 4

4A)



4B)

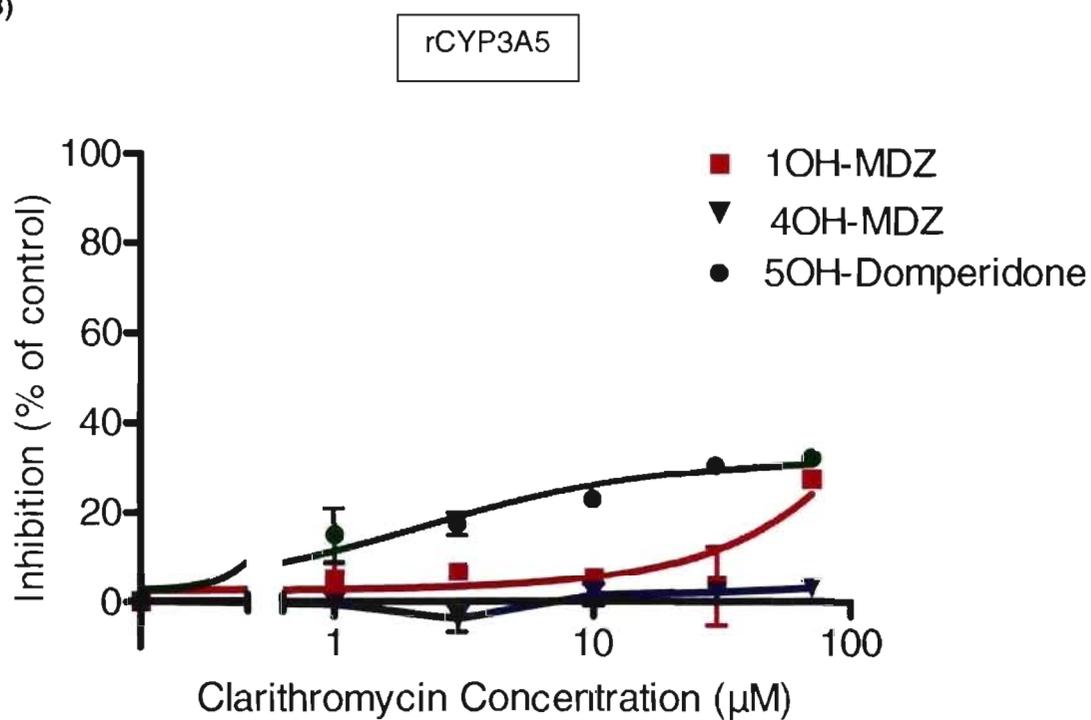
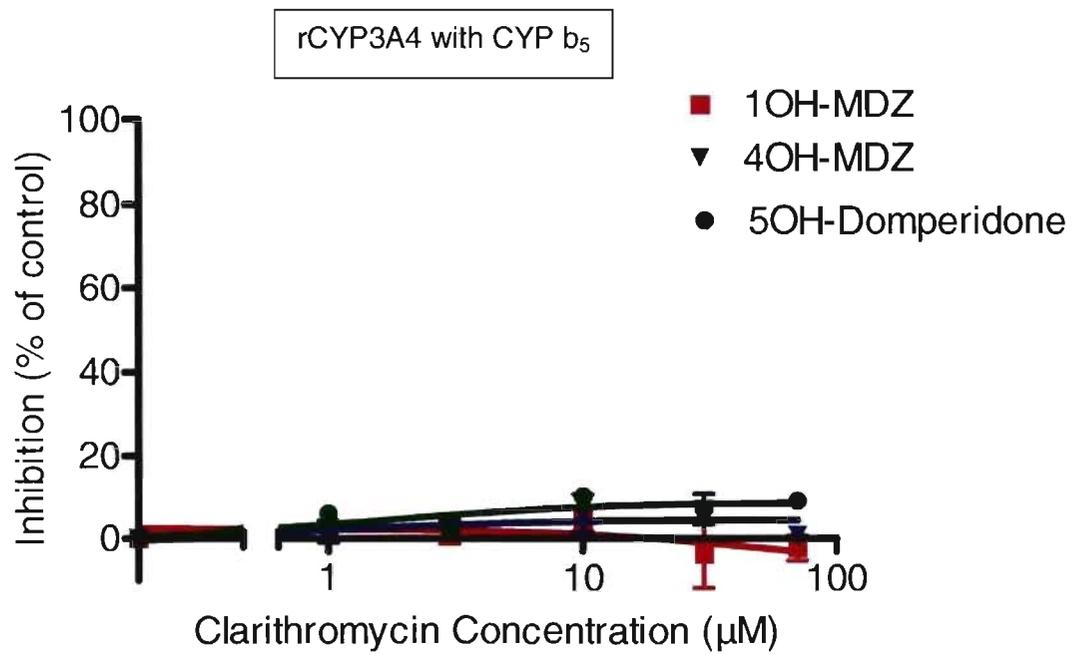


FIGURE 5

5A)



5B)

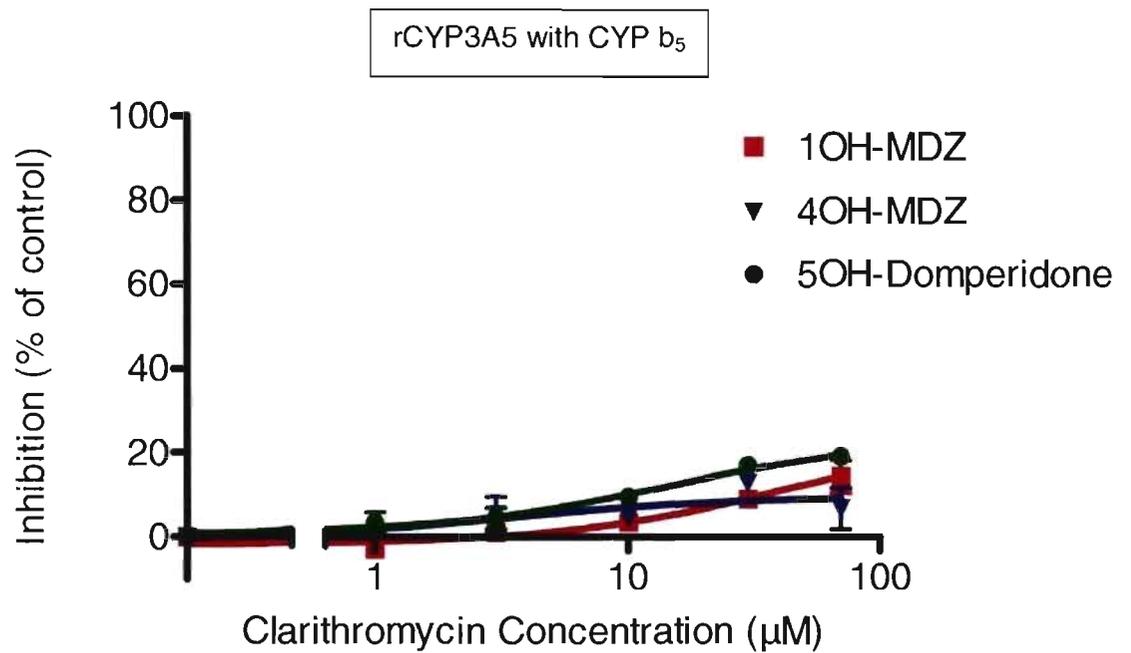


FIGURE 6

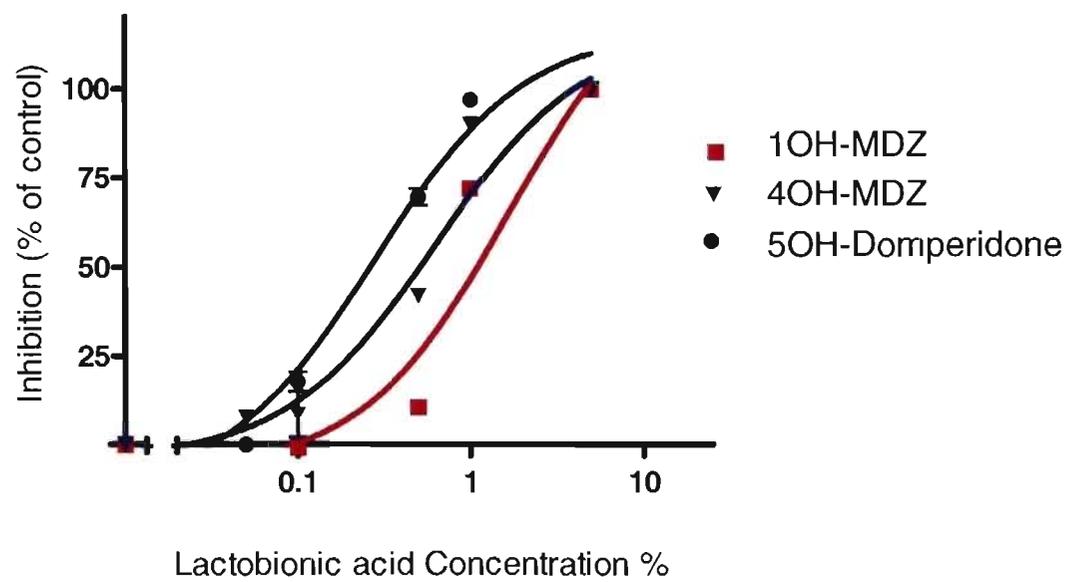
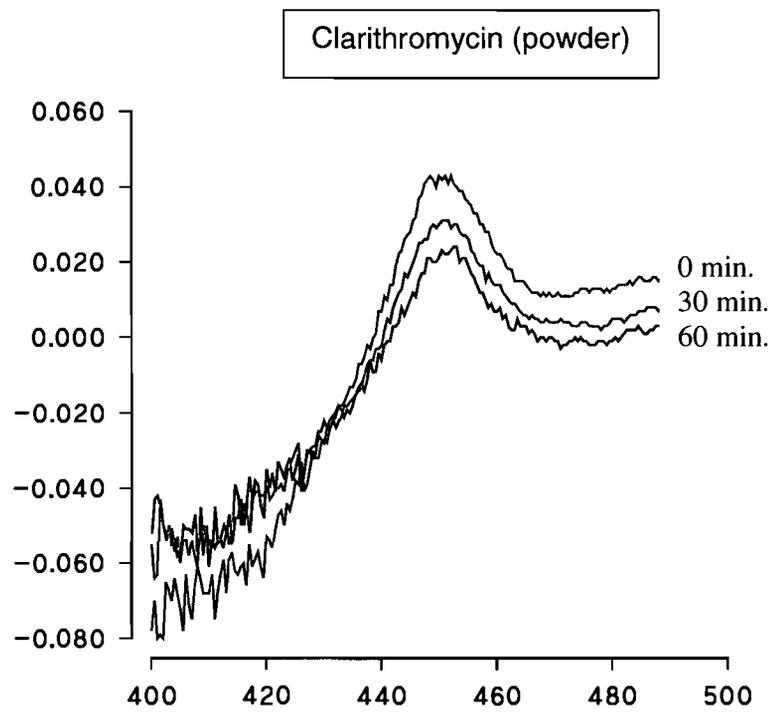


FIGURE 7

A)



B)

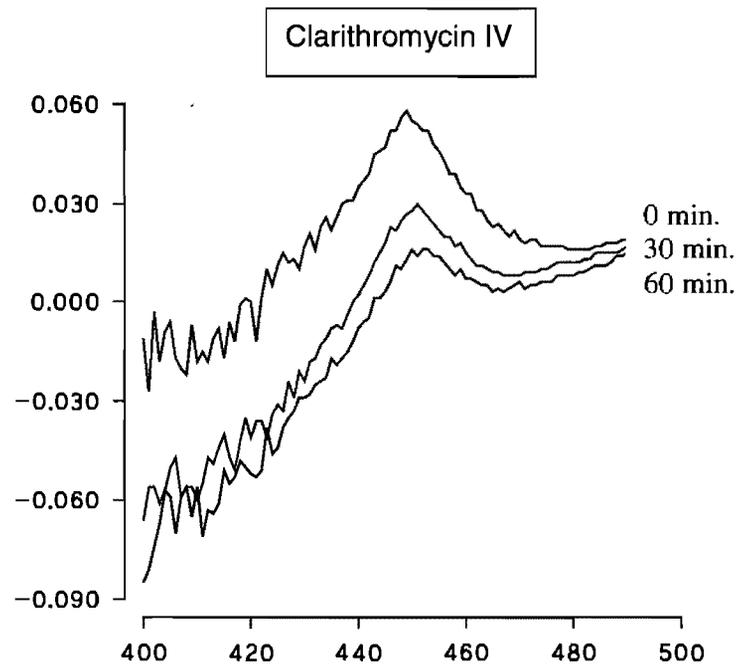
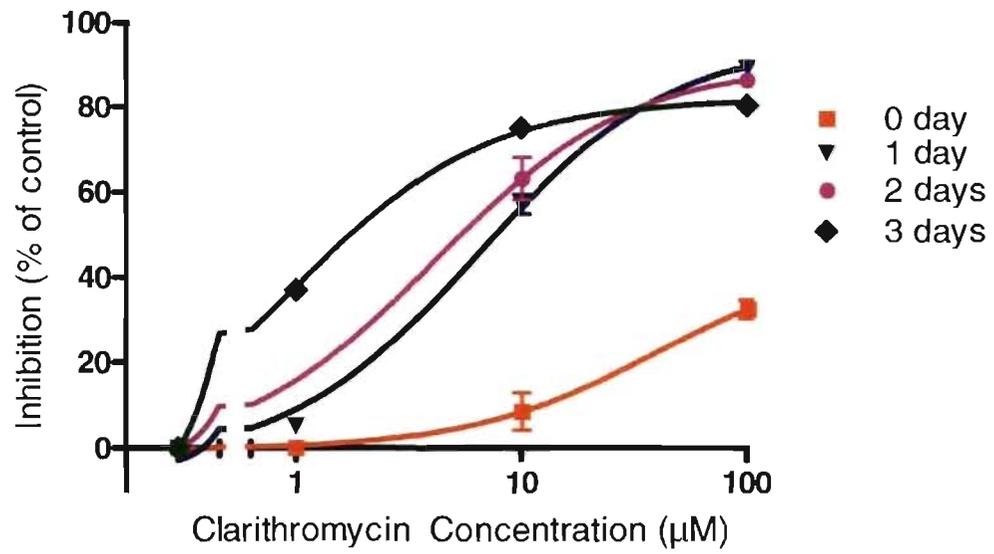


FIGURE 8



v) DISCUSSION

L'un des principaux objectifs des études *in vitro* d'inhibition métabolique est de prédire qualitativement et quantitativement les interactions médicamenteuses *in vivo*. Il est attendu que les données quantitatives obtenues suite aux analyses de métabolisme *in vitro* puissent être extrapolées à la situation *in vivo* si une application adéquate des principes de pharmacocinétiques appropriées à la condition étudiée est effectuée.^{296, 312, 313}

Tel que décrit dans l'article, les expériences de liaison ayant pour objectifs de mesurer la formation de CYP450 non-complexé (scan 400-500 nm en présence de monoxyde de carbone) ont montré que la clarithromycine est un «mechanism-based inhibitor» via la formation de complexes métaboliques intermédiaires. Ceci est en accord avec les données déjà publiées dans la littérature.^{314, 315} Toutefois, les résultats obtenus à partir des études d'inhibition *in vitro* avec des microsomes ou des sources enzymatiques purifiées suggèrent que les résultats de ces études ne permettent pas une extrapolation *in vivo* lorsqu'on est en présence d'inhibition causée par la formation de complexes métaboliques. Ainsi, dans de telles conditions, on constate que les données *in vitro* ne correspondent pas aux données observées en situation clinique réelle. De fait, des études d'inhibition *in vitro* rapportent un potentiel d'inhibition avec la clarithromycine qui est bien inférieur aux inhibitions observées suivant son administration orale. Par exemple, Gascon et Dayer ont mené des études *in vitro* évaluant l'inhibition du métabolisme du midazolam suivant l'ajout d'inhibiteurs potentiels comme la clarithromycine. Ils ont rapporté une valeur d'IC₅₀ pour la clarithromycine de 330 µM indiquant un faible potentiel d'inhibition par cet antibiotique macrolide alors que des études cliniques ont rapporté des augmentations d'aire sous la courbe (AUC) du midazolam de 3,4 à 4,4 fois suivant la co-administration de midazolam avec l'antibiotique macrolide.^{316, 301, 317}

Il faut noter que les études d'inhibitions *in vitro* demeurent utiles et nécessaires afin d'identifier en premier lieu les inhibiteurs compétitifs et d'en estimer leur puissance. Bien que la relation ne soit ni complète ni absolue, une relation structure-activité a été proposée quant à la formation de complexes métaboliques intermédiaires. En effet, Franklin *et al.* suggéraient que la présence d'une amine ou d'un composé méthylendioxy dans la molécule étaient requis afin que le produit puisse «chélater»

le groupement hème du CYP450.³¹⁸ Par ailleurs, Ernest *et al.* proposent que d'autres groupements pourraient également causer une chélation avec l'hème du CYP450 puisque des molécules comme l'indinavir et le nelfinavir lesquelles sont dépourvus des groupements fonctionnels précédemment énumérés, forment aussi des complexes métaboliques.³¹⁹ Lorsque la structure d'une molécule suggère une formation possible de complexes intermédiaires, nos résultats nous amènent à proposer que des études d'inhibition métabolique utilisant des hépatocytes devraient être effectuées. Ces études permettraient une évaluation plus réelle du potentiel d'inhibition sur quelques jours.

Puisque les «mechanism-based inhibitors» requièrent une préexposition préalable pour exercer leur inhibition, nous avons déterminé l'effet du temps de préincubation sur le milieu enzymatique comme tel. Tel que montré dans notre étude, à un temps de préincubation de plus de 10 minutes, on dénote déjà une perte d'activité catalytique du système. Par conséquent, il est préférable que le temps d'incubation soit restreint lorsque des expériences sont menées avec des microsomes et enzymes purifiées. Au contraire, nos résultats montrent que les hépatocytes en culture peuvent être exposés au médicament durant quelques jours sans perte d'activité intrinsèque (dans le contrôle vs prétraitement).

L'utilisation des hépatocytes offre l'avantage de fournir une intégrité cellulaire en respect avec l'architecture de l'enzyme et offre la possibilité de réaliser des expériences à plus long terme. Effectivement, les hépatocytes mis en culture peuvent être soumis à des expositions répétées à un médicament sur plusieurs jours permettant ainsi un suivi de l'inhibition des CYP450s dans le temps. Il faut souligner que l'un des avantages majeurs favorisant les hépatocytes comparativement aux microsomes de foie humain est qu'ils fournissent une globalité de différents processus pouvant intervenir dans la disposition du médicament dans la cellule ; cette approche permet une évaluation globale tant du métabolisme que du transport des molécules dans l'hépatocyte. En contre-partie, avec cette approche il demeure difficile de spécifier le rôle d'une isoforme en particulier puisque c'est l'ensemble d'un processus qui est évalué.

Cette notion d'inhibition temps-dépendante est complexe à estimer et l'extrapolation clinique demeure ambiguë. Cependant son impact clinique peut être majeur. Il apparaît important de développer un modèle permettant d'estimer le temps où l'inhibition sera maximale, le moment après l'arrêt du médicament dit inhibiteur où

l'inhibition ne sera plus significative et ceci, afin de réduire l'apparition d'effets indésirables.

Il semble que le niveau d'inactivation par les inhibiteurs de type «mechanism-based inactivator» diffère entre le CYP3A4 et le CYP3A5. Il a été observé que le CYP3A5 était moins susceptible à l'inactivation induite par ces médicaments.^{307, 308} Ceci s'explique probablement par la plus faible capacité du CYP3A5 à générer les métabolites intermédiaires de type nitrosoalkane.³⁰² Tel que mentionné précédemment, une étude *in vitro* a montré que l'ampleur de l'inhibition du CYP3A5 par le vérapamil, un «mechanism-based inhibitor» des CYP3As, est moindre que celle produite par le CYP3A4.³⁰⁷ De plus, les résultats de cette étude montrent que les deux énantiomères du vérapamil inhibent l'activité du CYP3A4, alors qu'ils affectent très peu l'activité du CYP3A5 en absence de cytochrome b5. Bien que l'ajout de cytochrome b5 augmente légèrement l'ordre de grandeur maximal d'inactivation des CYP3A4 et CYP3A5, cette augmentation demeure modeste. Toutefois, les résultats de notre étude ont montré une différence importante dans l'ordre de grandeur d'inhibition de la clarithromycine sur le CYP3A4 en fonction de la présence ou de l'absence de cytochrome b5. De fait, la clarithromycine inhibait plus fortement la formation du 5-hydroxydomperidone (M3) et des métabolites hydroxylés du midazolam par les isoenzymes purifiées CYP3A4 en absence de cytochrome b5 qu'en présence de ce dernier.

La majorité des modèles mathématiques proposés pour prédire *in vivo* le potentiel d'inhibition des «mechanism-based inhibitors» reposent sur différentes prémices dont ; 1) le substrat et l'inhibiteur doivent être administrés oralement simultanément, 2) le substrat et l'inhibiteur sont éliminés seulement par le foie, 3) leur élimination doit respecter une cinétique de Michaelis-Menten, 4) la fraction du médicament libre qui régit son élimination 5) la contribution de l'isoenzyme sujette à l'inactivation est faible dans l'élimination totale de l'inhibiteur, c'est-à-dire que l'élimination de l'inhibiteur n'est pas affecté par l'inactivation de l'enzyme, 6) la distribution du substrat et de l'inhibiteur dans le foie s'effectue rapidement et la concentration libre de l'inhibiteur retrouvée dans la veine hépatique est égale à celle dans les hépatocytes à l'état d'équilibre, et 7) l'absorption gastro-intestinale doit être décrite par une constante d'ordre 1.²⁹⁶ Plusieurs de ces prémices ne sont pas applicables à de nombreux substrats des CYP3As. Ainsi, on peut déjà assumer que dans maintes occasions l'application de ces modèles ne sera pas conforme puisque les assomptions requises ne seront pas respectées.

Par exemple, l'effet inhibiteur peut dépendre de l'intervalle de temps entre l'administration de l'inhibiteur et celle du substrat. Un intervalle de temps trop court entre l'administration de l'inhibiteur et du substrat pourrait entraîner une inhibition moindre dû au processus cinétique incomplet causant une inactivation insuffisante. Au contraire, un intervalle de temps trop grand pourrait aussi causer une inhibition plus faible qui s'expliquerait par une resynthèse d'enzymes.²⁹⁶ De plus, plusieurs médicaments substrats des CYP450s présentent une cinétique dite atypique et donc, non-conforme à une cinétique de Michaelis-Menten tel que discuté dans le chapitre précédant. Ceci constitue un autre exemple montrant les limites des modèles mathématiques jusqu'ici proposés.

Les modèles de prédictions *in vivo* des interactions médicamenteuses assument souvent qu'à l'état d'équilibre, la concentration libre de l'inhibiteur dans le foie est égale à celle retrouvées dans les sinusoides (capillaires hépatiques). Bien que le transport à travers les hépatocytes de nombreux médicaments s'effectue par simple diffusion passive, il est maintenant reconnu que de multiples transporteurs contribuent au transport actif de nombreux médicaments. L'activité de ces transporteurs peut affecter significativement le devenir des médicaments dans l'organisme. Ainsi, le grand principe de pharmacocinétique énonçait, jusqu'à la découverte récente des transporteurs membranaires, que les concentrations plasmatiques libres étaient égales et en équilibre avec les concentrations libres tissulaires est maintenant révolu. Par conséquent, en présence d'un inhibiteur qui subit un transport actif et qui se concentre dans les hépatocytes, l'ampleur de l'interaction médicamenteuse sera sous-estimée si les concentrations plasmatiques sont utilisées dans le modèle de prédiction.^{296, 320}

Le dernier exemple discuté ici se rapporte à une situation pour laquelle l'élimination de l'inhibiteur est considérée à tort dans les modèles mathématiques ne pas être influencée par le processus d'inactivation. Il a été observé que la demi-vie d'élimination apparente du diltiazem s'allonge significativement suivant l'administration répétée du médicament durant deux semaines comparativement à une dose orale unique.³²¹ Bensoussan *et al.* ont observé qu'*in vitro*, le diltiazem forme des complexes métaboliques intermédiaires et ils rapportent également, la formation *in vivo* de ces complexes chez des rats prétraités avec de la dexaméthasone ou du phénobarbital (des inducteurs de CYP450s).³²² Alors que ces études ont été effectuées chez l'animal, Jones *et al.* ont montré que le diltiazem

forme aussi un complexe métabolique intermédiaire avec les CYP3As humains.³⁰⁹ Étant donné que les concentrations plasmatiques de diltiazem et de ses métabolites sont très inférieures à leurs constantes d'inhibition respectives, l'inhibition de type réversible doit être considérée comme étant improbable. Il semble évident que l'administration prolongée de diltiazem affecte son propre métabolisme et plusieurs scientifiques s'entendent pour expliquer ce phénomène d'auto-inhibition par une accumulation de complexes métaboliques intermédiaires.^{309, 323} Sans faire une énumération exhaustive, ce ne sont que quelques exemples démontrant les limites de certains modèles mathématiques assumant diverses prémices lesquelles, en réalité, sont souvent différentes.

En somme, les expériences effectuées dans cette partie de mes travaux de recherche nous amènent à proposer une nouvelle approche *in vitro* basée sur l'utilisation d'hépatocytes humains permettant une évaluation précise dans le temps des phénomènes d'inhibition métabolique reliée à la formation de complexes métaboliques intermédiaires afin de permettre éventuellement une meilleure extrapolation *in vivo*.

TRAVAUX DE RECHERCHE

SECTION 2.1.2

**DÉTERMINATION DES NIVEAUX ET DE L'ACTIVITÉ DE
DIFFÉRENTS CYP450s AU NIVEAU DU CŒUR HUMAIN.**

SECTION 2.1.2

ARTICLE #4

Determination of cardiac mRNA levels of CYP450s involved in the metabolism of drugs from a large cohort of patients with end-stage heart failure and healthy subjects.

ARTICLE #5

Metabolism of domperidone and verapamil by human heart microsomal fractions.

i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Mise en contexte du projet : L'hypothèse de recherche qui soutient la réalisation de ce projet est que la présence de CYP450s exprimés au niveau cardiaque pourrait contribuer au métabolisme intra-tissulaire de médicaments et ainsi, expliquer en partie la variabilité interindividuelle observée dans les effets et/ou la toxicité cardiaque de certains agents pharmacologiques. En effet, certaines évidences suggèrent que des facteurs affectant les concentrations intra-tissulaires des médicaments sont en partie responsables des effets bénéfiques et toxiques de ceux-ci. Depuis le début de la pharmacocinétique, les concentrations plasmatiques ont été l'outil de référence utilisé afin de prédire l'effet et la toxicité potentielle d'un produit. Cependant, plusieurs évidences ne permettent plus de soutenir entièrement ce concept. De fait, il est bien connu qu'un même niveau plasmatique de médicament pourra chez certains patients être associé à une inefficacité alors que chez d'autres patients, la même concentration plasmatique de ce médicament provoquera des toxicités. Par conséquent, il devient important de mieux comprendre les facteurs pouvant affecter les concentrations intra-tissulaires des médicaments d'où notre intérêt à déterminer la présence et l'activité de CYP450s dans le tissu cardiaque.

Des données récentes suggèrent que des CYP450s auraient un rôle non-négligeable dans la physiologie cardiovasculaire de même que dans la pathogénèse de maladies cardiovasculaires.³²⁴⁻³²⁶ Ces évidences nous ont mené à émettre une seconde hypothèse à savoir que l'expression de CYP450s cardiaques pourrait être influencée par des conditions pathologiques, comme l'insuffisance cardiaque, et que cette modulation pourrait affecter le métabolisme de composés endogènes et de médicaments.

Objectifs : Les objectifs de ce projet de recherche sont : 1) d'explorer la présence d'ARNm associé à la présence d'isoenzymes des CYP450s dans des cœurs normaux, 2) d'évaluer si la présence d'ARNm est associée à une protéine fonctionnelle ; 2a) la détermination de l'activité des CYP450s cardiaques requiert d'abord la mise au point d'une méthode pour la préparation de microsomes préparés à partir de tissu provenant de cœur humain, et 2b) évaluer l'activité métabolique cardiaque pour des substrats connus des CYP450s (en utilisant un médicament indiqué en cardiologie, le vérapamil, un médicament dont l'indication ne concerne pas le domaine cardiovasculaire mais pour lequel il existe des effets

secondaires cardiaques, soit la dompéridone et un produit endogène, la testostérone) et finalement, 3) évaluer si les niveaux d'ARNm des CYP450s dans les cœurs (ventricule gauche) sont modulés lors d'insuffisance cardiaque.

ii) INTRODUCTION

La communauté scientifique a porté une attention considérable aux CYP450s hépatiques en raison de leur rôle dans le métabolisme des médicaments, leur impact sur la biodisponibilité, les interactions médicamenteuses et leur toxicité. De fait, le foie exprime des niveaux élevés de CYP450s et joue un rôle dominant dans l'effet du premier passage intestinal-hépatique ainsi que dans la régulation de la clairance systémique de nombreux médicaments. Toutefois, l'expression des CYP450s ne se limite pas au foie et de nouvelles connaissances ont permis de suggérer que les CYP450s situés dans des tissus extra-hépatiques, incluant le cœur, pourraient contribuer à la clairance intra-tissulaire des médicaments. Les niveaux d'expression protéique des CYP450s dans les tissus extra-hépatiques sont souvent plus faibles, mais les concentrations de médicaments dans ces tissus sont aussi plus faibles que celles observés dans les intestins ou dans le foie lors du premier passage.

En plus d'être impliqués dans le métabolisme de nombreux xénobiotiques, les CYP450s sont également responsables de la formation et du catabolisme de produits endogènes. Il existe des exemples bien documentés comme le métabolisme de l'acide arachidonique en produits vasoréactifs tels l'acide epoxyeicosatrienoïque (EET) et l'acide hydroxyeicosatrienoïque (HETE), ainsi que le métabolisme de stéroïdes comme la testostérone. Il faut toutefois souligner qu'il existe encore peu de données concernant le rôle et l'impact des CYP450s dans le tissu cardiovasculaire. En fait, il existe quelques études ayant montré l'expression de CYP450s dans le tissu cardiaque, mais peu ont évalué l'activité et l'implication clinique de ces derniers ³²⁷⁻³³²

iii) LES CYP450S CARDIOVASCULAIRES

Expression de CYP450s dans le coeur

Des données récentes suggèrent que certaines isoenzymes du CYP450 localisées dans le muscle lisse vasculaire et l'endothélium contribueraient à la régulation du tonus et de l'homéostasie vasculaire. Les deux familles des CYP450s possédant un rôle prédominant dans la régulation vasculaire en raison de leur implication dans le métabolisme de l'acide arachidonique sont les CYP2 et CYP4.

Thum et Borlak furent les premiers à proposer que les échecs thérapeutiques dans le traitement de l'hypertrophie cardiaque ventriculaire puissent être en partie expliqués par une variabilité dans l'activité de CYP450s extra-hépatiques. En fait, ils avaient alors émis l'hypothèse qu'une inactivation dû au métabolisme du médicament était possible au site d'action même de celui-ci, c'est-à-dire dans le tissu cardiovasculaire et pouvait causer une perte d'efficacité du médicament. Ils ont investigué l'expression de gènes associés à différentes isoenzymes des CYP450s, des flavines mono-oxygénases et d'époxides hydrolases et cela, dans différentes régions du cœur humain. Il faut souligner que leur étude a été réalisée auprès d'un échantillon de 7 cœurs provenant de cœurs explantés de patients avec insuffisance cardiaque et 2 cœurs normaux.³²⁷ Aucune expression des gènes associés aux isoenzymes CYP3A4, CYP3A5 ou CYP3A7 n'a été détectée dans le tissu cardiovasculaire.^{327, 331} Ils ont trouvé que l'expression des isoenzymes CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6 et CYP4B1 dans le cœur était prédominante et ce, au niveau du ventricule droit.³²⁷ L'expression d'ARNm du CYP1A1 était très importante dans les artères pulmonaires et l'aorte alors qu'ils ont trouvé une très faible expression de l'ARNm du CYP1A2 dans le tissu cardiovasculaire.³²⁷ Les transcrits d'ARNm associés au CYP2E1 ont été détectés dans plusieurs des tissus cardiovasculaires évalués; soit dans les ventricules droit et gauche et les oreillettes droite et gauche.³²⁷

Les premières études évaluant le métabolisme des médicaments dans le tissu cardiaque ont également été menées par Thum et Borlak. Ils ont utilisé le vérapamil à titre de substrat et des microsomes préparés à partir d'un échantillon de ventricule droit ou gauche provenant de cœurs humains explantés et congelés.^{327, 331} Les expériences réalisées avec des microsomes isolés de ventricule droit montrent une activité métabolique cardiaque confirmée par la formation de 4 différents métabolites de vérapamil. Cependant, avec des microsomes cardiaques de ventricule gauche aucune production de métabolites de vérapamil n'a été observée.. Les auteurs suggèrent qu'une inactivation métabolique serait possible dans le ventricule droit seulement. De plus, ils proposent que l'expression limitée (quasi-

absente) d'isoenzymes du CYP450 dans le ventricule gauche serait la conséquence de la capacité du ventricule droit et des poumons à métaboliser les médicaments .

Le même groupe de chercheurs a par la suite réalisé les mêmes expériences avec des cellules endothéliales coronariennes humaines.³³³ Encore une fois, leurs résultats révèlent que l'endothélium est aussi un tissu actif métaboliquement tel que montré par la production de métabolites de vérapamil. De plus, les niveaux d'expression de CYP3A4 et de CYP3A5 étaient encore une fois sous la limite de détection, suggérant que l'expression d'isoenzymes est spécifique selon les tissus. Parmi les isoenzymes retrouvées dans les cellules endothéliales coronariennes humaines en culture on note les CYP1A1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1 et CYP2J2. Au contraire, aucun transcrite d'ARNm associé aux gènes *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3As* et *CYP4B1* n'a été détecté dans cette étude. En opposition à ces résultats (voir la prochaine section), d'autres études ont détecté la présence de l'isoenzyme CYP2C9 dans l'endothélium vasculaire. Il faut cependant mentionner que les isoformes retrouvées diffèrent selon le type de cellules, la présence de pathologies et le modèle utilisé (animal vs humain). Un autre point à soulever est que la majorité des études utilisant du tissu humain sont souvent limitées par le nombre d'échantillons accessibles.

Une découverte majeure concernant les isoenzymes cardiovasculaires fut celle de l'isoenzyme CYP2J2. C'est au début des années 1990 que la famille CYP2J a été premièrement décrite.³³⁴ L'identification spécifique du gène *CYP2J2* laquelle est relativement récente a été accomplie par le groupe de recherche de Zeldin.^{335, 336} Plusieurs études ont montré que le CYP2J2 est hautement exprimé dans le cœur principalement dans les myocytes cardiaques et dans les cellules endothéliales des petites et larges artères coronariennes.^{335, 337, 338} De fait, le CYP2J2 constitue l'isoforme cardiovasculaire majeure due à son expression abondante. Le CYP2J2 est exprimé dans d'autres tissus incluant le foie, les reins, les poumons, le pancréas et le tractus gastro-intestinal.^{335, 339-341} En plus d'être impliqué dans le métabolisme de produits endogènes, comme l'acide arachidonique et de l'acide linoléique, le CYP2J2 métabolise également plusieurs xénobiotiques dont l'astémizole, la terféndine et l'ébastine.^{131, 132, 342, 343} Un point intéressant à noter est que tous ces médicaments possèdent des effets cardiovasculaires. D'ailleurs, les antihistaminiques, astémizole et terféndine, ont été retirés du marché canadien en raison d'un risque accru d'induction de Torsades de pointes, alors que l'ébastine n'a

pas été approuvée sur le marché nord-américain et cela, pour les mêmes raisons de proarythmie possible.³⁴⁴⁻³⁴⁸

Homéostasie vasculaire et rôle des CYP450s

Les vasodilatateurs, oxyde nitrique (NO) et prostacycline (PGI₂), et les vasoconstricteurs, endothéline et thromboxane A₂, représentent les autocoïdes les mieux caractérisés quant à la régulation du tonus vasculaire local.³²⁴ Il a été démontré qu'il existe un autre mécanisme de relaxation endothéliale indépendant du NO et de la PGI₂ au niveau des artères coronariennes et rénales.³⁴⁹ Dès les premières études sur ce sujet, il a été suggéré que cette vasodilatation était médiée par un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF). En fait, un EDHF est par définition une substance libérée des cellules endothéliales qui entraîne une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses et capable d'induire une relaxation. Le lien possible entre l'activité de CYP450s et la génération d'EDHF a été largement investigué. Plusieurs EDHF ont été retrouvés dans différents lits vasculaires et chez différentes espèces, mais le facteur hyperpolarisant produit par les artères coronariennes et rénales chez l'humain et chez différentes espèces animales comme le rat, le lapin, le cochon, le chien et le bovin présentait des caractéristiques semblables à ceux de métabolites d'acide arachidonique générés par des CYP450s.³⁵⁰⁻³⁵⁶ Tel que montré dans divers lits artériels, cette vasodilatation indépendante du NO/PGI₂ est sensible à la présence d'inhibiteurs de CYP450s (clotrimazole et miconazole). Et puisqu'il a été rapporté que des CYP450s sont retrouvés dans les cellules endothéliales, il fut proposé que des métabolites de l'acide arachidonique pourraient être formés localement et être responsables de la vasodilatation observée.³⁵⁷⁻³⁶¹ Les recherches sur ce sujet se poursuivent, même si les EETs sont considérés comme des candidats potentiels d'EDHF puisqu'ils entraînent une hyperpolarisation et une relaxation des cellules du muscle lisse vasculaire.^{362, 363} Les effets cardioprotecteurs des EETs sont expliqués par leurs propriétés vasodilatatrices, anti-inflammatoires et anti-fibrotiques.^{364, 365} Comparativement au cortex rénal humain, le cœur contient environ 5 fois moins d'EETs totaux et possède un profil métabolique différent de celui retrouvé dans le rein.

L'époxydation de l'acide arachidonique en différents régio-isomères est principalement catalysée via les CYP2J2, CYP2C8 et CYP2C9. Toutefois, d'autres isoenzymes des CYP450s pourraient contribuer aussi à la biosynthèse d'EETs dont les CYP1A, CYP2B, CYP2D, CYP2E et CYP4A.³⁶⁶ La détermination spécifique de la

contribution de chacune de ces isoenzymes dans la production d'EETs est complexe puisque certaines isoenzymes ne possèdent pas d'inhibiteurs spécifiques, certaines conditions pathologiques semblent modifier l'expression de certaines isoformes, des isoenzymes subissent l'influence de polymorphismes génétiques et ce système vasodilatateur indépendant du NO et de la PGI₂ apparaît davantage comme un système de second recours.

Il a été rapporté que l'ajout d'inducteurs de CYP450s comme la β -naphthoflavone entraîne une augmentation de la synthèse d'EETs ainsi qu'une relaxation plus importante tant dans les cellules endothéliales coronariennes humaines en culture que des cellules porcines.^{338, 357-361} À l'inverse, la transfection de cellules coronariennes porcines avec des oligonucléotides antisense CYP2C a résulté en une diminution de l'expression des CYP2Cs et une réponse vasculaire moindre quant à la dilation qualifiée EDHF-dépendante.³⁵⁷⁻³⁶¹ Un autre groupe de recherche, Node *et al.*, a étudié plus particulièrement l'implication possible du CYP2J2 dans la production endothéliale de dérivés d'acide arachidonique. Ils ont mesuré la synthèse d'EETs dans des cellules aortiques endothéliales bovines ayant été préalablement transfectées avec le CYP2J2.³³⁸ L'ajout de l'inhibiteur de CYP450 (SKF-525A) a diminué de 80% la formation de métabolites d'acide arachidonique dans les cellules surexprimant le CYP2J2. Quelques études ont rapporté que dans les cellules endothéliales, l'EET formé par le CYP2J2 inhibait l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, l'adhésion de leucocytes sur la paroi vasculaire et améliorait la récupération post-ischémique.^{338, 367, 368}

Plusieurs isoformes des CYP450s sont inhibés en présence de concentrations élevées de NO. D'ailleurs, Bauersachs *et al.* ont rapporté que le NO inhibe la vasodilatation CYP-EDHF dépendante dans les artères coronariennes.³⁶⁹ La vasodilatation EDHF-dépendante est à peine détectable en absence de l'inhibition de la NO-synthase et de la cyclo-oxygénase suggérant qu'en situation physiologique normale la voie EET/EDHF serait mineure et agirait comme mécanisme de réserve lors de dysfonction endothéliale quand la disponibilité de NO est réduite.³⁶⁹

En plus de la production de métabolites vasoactifs, les CYP450s génèrent aussi des radicaux libres. Ces derniers peuvent être générés durant le cycle de réaction lors du transfert à la molécule d'oxygène de l'électron servant à la réduction du fer du groupement hème.³⁷⁰⁻³⁷² La production de radicaux libres constitue en fait le

résultat de la consommation de NADPH par le système enzymatique des mono-oxygénases. Par conséquent, les CYP450s exprimés dans le tissu vasculaire pourraient contribuer à la formation de radicaux libres dans la paroi vasculaire. De fait, Fleming *et al.* ont rapporté que les CYP2C_s exprimés dans les coronaires porcines généraient suffisamment de radicaux libres pour altérer le degré de dilatation dépendante du NO.³⁷³ Il faut noter que la capacité à produire des radicaux libres diffère selon les isoenzymes du CYP450.³⁷² Par exemple, le CYP2J₂ lequel est fortement exprimé dans le tissu cardiovasculaire, ne génère pas de radicaux libres.^{365, 367} À l'inverse, le CYP2E₁ est une isoforme pouvant générer des radicaux libres. D'ailleurs, l'apoptose cellulaire associée à l'activation du CYP2E₁ a été expliquée par sa production de radicaux libres.³⁷⁴⁻³⁷⁶

En somme, les CYP450s exprimés dans le tissu cardiovasculaire semblent jouer un rôle important dans la vasodilatation endothélium-dépendante lors de situations associées à des états de dysfonction endothéliale, par la formation de dérivés de l'acide arachidonique. Toutefois, l'activation soutenue de certaines isoformes du CYP450 apparaît délétère pour le maintien de l'homéostasie vasculaire dû à la production simultanée d'EET et de radicaux libres. Nous pouvons supposer que des états pathologiques puissent affecter cet équilibre et moduler l'expression de certaines isoenzymes, de même qu'il est possible que certaines isoenzymes puissent être impliquées dans le processus de développement de pathologies cardiaques. De plus, il faut ajouter que des isoenzymes subissent l'influence de polymorphismes génétiques lesquels pourraient aussi affecter l'équilibre, prédisposer ou protéger le développement de maladies, ainsi que modifier la réponse aux médicaments.

iv) CYP450 DANS LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

Le rôle des CYP450s tant dans la protection que dans l'initiation et la progression de maladies cardiovasculaires fait l'objet de nombreuses études. En plus de l'importance physiologique des CYP450s dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire comme décrit précédemment, il faut mentionner que des isoenzymes des CYP450s semblent aussi jouer un rôle délétère pour certaines maladies cardiovasculaires incluant l'infarctus du myocarde, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose et les arythmies. Les notions relatives aux

CYP450s cardiaques en lien avec des maladies cardiovasculaires, principalement l'insuffisance cardiaque, seront présentées pour quelques isoenzymes.

CYP1A

La sous-famille CYP1A présente un intérêt particulier en raison de son implication dans le métabolisme et l'activation de certains produits toxiques et carcinogènes. Le CYP1A1 est exprimé dans les cardiomyocytes, l'endothélium vasculaire et les cellules musculaires lisses.^{332, 377, 378} Cette isoforme est hautement inductible via son ligand AhR (aryl hydrocarbon receptor) qui est un facteur transcriptionnel régulant plusieurs isoenzymes du CYP450 dont le CYP1A1.³⁷⁹ De plus, le facteur AhR est aussi hautement exprimé dans le cœur.³⁷⁹ Des études ont démontré que l'expression cardiaque de CYP1A1 chez la souris et le rat était induite suivant un traitement avec des inducteurs comme la β -naphthoflavone.^{377, 380, 381}

Il a été montré que l'estradiol est capable d'inhiber l'apoptose des myocytes cardiaques, et il est connu que l'apoptose contribue à la perte de cardiomyocytes en insuffisance cardiaque. Les travaux de Satoh *et al.* suggèrent que l'estradiol pourrait jouer un rôle cardioprotecteur de par leur effet anti-apoptotique.³⁸² Il a été rapporté que les effets inhibiteurs de l'estradiol sur la croissance des fibroblastes cardiaques sont bloqués par des inhibiteurs sélectifs de CYP1A1. Dubey *et al.* ont montré que les effets anti-mitogéniques de l'estradiol sur la croissance de fibroblastes cardiaques sont influencés en partie par la conversion de l'estradiol en hydroxyestradiol par le CYP1A1.³⁸³ Selon ces auteurs, les métabolites hydroxyestradiol sont encore plus puissants pour réduire la croissance des fibroblastes cardiaques que le produit mère, l'estradiol. Par conséquent, l'estradiol et ses métabolites formés entre autres par le CYP1A1 apparaissent jouer un rôle protecteur contre l'hypertrophie cardiaque.

CYP2C

Le rôle physiologique des CYP2C9 et CYP2C8 est connu. Effectivement ces isoenzymes sont impliqués dans la génération de facteurs endogènes responsables de la réponse dépendante au EDHF. À l'inverse, certaines études ont soulevé l'implication potentiellement néfaste des CYP2Cs. Par exemple, il a été rapporté que le CYP2C9 peut générer dans les cellules endothéliales des radicaux libres qui contribuent aux dommages lors de la reperfusion suite à un infarctus du myocarde et au processus de dysfonction endothéliale en altérant ADN, protéines et lipides..^{324, 373} Par conséquent, il existe actuellement un intérêt particulier afin

d'étudier et d'évaluer l'effet des CYP2Cs dans des maladies comme l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque.

L'ARNm associé aux CYP2C8 et CYP2C9 a été détecté dans le myocarde humain et dans des cellules endothéliales.^{333, 384-386} Toutefois, il faut noter que les données quant à la présence de CYP2C9 dans le tissu cardiaque sont contradictoires. Les différences observées entre les études peuvent être expliquées entre autres par la taille limitée des échantillons inclus dans les études, à l'expression qui paraît très variable pour cette isoenzyme dans le cœur et au haut degré d'homologie entre ces deux isoformes. L'étude de Delozier *et al.* évaluait l'expression des CYP2C8, CYP2C9 et CYP2J2 dans différentes parties de tissus cardiovasculaires humains soit, le cœur (ventricule gauche), l'aorte et les artères coronariennes.³²⁸ Ils ont trouvé que les CYP2J2 et CYP2C8 sont les principales isoformes exprimées dans le cœur, alors que dans l'aorte et les coronaires, les quantités d'ARNm de CYP2C9 étaient supérieures aux CYP2C8 et CYP2J2.³²⁸ Dans la plupart des cœurs évalués (à l'exception d'un seul échantillon lequel provenait d'un cœur ischémique) l'expression de protéines CYP2C9 était sous le seuil de détection. Bien que la quantité d'ARNm pour le CYP2C8 était faible, la protéine a toutefois été détectée dans tous les cœurs. Le rôle cardiovasculaire du CYP2C9 semble s'établir davantage au niveau endothélial alors que dans les myocytes cardiaques, l'activité CYP2C serait attribuée à l'activité de l'isoenzyme CYP2C8.

L'ischémie et la reperfusion peuvent contribuer aux dommages tissulaires suite à un infarctus du myocarde. En fait, durant la reperfusion, le cœur subit des dommages supplémentaires dû principalement à la génération de radicaux libres.³⁸⁷ Des auteurs ont proposé un rôle possible du CYP2C9 dans l'infarctus du myocarde et la récupération post-ischémique.³⁸⁸⁻³⁹⁰ À l'aide d'un modèle d'ischémie-reperfusion, des études ont évalué l'effet d'inhibiteurs de CYP2C9 dont le chloramphenicol, la cimétidine et le sulfaphénazole.³⁸⁸⁻³⁹⁰ Brièvement, le sulfaphénazole, l'inhibiteur le plus puissant, a réduit substantiellement la taille de l'infarctus mais que très légèrement la libération de créatine kinase. Ainsi, il semble que les CYP450s auraient des implications directes dans les dommages lors de la reperfusion du myocarde tel que démontré avec les études chez l'animal. Chez l'humain, des études sont nécessaires afin d'élucider si effectivement le CYP2C9 présente une implication comparable dans l'ischémie-reperfusion.

La progression de l'athérosclérose est associée avec une oxydation importante des lipoprotéines de faible densité (LDL). La formation de LDL oxydés s'élève suite à une augmentation de la production de radicaux libres. Il a été rapporté que les LDL oxydés causent une régulation à la baisse des niveaux de CYP450s dont le CYP2C9 dans les cellules endothéliales coronariennes.³⁹¹ Cette étude montre une association entre les LDL oxydés et la hausse de la production de radicaux libres entraînant une perte de l'activité de facteur nucléaire-1 (NF-1). Le mécanisme par lequel l'expression de CYP450s est réduite peut être expliqué par les observations de Morel et Barouki qui ont montré que ce facteur nucléaire, NF-1, est un régulateur de l'expression des CYP450s.³⁹²

Certaines isoenzymes du CYP450 seraient impliquées dans l'induction de l'angiogénèse. Tel que décrit dans deux études, la prolifération de cellules endothéliales qui est associée avec l'angiogénèse serait reliée à l'expression de CYP2C9.^{393, 394} Par exemple, une surexpression de CYP2C9 dans des cellules endothéliales était associée à une augmentation de 50% de la prolifération cellulaire, alors que l'ajout de sulfaphénazole prévenait cette augmentation.³⁹⁴

Récemment, de nouveaux mécanismes pour expliquer l'incidence de maladies cardiovasculaires ont été proposés.³⁹⁵ Par exemple, l'augmentation du risque d'infarctus du myocarde fatal par la fumée de cigarette pourrait aussi être expliquée par la régulation à la hausse d'isoenzymes cardiaques. Également, des études ont rapportées que des médicaments hypolipémiants, les statines, qui sont pour la plupart des inhibiteurs de CYP450s, réduiraient ainsi le risque cardiovasculaire indépendamment de leurs effets sur la baisse de cholestérol. De plus, sachant qu'il existe des polymorphismes génétiques associés aux isoenzymes CYP2C8 et CYP2C9, certains chercheurs se sont intéressés au lien possible entre les variabilités génétiques et la susceptibilité à certaines maladies cardiovasculaires. Une étude a suggéré une augmentation du risque d'infarctus du myocarde chez les individus *CYP2C8*3*.³⁹⁶

Tandis que l'inhibition de CYP2C9 durant un infarctus du myocarde semble cardioprotecteur, la stimulation chronique du CYP2C9 apparaît aussi être cardioprotecteur par la production de dérivés de l'acide arachidonique. Il est possible qu'à court terme, l'activité du CYP2C9 soit délétère due à la formation de radicaux libres lesquels contribuent à la mort cellulaire et à la détérioration de la vasodilatation dépendante du NO en épuisant ce dernier. Alors qu'à long terme, la

production de métabolites formés par les CYP450s comme les EET et HETE (lesquels sont impliqués dans l'homéostasie cardiovasculaire et l'angiogénèse) peut être bénéfique en augmentant la perfusion et possiblement la formation de vaisseaux collatéraux.

CYP2J

Les recherches sur le CYP2J2 sont relativement récentes. Le CYP2J2 est l'isoenzyme prédominante dans le tissu cardiaque. D'ailleurs tel que décrit par Bièche *et al.*, le CYP2J2 est l'isoenzyme prédominante au niveau de quatre tissus extrahépatiques, soit le cœur, le placenta, les glandes salivaires et le muscle squelettique.³⁹⁷ Wu *et al.* ont tenté d'évaluer la variabilité interindividuelle dans l'expression de CYP2J2 et de comparer les niveaux d'expression entre différents organes pour cette isoenzyme.³³⁵ Leur étude révèle 1) que la protéine associée au gène *CYP2J2* était hautement exprimée dans tous les échantillons de cœur humain, 2) qu'il existe une variation interindividuelle plus grande dans l'expression de CYP2J2 cardiaque comparativement au CYP2J2 hépatique et 3) qu'il y a une expression de CYP2J2 toujours plus élevée dans le cœur que dans les tissus extracardiaques. Leur étude indique également que le CYP2J2 est une isoenzyme impliquée dans la cascade métabolique de l'acide arachidonique cardiaque.

Puisque le CYP2J2 est retrouvé dans le tissu cardiaque ainsi que dans l'endothélium vasculaire et que les produits formés par le CYP2J2 comme les EETs, sont cardioprotecteurs, Yang *et al.* ont évalué si le niveau d'expression de CYP2J2 pourrait influencer certaines manifestations pathophysiologiques suivant une ischémie-reperfusion et si les dommages cellulaires pourraient être réduits par le maintien de l'activité de CYP2J2.³⁶⁷ Ces auteurs ont décrit un nouveau rôle fonctionnel pour le CYP2J2 et ses dérivés éicosanoïdes qui consiste à limiter les dommages suivant une hypoxie-réoxygénation. En fait, ils ont soumis des cellules aortiques endothéliales bovines à une hypoxie suivie d'une période de réoxygénation. Leurs résultats montraient que le niveau protéique de CYP2J2 était réduit suivant une hypoxie-réoxygénation et les dommages cellulaires étaient atténués dans les cellules transfectées avec CYP2J2. En fait, la transfection avec un vecteur permettant l'expression du CYP2J2 était associée à une surexpression de la protéine et une augmentation de l'activité en époxygénase lorsque l'acide arachidonique était utilisée comme substrat. À l'inverse, l'activité était réduite lors de l'ajout d'un inhibiteur puissant des CYP450s (SKF-525A). Une diminution de la production de superoxydes a été observée dans les cellules

endothéliales aortiques bovines surexprimant du CYP2J2 suggérant que les effets cardioprotecteurs du CYP2J2 puissent être expliqués par ses effets antioxydants.

Afin de déterminer les effets de CYP2J2 sur le cœur, plusieurs études ont été réalisées à l'aide de souris transgéniques surexprimant du CYP2J2 et/ou de cardiomyocytes de souris et de rats. Par exemple, une étude a montré que la récupération post-ischémique de la fonction contractile a été significativement améliorée chez les souris transgéniques surexprimant du CYP2J2.³⁹⁸ Ke *et al.* ont caractérisé les effets électrophysiologiques d'une surexpression de CYP2J2 en utilisant des cardiomyocytes provenant de souris transgéniques surexprimant cette isoenzyme.³⁹⁹ Ils ont trouvé que la durée du potentiel d'action dans les cardiomyocytes de souris transgéniques pour le CYP2J2 est raccourcie comparativement aux cardiomyocytes normaux. L'inhibition de l'activité des CYP450s (par le MS-PPOH) ou l'addition d'anticorps spécifiques contre le CYP2J2 ont augmenté la durée du potentiel d'action cardiaque et diminué le courant potassique dans les cardiomyocytes transgéniques. Au contraire, aucun effet n'a été noté chez les souris normales non-transfectées (wild-type). Ke *et al.* suggèrent le même mécanisme que celui proposé par Xiao *et al.* concernant les effets d'une surexpression du CYP2J2 sur les canaux potassiques cardiaques. De fait, ils suggèrent que les dérivés d'EETs générés par le CYP2J2 entraîneraient une phosphorylation des canaux potassiques via une modulation d'une voie de signalisation intracellulaire.^{400, 401}

Spiecker *et al.* furent les premiers à montrer une association entre la présence d'un polymorphisme génétique du CYP2J2, le *CYP2J2*7*, et le risque de maladie cardiaque coronarienne.⁴⁰² L'expression d'ARNm du *CYP2J2* dans les cœurs explantés d'individus porteurs de l'allèle *CYP2J2*7* (-50G>T) était en moyenne 38% plus faible que les individus homozygotes GG.⁴⁰² Également, il a été rapporté que les concentrations circulantes de DHETE, un métabolite stable d'EETs, étaient également plus faibles chez les individus avec l'allèle T comparativement aux sujets normaux (wild-type, GG). Bien que la prévalence d'évènements cardiovasculaires était plus élevée chez les patients porteurs du variant allélique *CYP2J2*7*, cette relation n'a pas atteint le seuil de significativité.⁴⁰² Une étude effectuée auprès de la population de Taiwan a montré que la présence d'un ou de deux variants alléliques (-50T) était plus fréquente dans le groupe avec un infarctus du myocarde que dans le groupe contrôle.⁴⁰³ À l'inverse, chez les Africain-américains, la présence du variant allélique a été associée à un risque moindre de maladie cardiaque

coronarienne alors qu'une relation significative n'a pu être établie chez les individus caucasiens non-hispaniques.⁴⁰⁴ Marciante *et al.* ont étudié la relation possible entre différents variants du *CYP2J2*, *CYP2C8* et *CYP2C9*, le risque d'infarctus et d'accidents cérébro-vasculaires.⁴⁰⁵ Ils ont trouvé que deux variants du *CYP2J2* étaient associés à un risque accru d'infarctus du myocarde.⁴⁰⁵ Toutefois, cette étude n'a rapporté aucune association entre des variants de *CYP2J2*, *CYP2C8* ou de *CYP2C9* avec le risque d'accidents cérébro-vasculaires.⁴⁰⁵ Brièvement, bien que plusieurs études aient investigué la relation entre la présence de variations génétiques dans le gène *CYP2J2* et l'incidence de maladies cardiovasculaires, les conclusions à tirer demeurent controversés.

CYP2E

L'expression de CYP2E1 semble significativement supérieure dans les fractions microsomiques de myocarde provenant de patients avec une cardiomyopathie dilatée que ceux provenant de patients décédés d'insuffisance cardiaque progressive causée par une maladie ischémique cardiaque ou de cœurs de sujets témoins (normaux).¹²²

Sidorik *et al.* ont également observé que la quantité de CYP2E1 dans la fraction cytoplasmique des cardiomyocytes de patients avec une cardiomyopathie ou une insuffisance cardiaque secondaire à une ischémie était considérablement plus élevée comparativement aux cœurs normaux. En accord avec les résultats de d'autres études, ils ont proposé que l'accumulation de cytochromes dans le cytoplasme pouvait être un marqueur des lésions oxydatives dans les cardiomyocytes, ceci pouvant induire une apoptose dans les cellules musculaires cardiaques.^{122, 406, 407} Ces données suggèrent un rôle pathogénique de l'activité du CYP2E1 secondaire à une détérioration des mécanismes antioxydatifs et antistress présents dans le myocarde. En effet, l'augmentation de l'activité du CYP2E1 entraînerait une accumulation de radicaux libres au sein du cardiomyocyte.¹²²

CYP4A

Suite à différents stimuli, l'acide arachidonique est libérée des phospholipides membranaires. Suivant son relargage, les isoenzymes CYP4As peuvent catalyser sa biotransformation en acide hydroxyeicosatétranoïque (dont le 20-HETE). La famille CYP4A est principalement impliquée dans le métabolisme d'acide gras (à moyenne et longue chaînes).⁴⁰⁸ Les CYP4As sont exprimés entre autres dans le foie, les reins, le cœur et le muscle squelettique.^{332, 377, 409, 410} Le métabolite 20-HETE a la capacité d'agir tant comme agent prohypertenseur qu'antihypertenseur

dépendamment du site de sa biosynthèse et du lieu d'action.⁴¹¹⁻⁴¹³ De plus, ce métabolite serait impliqué dans la régulation de l'angiogénèse. En fait, le 20-HETE agirait comme second messager lors de réponses vasoactives et mitogéniques. Par exemple, les travaux de Chen *et al.* ont montré qu'*in vitro* le 20-HETE possède des effets mitogéniques dans des cellules endothéliales et *in vivo*, des effets angiogéniques.⁴¹⁴ Les inhibiteurs sélectifs du CYP4A bloquent l'activité mitogénique du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) *in vitro* et *in vivo* et inhibent aussi l'effet angiogénique. Ces auteurs suggèrent qu'un métabolite formé par la sous-famille CYP4A aurait un rôle majeur dans la régulation de l'angiogénèse, soit comme médiateur ou comme facteur permissif. Ils proposent également que l'inhibition des CYP4As pourrait constituer une nouvelle approche pour réduire la réponse angiogénique.⁴¹⁴ En accord avec ces résultats, d'autres études ont observé que la surexpression de CYP4A a induit l'angiogénèse, phénomène attribué à une production augmentée de 20-HETE.⁴¹⁵⁻⁴¹⁸ Il y a plusieurs évidences qui supportent un rôle central des CYP4As et particulièrement, son métabolite 20-HETE, dans la régulation de d'autres molécules ou voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération et la croissance cellulaire.^{414, 416}

Thum et Borlak ont rapporté que chez le rat, l'expression de CYP4A1 dans le tissu cardiaque provenant du ventricule gauche était sous la limite de détection, alors que chez l'humain, le CYP4A11 a été détecté tant dans les coeurs normaux qu'hypertrophiques.³³² L'expression relative de CYP4A11 était deux fois supérieure dans les échantillons de coeurs avec hypertrophie que dans les coeurs normaux.³³² Dans leur étude, ils ont également évalué le métabolisme cardiaque de la testostérone et ils rapportent une augmentation du métabolisme de la testostérone dans les échantillons de coeurs avec hypertrophie cardiaque.³³² Cette augmentation métabolique était corrélée avec les changements d'expression des isoenzymes dont le CYP4A11.³³² Le groupe d'Ishizuka *et al.* a tenté d'établir un lien entre les androgènes et la production de 20-HETE ; leurs résultats montrent que les variations dans la production rénale de 20-HETE correspondaient aux niveaux protéiques de CYP4A.⁴¹⁹ Il est intéressant de noter que la production rénale de 20-HETE était significativement plus élevée dans le groupe de rats avec hypertension par rapport au groupe contrôle.⁴¹⁹ De plus, Lasker *et al.* ont rapporté que la conversion de l'acide arachidonique en 20-HETE par le CYP4A11 au niveau rénal serait impliquée dans la régulation de la pression sanguine. Une étude a montré que le variant allélique *CYP4A11* (8590T>C) était associé à l'hypertension.⁴²⁰ Par conséquent, les effets reliés aux HETEs pourraient influencer le processus de

pathogénèse associé au développement de certaines maladies cardiovasculaires comme l'hypertension et l'insuffisance cardiaque.

CYP11B

Il semble que la famille CYP11B joue un rôle primordial dans l'insuffisance cardiaque. Puisque que cette famille est davantage impliquée dans le métabolisme de composés endogènes comme l'aldostérone, les CYP11Bs n'ont pas été évalués au cours de notre projet. Les CYP11Bs seront tout de même vus brièvement étant donné qu'ils représentent un bel exemple de l'implication physiologique possible des CYP450s dans le cœur et de ses répercussions cliniques. Le CYP11B2, aussi nommé aldostérone synthase, est impliqué dans la biotransformation de glucocorticoïdes en aldostérone, enzyme que l'on croyait exprimée et active exclusivement au niveau du cortex rénal. Des études réalisées chez le rat ont révélé la présence d'aldostérone synthase dans le myocarde et détecté des concentrations d'aldostérone dans le cœur supérieures à celles présentes dans le plasma. Ceci indique que le tissu cardiaque peut synthétiser localement de l'aldostérone.⁴²¹ Satoh *et al.* ont montré chez des patients avec insuffisance cardiaque que l'augmentation d'ARNm du CYP11B2 dans le myocarde était associée à une plus grande fibrose myocardique et à une dysfonction ventriculaire gauche plus sévère.³²⁹ Ils ont également observé que l'administration de spironolactone et d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) amenaisait ces effets ; les patients prenant ces médicaments présentaient une expression moindre de CYP11B2 et moins de fibrose cardiaque.³²⁹ Le groupe de Young *et al.* ont aussi détecté l'ARNm du CYP11B2 dans des échantillons provenant de cœurs avec insuffisance cardiaque.³³⁰ Par contre, ce même ARNm n'a pu être détecté dans les cœurs d'individus sans pathologie apparente.³³⁰ Ces études démontrent qu'il y aurait une variabilité dans le degré d'expression du CYP11B2 et confirment le rôle de cette isoenzyme dans la pathophysiologie de l'insuffisance cardiaque; ainsi une augmentation dans l'expression du gène *CYP11B2* dans les cœurs de patients souffrant d'insuffisance cardiaque pourraient entraîner une synthèse locale augmentée d'aldostérone laquelle pourrait aggraver leur condition pathologique.

Conclusion

Plusieurs études ont montré la présence d'ARNm associée à différentes isoenzymes du CYP450 ainsi que l'expression des protéines correspondantes dans

le tissu cardiovasculaire animal et humain. Bien que les résultats soient quelques fois contradictoires, nous savons assurément que des CYP450s sont exprimés au niveau cardiaque. L'implication des CYP450s dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire (par exemple, le tonus vasculaire) a été démontrée bien que l'identification des métabolites et des isoenzymes exactes impliquées à long terme dans la régulation de l'homéostasie et dans le développement de pathologies cardiovasculaires reste à préciser.

Il faut noter que la majorité des études a été réalisée avec du tissu animal et que celles réalisées avec des cœurs humains ont souvent été effectuées sur un nombre restreint d'échantillons. Il y a donc un intérêt à valider à partir d'un échantillonnage plus grand de tissu cardiaque humain la présence d'ARNm associé aux isoenzymes du CYP450 et d'en évaluer leur fonctionnalité. Il faut mentionner que la banque de tissus cardiaques à laquelle nous avons accès était principalement constituée de cœurs provenant de patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Dans un premier temps, notre projet avait pour but d'identifier et de confirmer l'expression de différentes isoenzymes du CYP450 dans le cœur humain auprès d'une cohorte composée d'un plus large échantillonnage que celles évaluées jusqu'à présent. Puis, nous avons évalué si l'expression relative d'ARNm associé au gène des *CYP450s* dans les échantillons de cœurs provenant de patients avec insuffisance cardiaque était différente de celle retrouvée chez des cœurs provenant de donneurs sains. Enfin, nous avons élaboré un protocole pour la préparation de microsomes cardiaques afin d'évaluer la capacité métabolique des CYP450s retrouvés dans le tissu cardiaque.

Les résultats de ce projet de recherche seront présentés à l'aide de deux articles ; l'un portant sur la présence et la modulation des CYP450s cardiaques dans des cœurs explantés provenant de patients souffrant d'insuffisance cardiaque et de cœurs normaux. Le second article porte sur la préparation de microsomes cardiaques et le métabolisme cardiaque.

v) ARTICLE 4

Determination of Cardiac mRNA Levels of CYP450s Involved in the Metabolism of Drugs from a Large Cohort of Patients with End-stage Heart Failure and Healthy Subjects

Article prêt pour soumission: European Journal of Heart Failure

Véronique Michaud, Martin Frappier et Jacques Turgeon.

vi) ARTICLE 5

Metabolism of domperidone and verapamil by human heart microsomal fractions.*

Article à soumettre : FASEB Journal

Véronique Michaud, Marie-Christine Dumas et Jacques Turgeon.

*Veuillez noter que cet article sera présenté en français.

**DETERMINATION OF CARDIAC mRNA LEVELS OF CYP450s INVOLVED IN THE METABOLISM
OF DRUGS FROM A LARGE COHORT OF PATIENTS WITH END-STAGE HEART FAILURE AND
HEALTHY SUBJECTS.**

Veronique Michaud, B.Pharm., M.Sc., Martin Frappier, B.Sc.,
and Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.

CRCHUM, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and
Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

CORRESPONDANCE: Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

Hotel-Dieu, Masson Pavilion

3850 St.Urbain street, Room 8-107

Montréal, Québec, Canada, H2W 1T7

NUMBER OF TEXT PAGES: 10

NUMBER OF FIGURES: 3

NUMBER OF REFERENCES: 19

NUMBER OF WORDS IN THE ABSTRACT: 284

NUMBER OF WORDS IN THE INTRODUCTION: 508

NUMBER OF WORDS IN THE DISCUSSION: 692

ABSTRACT

The cytochrome P450 (CYP450) is a superfamily of enzymes involved in the metabolism of drugs. Previous studies from a limited number of human hearts have indicated that *CYP450* genes could be detected in cardiac tissues. The objective of our study were 1) to determine the relative levels of CYP450 mRNAs (CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1, CYP2J2 and CYP4A11) in explanted hearts from patients with end-stage heart failure, 2) to compare CYP450 mRNA levels in these hearts to that measured in hearts obtained from normal healthy subjects, and 3) to compare the relative levels of CYP450 mRNAs between left and right ventricular tissues. Our study was performed from the largest cohort of human heart samples (n=79) ever analyzed for the determination of the relative expression of mRNAs from CYP450 isozymes involved in the metabolism of drugs. We have confirmed that CYP2J2 mRNA is clearly the most abundant isoenzymes found (~3 million to 62 times) in the left and right ventricles of human hearts; we have obtained data suggesting that CYP2J2, CYP1A1, CYP2E1 and CYP2C8 mRNA levels are diminished (3 to 10 times) in samples from human failing hearts compared to normal hearts; we have demonstrated that CYP450 mRNAs are present at similar levels in both the left and right ventricles, and finally, that CYP2C9 could be detected in less than 10% of human hearts. In conclusion, we performed a thorough investigation of CYP450 mRNA expression using the largest cohort of human hearts ever analysed. Our results indicate that CYP450s may contribute to the local metabolism of drugs and control their intracellular levels in cardiac myocytes. Our results also suggest that the CYP450-mediated formation of endogenous compounds or metabolites of drugs may be modulated by disease state.

INTRODUCTION

The cytochrome P450 (CYP450) is a superfamily of hemoproteins that are the terminal oxidases of the mixed function oxidase system involved in the biotransformation of endogenous compounds and xenobiotics. Although CYP450 enzymes are mainly expressed in the liver, most extrahepatic tissues express CYP450 isozymes to a varying degree. The heart is no exception. Indeed, recent reports have indicated that *CYP450* genes could be detected in a cardiomyoblast cell line, in cultured rat cardiomyocytes, in rat left ventricular tissue but more importantly, in explanted human hearts.¹⁻⁶

The functional role of CYP450s in cardiovascular health and disease is gaining great interest in the scientific community.^{7, 8} For example, several studies have demonstrated the role of CYP450s expressed in cardiovascular tissues for the catabolism of endogenous compounds such as arachidonic acid and steroids.^{9, 10} Arachidonic acid is transformed into epoxyeicosatrenoic acid metabolites that regulate vascular tone and possess anti-inflammatory and anti-fibrotic properties.^{8, 11} CYP450s-mediated formation of estradiol and hydroxyestradiol is associated with a decrease in cardiomyocytes apoptosis and a protective role against cardiac hypertrophy.^{12, 13} Finally, testosterone metabolism is increased in hypertrophied hearts due to the induction of CYP450s leading to increased levels of lipid peroxidation.¹⁴

So far, 57 genes and 58 pseudogenes of this superfamily of enzymes have been characterized from the human genome. (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) Accordingly, the CYP450 superfamily is composed of 18 families and 44 sub-families of genes. Isozymes with more than 40% homology in their amino acid sequence are grouped in the same families while members of the same sub-family have a 55% homology in their sequences. Four of these families namely, CYP1, CYP2, CYP3 and CYP4 are heavily involved in the metabolism of drugs used clinically. The mRNA of ten members of these families has been detected in human heart tissues (CYP1A1, 1B1, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 4A11, 4B1).^{2, 3, 6, 13, 15, 16} Although these isozymes likely contribute to cardiovascular health and disease, they as well, could participate in the metabolism of drugs. The notion that locally mediated regulation of the intracellular concentration of drugs due to the expression of CYP450s

and membrane drug transporters is now well recognized. This might give an explanation to inter-subject variability in drug action being drug efficacy or propensity to drug toxicity.

Few studies have reported until now the relative level of expression of CYP450s from the CYP1-4 family in human heart tissues.^{2, 3, 6} Moreover, available data are currently based on a small number (often <10) of deceased normal subjects or explanted hearts from patients with various conditions. Therefore, the objective of our study were 1) to determine the relative levels of CYP450 mRNAs in a large cohort (n=66) of explanted hearts from patients with end-stage heart failure undergoing cardiac transplant, 2) to compare CYP450 mRNA levels in these hearts to that measured in hearts obtained from 6 normal healthy subjects, and 3) to compare the relative level of CYP450 mRNAs between left and right ventricular tissues in selected subjects (n=7). Studied CYP450 mRNAs are related to CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1, CYP2J2 and CYP4A11 isozymes.

METHODS

Approval for the use of tissue materials was obtained from the Ethical Review Board of the Montreal Heart Institute and in full agreement with procedures from the Réseau d'Échange de Tissus et Échantillons Biologiques du Québec (RETEB).

Preparation of samples.

Immediately after explantation, the hearts were immersed in cold transplantation buffer and rapidly mounted on an extracorporeal circulating pump and perfused for 10 minutes with the same buffer. Left and right ventricular samples (4-6 g) were prepared and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until use. Hearts from healthy subjects that could not be used for transplantation were kept in cold transplantation buffer until the decision was made not to use these tissues. Hearts were then perfused with transplantation buffer and ventricular samples prepared as described above.

Isolation of RNA and preparation of cDNA.

Total RNA was extracted from 73 human explanted hearts obtained from patients with end-stage heart failure and from 6 healthy subjects. About 50 mg of ventricular tissue was homogenized in 1 mL of Trizol and transferred in a 2 mL tube. Chloroform (200 μ L) was added, the mixture shaken for 15 seconds, and then centrifuged at 12,000g for 15 minutes. The upper aqueous layer was transferred to a new tube and ethanol 70% added (1:1 volume). RNA was extracted using the Quiagen kit (Rneasy Mini kit; Quiagen Sciences, MD, USA) according to the manufacturer's recommendation. Total RNAs (150 ng) from each samples were used for reverse transcription. RNA, random primers (3 μ g), dNTP (25 μ M) were preheated for 5 minutes at 65°C, then 5X-first strand buffer, 40 units of RNase inhibitor, DTT (0.01M) and 200 units of Superscript II (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) were added and diethylpyrocarbonate-treated water was added to a final volume of 20 μ L. Reverse transcription was carried out for 50 minutes at 42°C and stopped by heating to 70°C for 15 minutes. The resulting cDNA was frozen at -20°C until analyzed.

Real-time PCR analysis.

Quantitative real-time PCR was performed using TaqMan probe and primer sets from Applied Biosystem (Foster, CA, USA). Primers used were for: CYP1A1 (Hs00153120_m1), CYP2B6 (Hs0059368_m1), CYP2C8 (Hs00946140_g1), CYP2C9 (Hs00426397_m1), CYP2E1 (Hs0059368_m1), CYP2J2 (Hs00356035_m1) and CYP4A11 (Hs00167961_m1) and GAPDH (Hu_GAPDH) cDNA were diluted (75ng/reaction) 4-fold, mixed with TaqMan PCR Master Mix and amplified using cycling conditions for 50 cycles. Reactions were run in a RotorGene Detector model 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia).

Comparison of the relative mRNA expression of various CYP450s was performed using the Δ CT method ($CT_{CYP450} - CT_{GAPDH}$) to compare relative levels of isoenzymes among them. Data were expressed as the ratio of the target mRNA to GAPDH mRNA ($2^{-\Delta CT}$).¹⁷
¹⁸ On the other hand, mRNA levels associated with the expression of each isozymes within a specific condition (failing heart vs normal heart; or left vs right ventricles) were determined using a calibrator and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.¹⁷

Statistical analysis.

Data are expressed as mean±S.D. and when possible, individual data are presented. Relative levels of mRNA for various isozymes were compared using a two-way ANOVA. mRNA levels of each CYP450 isozymes from diseased or healthy hearts were compared using an unpaired t- test with a Welch's correction. Finally, mRNA levels of each isozyme between the left and the right ventricles for each patient were compared using a Wilcoxon signed rank test.

RESULTS

All results presented in this section are expressed relative to the house keeping gene *GAPDH* that was uniformly expressed in all tissues analyzed.

Relative levels of expression of CYP450 mRNAs measured in human hearts.

Figure 1 illustrates mRNAs levels of CYP450s of interest measured in the entire cohort of hearts studied (healthy and diseased). CYP2J2 mRNA levels exceeded largely (~3 million to 62 times) those determined for other isozymes ($p < 0.008$). CYP4A11, CYP2E1, CYP1A1 and CYP2C8 mRNAs were present at an intermediate level while CYP2B6 and CYP2C9 mRNAs were present in some of the hearts analyzed but at a very low level.

Comparison of the expression level of each CYP450 mRNAs between heart failure patients and healthy subjects.

Left ventricular samples obtained from the RETEB were mostly from patients with end-stage heart failure ($n=66$) although samples were also obtained from 6 «normal» hearts that were deemed not compatible for transplantation. This provided us with the opportunity to compare the level of expression of CYP450 mRNAs between «normal» and «failing hearts». On average, we observed that the level of expression of CYP450 mRNAs in normal hearts were higher (4/6) or similar (2/6) to those measured in failing hearts (Figure 2). More specifically, higher levels of CYP2J2 (16 ± 26 vs 1.8 ± 0.9), CYP1A1 (10 ± 13 vs 2 ± 6), CYP2E1 (2.4 ± 2.6 vs 0.7 ± 0.5), and CYP2C8 (0.9 ± 1.1 vs 0.3 ± 0.2) mRNAs were observed in normal heart samples compared to failing hearts.

The dispersion of mRNA levels among hearts was variable (~100-fold) and especially for CYP1A1 and CYP2J2 where a 1000-fold variability in the expression was observed.

Comparison of the relative expression of CYP450 mRNAs between left and right ventricular samples.

Samples were also obtained in a limited number of subjects from both the left and right ventricles such that comparison could be made between these two tissues (Figure 3). Overall, our results show that no major differences are observed in the relative expression of CYP450s among the left and right ventricular tissues. The only exception could be for CYP2E1 mRNAs where higher levels tended to be observed for the right ventricle (1.0 ± 0.5 vs 0.6 ± 0.3 ; $p=0.04$).

DISCUSSION

Results reported in this study are from the largest cohort of human heart samples ($n=79$) ever analyzed for the determination of the relative expression of mRNAs from CYP450 isozymes involved in the metabolism of drugs. Our study also comprises data from normal human hearts that could not be used for organ transplant and compares left and right ventricular tissues. We have confirmed that CYP2J2 mRNA is clearly the most abundant in the left and right ventricles of human hearts; we have obtained data suggesting that CYP2J2, CYP1A1, CYP2E1 and CYP2C8 mRNA levels are diminished in samples from human failing hearts compared to normal hearts; we have demonstrated that CYP450 mRNAs are present at similar levels in both the left and right ventricles, and finally, that CYP2C9 could be detected in less than 10% of human hearts.

Zeldin's group reported in 1996 that CYP2J2 was highly expressed in human heart tissues using immunoblotting techniques. Their study was followed by the report of Thum and Borlak who demonstrated using Real-Time PCR assays that several CYP450s were expressed in human heart. Having access to 7 explanted hearts from patients with heart failure and 2 hearts from normal subjects, they demonstrated the expression of CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6 and CYP4B1. No CYP3A4, CYP3A5 or CYP3A7 could be detected. They latter also demonstrated that

these CYP450s exhibit catalytic activities towards substrates such as verapamil or testosterone.^{14, 19} Using a semi-quantitative assay and samples from a pool of human heart samples (n=3), they demonstrated that CYP2J2 and CYP1A1 were the most abundantly expressed.¹⁹ They confirmed these results in 11 diseased and 2 normal human hearts where they showed that the CYP450 gene expression in the left ventricle was confined to CYP1A1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1, CYP2J2 and CYP4A11.¹⁴ Recent studies conducted with quantitative real-time PCR and samples from 8 explanted human hearts indicated that CYP2J2 mRNA values were >900 times higher than those of CYP2C9 or CYP2C8.⁶ Our results obtained in a large cohort of human hearts are in full agreement with these pilot studies and highly confirmatory on the high expression levels of CYP2J2 mRNAs in human hearts.

Our study provides new information on a new dimension of data accumulated so far. Because of the large number of hearts studied, a measure of intersubject variability in the mRNA levels could be obtained. We have observed large intersubject variability for CYP2J2 and CYP1A1 notwithstanding the fact that CYP2C9 and CYP2B6 mRNAs were detected in only a small number of hearts. Moreover, intersubject variability was mostly explained by higher levels expressed in healthy hearts.

Data obtained in a significant number of normal hearts also allowed us to assess whether a down/up regulation of CYP450s is observed in patients with heart failure. On average, a severely diseased condition appears to be associated with a down regulation of most enzymes; no upregulation in mRNA levels tested was observed.

Finally, the group of Thum and Borlak reported previously that CYP450 mRNAs were predominant in the right ventricle and that metabolites of verapamil could be produced solely from the right ventricle of human hearts.^{2, 19} They suggested that the expression level of CYP450 mRNAs was much higher in the right than the left ventricle.² In a different study, the same group using left ventricular samples rather showed that an increase in the metabolism of testosterone due to left ventricular hypertrophy was linked to altered CYP450s expression.¹⁴ Results obtained in our study with a larger sample size clearly indicate that both ventricles can express CYP450 mRNAs and that levels are rather similar in the left and right ventricle. The only exception could be for CYP2E1.

In conclusion, we performed a thorough investigation of CYP450 mRNA expression using the largest cohort of human hearts ever analysed. Our results indicate that CYP450s may contribute to the local metabolism of drugs in the heart. This may control the intracellular level of drugs in cardiac myocytes and therefore their action or toxicity in this organ. Our results also suggest that the detoxification capacity or production of CYP450-mediated compounds may be modulated in the heart of patients with end-stage heart failure. This could be related to the disease itself or secondary to the chronic intake of several drugs.

REFERENCES

1. Thum T, Borlak J. Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Br J Pharmacol*. Aug 2000;130(8):1745-1752.
2. Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet*. Mar 18 2000;355(9208):979-983.
3. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, et al. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem*. Feb 16 1996;271(7):3460-3468.
4. Wu S, Chen W, Murphy E, et al. Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem*. May 9 1997;272(19):12551-12559.
5. Zordoky BN, El-Kadi AO. H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods*. Nov-Dec 2007;56(3):317-322.
6. Delozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, et al. Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug Metab Dispos*. Apr 2007;35(4):682-688.
7. Elbekai RH, El-Kadi AO. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther*. Nov 2006;112(2):564-587.
8. Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res*. Oct 26 2001;89(9):753-762.
9. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*. Dec 2004;25(6):947-970.
10. Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. Jun 2002;13(3):273-283.
11. Theken KN, Lee CR. Genetic variation in the cytochrome P450 epoxygenase pathway and cardiovascular disease risk. *Pharmacogenomics*. Oct 2007;8(10):1369-1383.
12. Satoh M, Matter CM, Ogita H, et al. Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1 and prevention of congestive heart failure by estrogen. *Circulation*. Jun 26 2007;115(25):3197-3204.

13. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, et al. Cytochromes 1A1/1B1- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites mediate estradiol-induced antimutagenesis in human cardiac fibroblast. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan 2005;90(1):247-255.
14. Thum T, Borlak J. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *Faseb J.* Oct 2002;16(12):1537-1549.
15. Sidorik L, Kyyamova R, Bobyk V, et al. Molecular chaperone, HSP60, and cytochrome P450 2E1 co-expression in dilated cardiomyopathy. *Cell Biol Int.* Jan 2005;29(1):51-55.
16. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, et al. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem.* Apr 2004;52(4):447-454.
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* Dec 2001;25(4):402-408.
18. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108.
19. Walles M, Thum T, Levsen K, et al. Verapamil: new insight into the molecular mechanism of drug oxidation in the human heart. *J Chromatogr A.* Sep 13 2002;970(1-2):117-130.

FIGURE LEGENDS

- FIGURE 1:** Relative levels of expression of CYP450 mRNAs measured in human hearts. Levels were determined and compared using the $2^{-\Delta\text{CT}}$ method without a calibrator.
- FIGURE 2:** Comparison of the expression level of each CYP450 mRNAs between heart failure patients and healthy subjects. On average, the level of expression of CYP450 mRNAs in normal hearts were higher (4/6) or similar (2/6) to those measured in failing hearts. Large intersubject variability was observed for CYP2J2 and CYP1A1. Levels were determined and compared using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method with a calibrator.
- FIGURE 3:** Comparison of the relative expression of CYP450 mRNAs between left and right ventricular samples (n=7). No major differences are observed in the relative expression of CYP450s among the left and right ventricular tissues except for CYP2E1 mRNAs where higher levels tended to be observed for the right ventricle (1.0 ± 0.5 vs 0.6 ± 0.3 ; $p=0.04$). Levels were determined and compared using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method with a calibrator. RV: right ventricle and LV: left ventricle.

TABLE I

Characteristics of patients included in our study.

<i>Demographic data</i>	<i>Cohort n=74/81</i>
Gender (male:female)*	
Weight (kg)*	73 ± 19
Height (cm)*	170 ± 9
Number of left ventricle samples	74
& right ventricle samples	7
Total number of diseased heart	68
& normal donors	6

**Information is available for diseased heart samples only.*

Mean ±SD

FIGURE 1

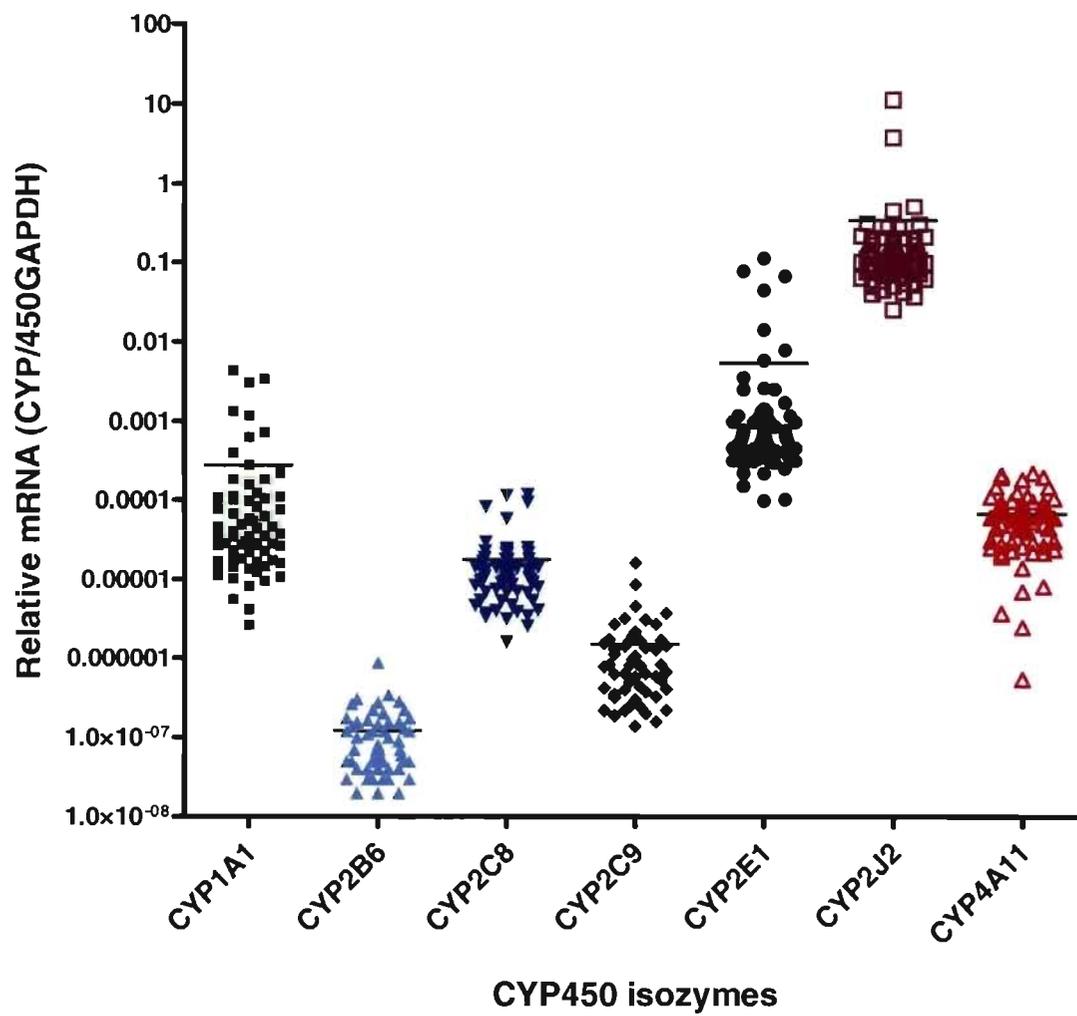
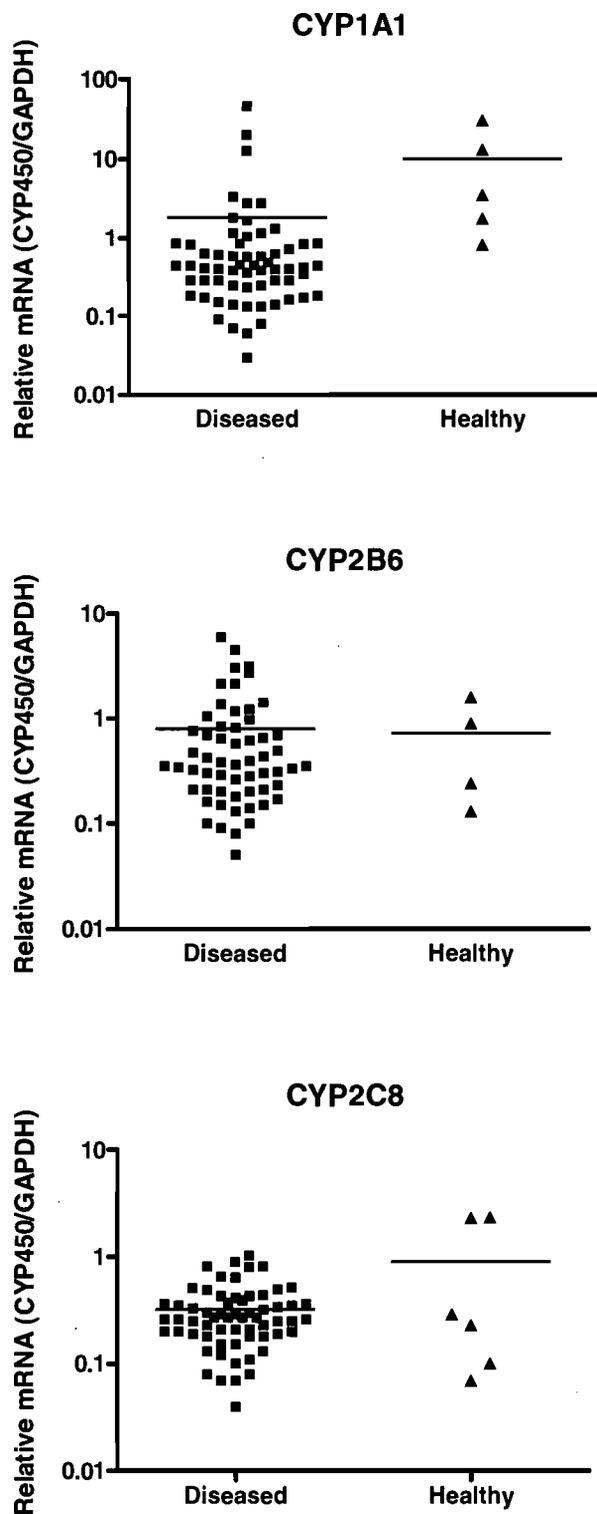
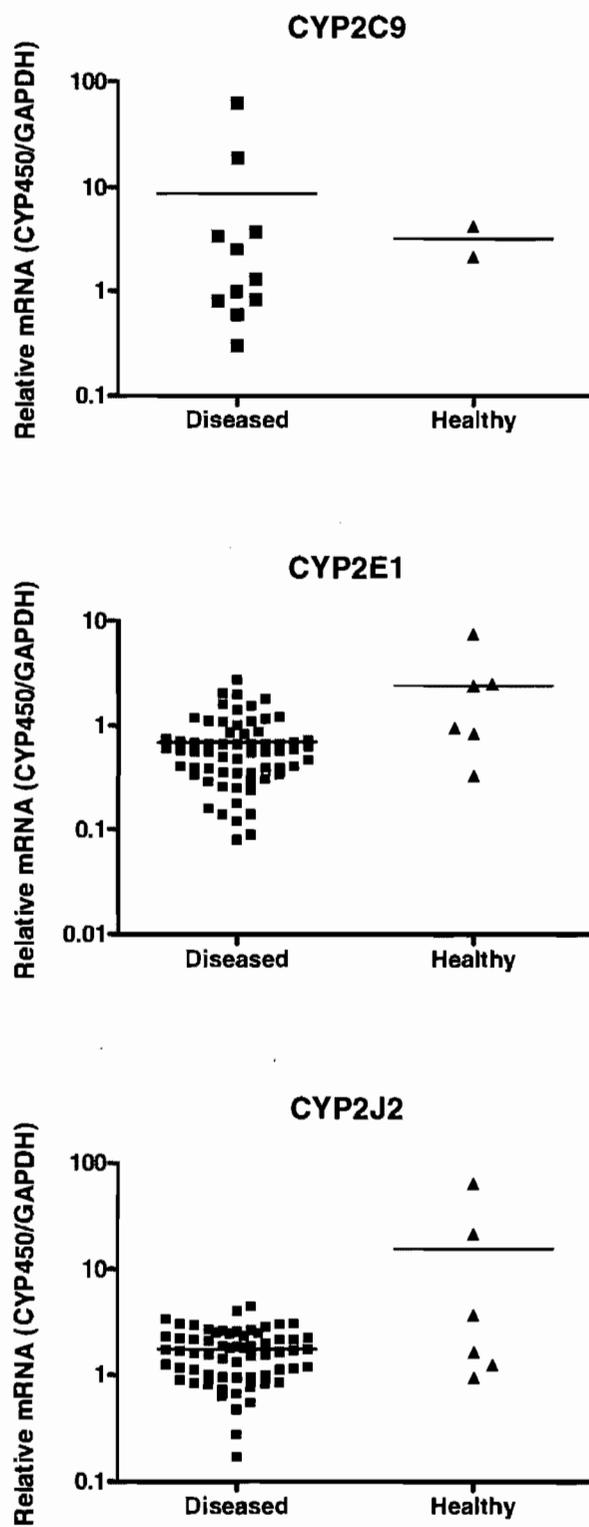


FIGURE 2



(FIGURE 2)



(FIGURE 2)

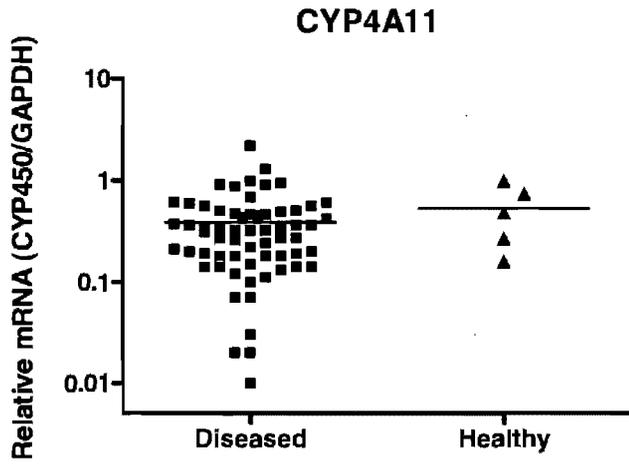
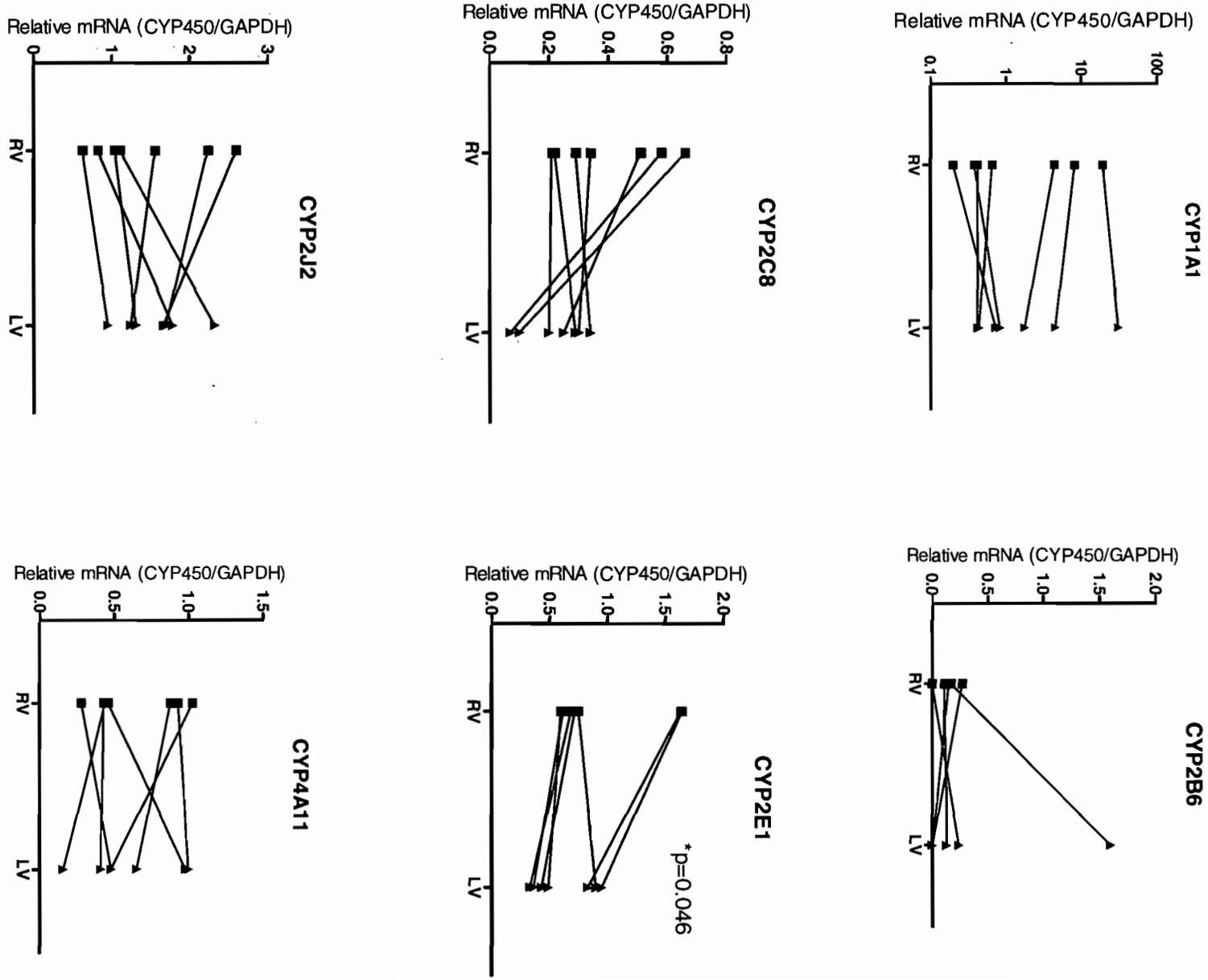


FIGURE 3



*Cet article sera traduit pour soumission et publication future.

**METABOLISM OF DOMPERIDONE AND VERAPAMIL
BY HUMAN HEART MICROSOMAL FRACTIONS**

Veronique Michaud, B.Pharm., M.Sc., Marie-Christine Dumas B.Sc.
and Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.

CRCHUM, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and
Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

CORRESPONDANCE: Jacques Turgeon, B.Pharm., Ph.D.
CRCHUM, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
Hotel-Dieu, Masson Pavilion
3850 St. Urbain street, Room 8-107
Montréal, Québec, Canada, H2W 1T7

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires sont un problème de santé publique majeur et représentent toujours la première cause de mortalité. L'utilisation des médicaments demeure la pierre angulaire du traitement et de la prévention de ces maladies. Une réponse thérapeutique optimale est recherchée afin de réduire les risques d'inefficacité thérapeutique ou de toxicité. Cet objectif est complexe en raison d'une grande variabilité interindividuelle dans la réponse aux agents cardiovasculaires et de la polypharmacie qui caractérise souvent le profil pharmacologique de ces patients.

La superfamille d'enzymes que constituent les cytochromes P450 (CYP450) sont responsables de la biotransformation d'une grande majorité de médicaments. Les CYP450s sont présents en grandes quantités au foie et dans les intestins mais leur présence a aussi été détectée dans plusieurs tissus dont le tissu cardiovasculaire.¹⁻⁵ Parmi les isoenzymes qui ont été détectées dans le tissu cardiaque, on note; CYP1A1, 1B1, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 4A11, 4B1 et CYP11B1/2.^{4, 6-11} Des études récentes suggèrent un rôle fonctionnel des CYP450s retrouvés dans le tissu cardiovasculaire incluant la formation de métabolites dérivés de l'acide arachidonique, la synthèse d'aldostérone et d'hormones comme l'estradiol et la testostérone.^{10, 12-14} Des auteurs proposent donc un rôle des CYP450s tant dans l'homéostasie vasculaire que dans la survenue et le développement de maladies cardiovasculaires.¹⁵⁻¹⁸

Il est bien connu que le foie représente l'organe majeur responsable de la clairance systémique des médicaments. Toutefois, les CYP450s retrouvés dans le cœur pourraient avoir une influence sur la clairance intra-tissulaire des médicaments et ainsi affecter les effets de ces derniers au niveau cardiaque. Bien que la présence de CYP450s ait été démontrée dans le cœur humain, peu d'études ont effectivement caractérisée l'activité enzymatique de ces protéines de ce tissu. Une étude a rapporté que le CYP2J2 localisé dans les petites et grosses coronaires pouvaient générer des métabolites dérivés de l'acide arachidonique.¹⁹ Un autre groupe a montré que le métabolisme de la testostérone était corrélé avec les niveaux d'expression (ARNm) de CYP450s.¹² Une surexpression de CYP2J2 a été associée à une meilleure cardioprotection suite à une ischémie-reperfusion.^{20, 21} Au contraire, des inhibiteurs des CYP450s dont particulièrement le sulfaphénazole (un

inhibiteur de CYP2C9) ont été associé à une réduction de la taille de l'infarctus post-ischémique chez le rats.^{22, 23}

Certains médicaments qui ne sont pas des agents anti-arythmiques classiques entraînent des effets électrophysiologiques cardiaques plus ou moins attendus chez des patients. Les facteurs de risques et les conditions qui prédisposent les patients à ces effets délétères sont, encore de nos jours, que partiellement expliqués. De fait, on sait que certaines conditions (hypokaliémie, pause ou bradycardie, genre féminin, prise de produits allongeant le QT, etc...) augmentent le risque d'effets secondaires majeurs. Cependant, la valeur prédictive de ces facteurs de risque demeure faible pour chacun des patients (faible spécificité). Tel que proposé par Walles *et al.*, des variabilités dans l'activité des CYP450s localisés dans le coeur pourraient expliquer des échecs thérapeutiques au traitement de pathologies cardiaques comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque ou l'apparition de cardiomyopathies observées avec certains médicaments.²⁴⁻²⁶ Ces auteurs ont proposé qu'une inactivation du vérapamil en son métabolite inactif dû au métabolisme local puisse causer une inefficacité de traitement.²⁷ Le vérapamil est un bloquant des canaux calciques largement prescrit dans le traitement de l'angine de poitrine, des maladies coronariennes, d'arythmies cardiaques et de l'hypertension. Le vérapamil est utilisé sous forme de mélange racémique et les énantiomères S- et R-vérapamil présentent des propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques différentes.²⁸⁻³⁰ Son élimination est principalement influencée par l'activité des CYP3As et du CYP2C8.^{31, 32}

Le CYP2J2 est l'isoforme dont l'expression est prédominante dans le tissu cardiovasculaire. Plusieurs antihistaminiques de seconde génération sont des substrats du CYP2J2.^{33, 34} Tel que démontré chez l'animal, les antihistaminiques de seconde génération ont des propriétés cardiotoxiques par leur effet sur le bloc du canal potassique cardiaque.³⁵ En particulier, l'astémizole est un antihistaminique dont la biotransformation est dépendante des CYP3As et du CYP2J2.^{33, 36-38} L'astémizole a été retirée du marché en raison des risques d'arythmies ventriculaires (Torsade de pointes) et de mortalité rapportées suite à son administration.

La dompéridone est un modulateur de la motilité gastrique dont l'utilisation est approuvée au Canada et en Europe. Les études *in vitro* ont montré que la dompéridone est un substrat des CYP3As.^{39, 40} La dompéridone possède des effets

électrophysiologiques cardiaques similaires à ceux de l'astémizole ou du cisapride.⁴¹⁻⁴³ Il a été montré que ces médicaments prolongent significativement la repolarisation cardiaque.²⁶

Nous proposons que les isoenzymes des CYP450s présentes dans le tissu cardiaque peuvent être importantes et impliquées non seulement pour le métabolisme de composés endogènes tel que rapporté précédemment mais aussi, pour le métabolisme de certains médicaments. Conséquemment, des variabilités interindividuelles dans l'activité des CYP450s cardiaques pourraient prédisposer des patients à des interactions médicamenteuses et des effets indésirables cardiaques.

L'objectif de notre étude est 1) la mise au point d'une méthode pour la préparation de microsomes à partir de tissu cardiaque provenant de cobayes (cœur entier) et d'humains (ventricules), 2) de caractériser le métabolisme de la dompéridone et du vérapamil à l'aide d'enzymes recombinantes pour des CYP450s retrouvées dans le tissu cardiaque et 3) de déterminer l'activité métabolique du cœur avec différents substrats des CYP3A4/5, CYP2J2, CYP2C8/9 (substrats utilisés lors des expériences: dompéridone, vérapamil, astémizole et testostérone) par des isoenzymes exprimées dans le tissu cardiaque.

MÉTHODOLOGIE

Le comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de Montréal a fourni son approbation en rapport avec l'utilisation des tissus biologiques (cœurs humains de patients souffrant d'insuffisance cardiaque). Le déroulement de cette étude s'est effectué en respectant les procédures du Réseau d'Échange de Tissus et Échantillons Biologiques du Québec (RETEB).

Le protocole pour utilisation des animaux (cobayes) a été approuvé par le comité de protection des animaux de laboratoire (CIPA) du CHUM.

Préparation des échantillons du cœur humain

Immédiatement après l'explantation, les cœurs étaient immergés dans un tampon de transplantation froid et rapidement reliés à une pompe pour circulation extracorporelle. Les cœurs furent perfusés durant 10 minutes (toujours avec le

tampon de transplantation). Des échantillons de ventricule droit et gauche (de 4-10 g) étaient préparés et congelés immédiatement dans de l'azote liquide. Les échantillons étaient ensuite conservés à -80°C jusqu'au moment de la préparation des microsomes.

Préparation des échantillons de cœur de cobayes

Les cobayes (Hartley, Charles River, St-Constant, Qc, Can) utilisés pour l'étude étaient des mâles adultes dont le poids variait de 600-900g. Les cobayes étaient sacrifiés par dislocation cervicale, puis le cœur était retiré et mis dans le tampon froid pour la préparation de microsomes.

Matériels

La dompéridone a été achetée chez Janssen Pharmaceutica N.V. (Beerse, Belgium). Le vérapamil, le S- et le R-vérapamil, le norvérapamil, la testostérone, la 6- β -hydroxytestostérone, l'astémizole, la norastémizole, les cofacteurs (NADP⁺, D-glucose 6-phosphate et glucose 6-phosphate déhydrogénase), les détergents (TRITON et CHAPS), le sucrose, le PMSF et le DTT ont été obtenus de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'EDTA provenait de JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA) et le Complete EDTA-free (comprimés composés d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases) a été acheté chez Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA). Les enzymes recombinantes (baculovirus-infected insect cells expressing CYP2J2, CYP2C8, CYP2C9, CYP1A2, CYP3A4 et CYP3A5) et le cytochrome b5 ont été achetés chez BD Biosciences Gentest (Woburn, MA, USA). Ces microsomes étaient coexprimés avec le CYP450-réductase humain. Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les CYP2Cs humains et les anticorps de souris monoclonaux dirigés contre le CYP2C8 humain proviennent de chez Daichii Pure Chemicals (Tokyo, Japan) et de BD Biosciences Gentest (Woburn, MA, USA), respectivement. Tous les autres produits et solvants ont été achetés selon le plus haut standard de qualité disponible commercialement.

Analyses HPLC

Le système HPLC (Thermo Separation products, Fremont, CA) était composé d'une pompe SpectraSystem P4000, d'un échantillonneur SpectraSystem AS3000, d'un détecteur à fluorescence SpectraSystem FL3000, d'un détecteur ultraviolet SpectraSystem UV3000 et d'un logiciel d'exploitation System PC1000. La méthode d'analyse pour la séparation et la détection de la dompéridone et de ses métabolites a été réalisée selon la méthode déjà mise au point dans notre laboratoire.⁴⁴

L'analyse du vérapamil et de ses métabolites (particulièrement le norvérapamil) a été effectuée par HPLC à l'aide d'un détecteur ultraviolet (longueur d'ondes à 280 nm) et d'une colonne Nova-Pack Waters C-18 (150 mm x 3,9 mm, 5 μ m, Milford, MA, USA). Brièvement, la phase mobile était composée de tampon sodium-phosphate 20 mM, pH 6,3, d'acétonitrile et de méthanol (62 :35 :3) avec 0,1% de triéthylamine. La limite de détection était de 2,4 ng/mL et 1,7 ng/mL pour le vérapamil et le norvérapamil, respectivement.

L'analyse de testostérone et de ses métabolites dont la 6 β -hydroxytestostérone a été réalisée par HPLC avec une colonne ODS (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m; Beckman Coulter, Fullerton, CA) à l'aide d'un détecteur ultraviolet (longueur d'ondes à 246 nm). La séparation des composés était effectuée à l'aide d'une phase mobile composée d'un mélange 1) eau et méthanol (55 :45) et 2) d'acétonitrile (100%) qui était pompée à 1 mL/min selon le gradient suivant : de 0-10 minutes (95 :5, mélange 1 et 2, respectivement), de 10-40 minutes (80 :20), de 40-45 minutes (isocratique dans une proportion 80 :20) et de 45 à 60 minutes (retour à 95 :5).

Finalement, la méthode analytique pour l'astémizole et ses métabolites (norastémizole et desméthylastémizole) était aussi basée sur une méthode HPLC (détection UV; longueur d'ondes à 283 nm). La séparation était réalisée à l'aide d'une colonne Zorbax C-18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m) et d'une phase mobile contenant du tampon ammonium acétate 20 mM (pH 5,3), d'acétonitrile, de tétrahydrofuran (55 :42 :3) et 0,1% de triéthylamine.

Analyses LCMSMS

L'appareil était constitué d'un HPLC (Shimadzu Prominence, OR, USA) équipé d'un contrôleur CBM-20A Prominence UFLC, d'un dégazeur DGU-20A5 Prominence, d'une pompe LC-20AD UFLC Prominence, d'un auto-échantillonneur SIL-20AHT Prominence UFLC et muni d'un spectromètre de masse TSQ Quantum Ultra HESI (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). La phase mobile était composée d'acétonitrile, de tampon ammonium acétate 10 mM, pH 5.8 et d'eau (55 :45 :10) Une colonne Phenomenex Synergy Fusion RP (75 mm x 3 mm, 4 μ m) a été utilisée pour séparer par chromatographie les différents composés. La spectrométrie de masse consistait en un mode HESI et les masses sur charge (m/z) étaient de 455.2/303.06, pour le vérapamil et de 285.1/193, 441.4/165, 441.4/246.1,

441.4/398, 471.4/165.1 et 471.4/453.2 pour les métabolites. La méthode d'analyse de la dompéridone par LCMS fut effectuée tel que décrit par Simard *et al.*³⁹

Incubations avec des isoenzymes recombinantes

Le milieu d'incubation contenait un système régénérateur NADPH (1.3 mM NADP⁺, 3.3 mM D-glucose 6-phosphate, 0.2 U glucose 6-phosphate déhydrogenase dans une solution de chlorure de magnésium 25 mM; 100 µL), du tampon phosphate 50 mM, pH 7,4 (380 µL), 0.025 nmol d'isoenzymes recombinantes (rCYP2J2, rCYP2C8, rCYP2C9*1 et rCYP1A2 pour le vérapamil et rCYP2J2 pour la dompéridone) et 80 pmol de cytochrome b5 (ratio 2 :1). Des incubations ont aussi été effectuées avec les isoenzymes rCYP3A4 et rCYP3A5 à titre de référence. Ce mélange était pré-incubé pour une période de 10 minutes à 37°C avant l'ajout de 5 µL de substrat (0-300 µM de dompéridone dissout dans du DMSO ou 0-600 µM de S- ou R-vérapamil dissout dans du méthanol). L'incubation était réalisée à l'aide d'un bloc-chauffant avec une légère agitation à 37°C pour une durée de 45 et 60 minutes pour la dompéridone et le vérapamil, respectivement. La réaction était ensuite arrêtée par l'ajout de 500 µL d'acétonitrile froid. Les standards internes étaient ajoutés (3 µg d'encainide pour la dompéridone et 1,5 µg de diazépam pour le vérapamil). Le milieu d'incubation était centrifugé à 12 000 rpm pour 5 minutes. Le surnageant était ensuite injecté dans le système HPLC et les métabolites majeurs étaient détectés et quantifiés.

Incubations avec des microsomes de cœur

Le milieu d'incubation contenait 200 µL de microsomes de cœur, 100 µL de système régénérateur NADPH et 195 µL de tampon phosphate 50 mM, pH 7.4. Ce mélange était pré-incubé pour une période de 10 minutes à 37°C avant l'ajout de 5 µL de substrat (200 µM de dompéridone ou 100 et 400 µM de vérapamil ou 100 µM de testostérone ou 100 µM d'astémizole). L'incubation était réalisée sur une période de 15 minutes à 4 heures à 37°C. La réaction était arrêtée avec de l'acétonitrile froid et les standards internes ajoutés étaient les mêmes que ceux énumérés précédemment. Les milieux d'incubation ont été centrifugés à 2 reprises à 16 000 rpm pendant 20 minutes. Le second surnageant recueilli était injecté dans le système HPLC ou le LCMSMS.

Études d'immuno-inhibition

Les microsomes de cœurs humains étaient pré-incubés en présence d'anticorps polyclonaux anti-CYP2Cs ou monoclonaux anti-CYP2C8 (0, 100 ou 200 µg) sur la

glace pour une période de 20 minutes. Ensuite, les mêmes procédures que celles décrites précédemment pour les incubations en présence de dompéridone ou de vérapamil avec microsomes de cœur ont été effectuées.

Études avec inhibiteurs et contrôle négatif

Des incubations avec des microsomes de cœur en présence d'inhibiteurs de CYP450 ou de FMO ont été effectuées. Les inhibiteurs (SKF 525, métyrapone, N-octylamine et méthimazole à des concentrations de 100 μM , 100 μM , 100 μM et 200 μM , respectivement) étaient préincubés avec les microsomes de cœur humain pendant 10 minutes avec l'ajout des substrats dompéridone 200 μM ou vérapamil 400 μM . Suite à l'ajout du substrat, l'incubation était poursuivie pour une durée de une ou de quatre heures.

Un contrôle négatif a été effectué en incubant la dompéridone (200 μM) ou le vérapamil (400 μM) avec des microsomes de cœur préalablement chauffés à 60°C durant 10 minutes. Également, des incubations ont été réalisées avec des microsomes de cœur fonctionnels en absence du système régénérateur NADPH.

Dosage de protéines

La concentration protéique obtenue dans les fractions microsomales des ventricules gauche et droit ont été déterminée en utilisant la trousse BCA de Pierce.

Analyses

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide d'analyses de régression non-linéaire en utilisant l'équation de Michaelis-Menten. Les cinétiques démontrant un profil atypique ont été décrites selon l'équation appropriée: les courbes sigmoïdes selon l'équation de Hill alors que pour les courbes d'auto-inhibition, l'équation utilisée fut définie comme suit: $v = V_{\max} / (1 + (K_m / S) + (S / K_{si}))$.

RÉSULTATS

Caractérisation in vitro du métabolisme par des isoenzymes CYP450s.

La caractérisation des isoenzymes impliquées dans la formation de métabolites de la dompéridone et du vérapamil a été effectuée avec des isoenzymes recombinantes susceptibles de se retrouver dans le tissu cardiaque. Les valeurs de K_m et de V_{\max} pour les différentes isoenzymes étudiées sont présentées au

Tableau I. Les résultats montrent que la dompéridone est un substrat de l'isoforme rCYP2J2 avec une valeur de clairance intrinsèque de 0,05 mL/min/nmol CYP450 (Tableau IC). L'affinité pour cette isoenzyme est comparable à celle obtenue pour le rCYP3A4, soit 44 ± 12 vs 49 ± 5 μ M. Les incubations effectuées avec le rCYP2J2 et les énantiomères de verapamil n'ont pas mené à la formation de norverapamil (Tableau IA et IB). Toutefois, un autre métabolite identifié M2-verapamil fut formé par le rCYP2J2 avec une très grande affinité : des K_m de 4 ± 2 μ M et 11 ± 6 μ M furent estimés pour le R- et le S-verapamil, respectivement.

Les résultats montrent que le CYP2C8 semble l'isoenzyme la plus importante dans la formation du norverapamil et du métabolite M2-verapamil. Les valeurs de K_m sont relativement similaires pour ces deux métabolites et pour les deux énantiomères de verapamil où elles oscillent entre 20-30 μ M. L'activité catalytique de formation du norverapamil est légèrement supérieure à celle du métabolite M2-verapamil (V_{max} ; $\sim 11 \pm 1$ vs 8 ± 1 nmol/mL/nmolP450/min, respectivement). Les paramètres cinétiques pour le R-norverapamil obtenus avec le rCYP2C8 sont comparables à ceux mesurés avec les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 alors que pour le S-verapamil, la valeur de la clairance intrinsèque est 1,8 fois supérieure pour le rCYP2C8 comparativement aux rCYP3As. Le CYP2C9 a présenté une activité faible pour la formation des deux métabolites de verapamil détectés avec une clairance intrinsèque < 0.03 mL/nmol P450/min. Aucun métabolite n'a été détecté en présence de l'isoenzyme CYP1A2. Fait intéressant, l'énantiomère R-verapamil n'est pas biotransformé en M2-verapamil par les CYP3As, alors que seul le CYP3A5 est capable de former du M2-verapamil en présence de l'énantiomère S-verapamil.

Préparation de microsomes de cœur de cobaye et humain

Différentes techniques ont été étudiées pour la préparation de microsomes de cœurs humains et de cobayes. Le principe de préparation était basé sur des méthodes d'ultracentrifugations différentielles afin d'obtenir les fractions microsomales. Divers essais bien que la liste ne soit pas exhaustive sont énumérés à la Table II. Aucun résultat positif quant à la présence ou l'activité de CYP450 dans le cœur a été observé avec le cobaye. Dû au manque de données quant à l'expression de CYP450s dans le cœur de cobaye, à l'absence d'anticorps disponibles pour confirmer la présence des CYP450 dans ce tissu et à l'incertitude quant à la localisation précise des CYP450s dans le cardiomyocytes, les expériences subséquentes n'ont été réalisées qu'à partir de cœurs humains.

Un échantillon de 4 à 10 g de tissu provenant du ventricule gauche ou droit était ajouté à une solution composée de tampon phosphate 100 mM, pH7,4, chlorure de potassium 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM et PMSF 0,01 mM dans une proportion 1 :3. Le cœur était homogénéisé dans ce mélange froid à l'aide d'un Polytron. L'homogénat était ensuite mis sous sonication (~57% d'amplitude) à 3 reprises pendant 5 secondes chaque fois. La fraction microsomale était isolée suite à une centrifugation de 10 000g durant 20 minutes. Le surnageant obtenu était recentrifugé à une vitesse de 100 000g pour une période de 90 minutes. Cette étape a été répétée une seconde fois. Toutes les manipulations ont été effectuées à 4°C. Le culot final était resuspendu dans une solution contenant du tampon phosphate 100 mM, pH 7.4, de chlorure de potassium 150 mM et de l'EDTA 1 mM. Les incubations ont été réalisées avec des microsomes fraîchement préparés. Puis les microsomes étaient congelés instantanément dans de l'azote liquide et conservés à -80°C pour les études d'immuno-inhibition.

Études de métabolisme avec des microsomes de cœurs en présence de vérapamil ou de dompéridone

La formation de métabolites de vérapamil a été observée dans douze cœurs humains provenant des ventricules gauche et droit. Nous avons observé la formation de quatre à six métabolites dans les échantillons incubés avec vérapamil et un seul métabolite était détectable dans les incubations réalisées en présence de dompéridone. La formation des métabolites de vérapamil augmentait avec l'augmentation des concentrations de vérapamil (100 μ M vs 400 μ M). Les chromatogrammes illustrant la formation des métabolites et leurs contrôles respectifs sont présentés à la figure 1. L'activité catalytique observée avec le ventricule gauche était comparable à celle obtenue avec le ventricule droit pour les mêmes sujets (Figure 2 et 3). Toutefois, l'activité des CYP450s représentée par la quantité de métabolites détectés était variable entre les sujets (Figure 4).

La quantité de métabolites formés augmentait aussi en fonction du temps et ceci sans plafonnement d'activité jusqu'à une durée de 4 heures d'incubation. À quinze minutes, des métabolites de vérapamil étaient déjà quantifiables alors qu'il a fallu 30 minutes pour détecter le métabolite de dompéridone (Figure 5).

Il faut noter que la qualité de la chromatographie en présence d'incubations réalisées avec des microsomes de cœur est moindre puisqu'un grand volume

d'injection était nécessaire (30-60 μ L comparativement à 10-15 μ L avec les enzymes recombinantes).

Les analyses préliminaires réalisées à l'aide d'un LCMSMS ont permis de déterminer qu'un l'un des métabolites du vérapamil formés est un métabolite désalkylé et qu'un autre serait formé par une hydroxylation. Un seul métabolite de la dompéridone fut détectable par analyse HPLC suite aux incubations réalisées avec des microsomes de cœur. Ceci a été confirmé par une analyse préliminaire avec LCMSMS (Figure 7).

L'activité métabolique a été évaluée à partir de différentes fractions obtenues au cours de la préparation de microsomes. La figure 6 présente la formation de métabolites de vérapamil en présence d'homogénat, du surnageant suite à la première centrifugation (10 000g) et finalement en présence de microsomes obtenus après l'ultracentrifugation (100 000g).

Études d'immuno-inhibition

Les microsomes de deux échantillons pour lesquels une activité métabolique fut observée ont été utilisés afin d'évaluer la contribution possible des isoenzymes de la famille CYP2C au métabolisme du vérapamil. Les résultats montrent une baisse majeure de la formation des métabolites du vérapamil en présence des anticorps. L'inhibition par les anticorps CYP2C8 est présentée à la figure 8B.

Études en présence d'inhibiteurs et contrôle négatif

Une diminution importante de la formation des métabolites du vérapamil et de la dompéridone a été observée en présence des inhibiteurs SKF 525, métyrapone et N-octylamine (Figure 8A). Aucune inhibition significative ne fut observée avec le méthimazole en présence de la dompéridone et du vérapamil. Peu de métabolites ont été formés en présence de microsomes chauffés et ceci avec les deux substrats évalués (dompéridone et vérapamil). L'absence du système régénérateur NADPH entraîne une absence de formation importante voire nulle des métabolites de vérapamil et de dompéridone.

Autres substrats

Les résultats obtenus avec l'astémizole et la testostérone furent non concluants. Aucun métabolite de l'astémizole ou de la testostérone n'a été détecté avec les techniques d'analyses HPLC utilisées.

DISCUSSION

Nous avons mis au point une méthode pour la préparation de microsomes de cœur humain. Nos résultats ont montré que le métabolisme intracardiaque du vérapamil est médié principalement par l'isoenzyme CYP2C8. La contribution majeure du CYP2C8 dans la formation des métabolites de vérapamil a été confirmée par les études d'immuno-inhibition avec des anticorps dirigés contre les CYP2Cs et le CYP2C8 humain. Nous avons de plus démontré avec l'isoforme CYP3A5 une énantiométrie importante dans la formation du métabolite désalkylé M2 du vérapamil. Borlak et son groupe avaient aussi observé la formation d'un métabolite désalkylé par des microsomes de cœur humain. De plus, nous avons pu mettre en évidence la formation de métabolites de dompéridone. Notre étude a montré pour la première fois l'implication directe des CYP450s cardiaques dans le métabolisme de médicaments.

Les isoenzymes de la famille CYP3A ne semblent pas exprimées dans le tissu cardiaque. Notre étude sur le métabolisme *in vitro* montre par ailleurs que l'isoenzyme majeure impliquée dans la biotransformation cardiaque du vérapamil en norvérapamil serait le CYP2C8. Par ailleurs, les CYP2C8 et CYP2J2 pourraient être impliquées dans la formation du métabolite M2-vérapamil. Ces observations sont en accord avec l'inhibition sélective de la formation de ces métabolites par des anticorps anti-CYP2Cs et anti-CYP2C8. L'activité dans ces microsomes de cœur a été confirmée par la formation d'un métabolite de la dompéridone. Les mêmes expériences répétées avec la dompéridone ont montré que les anticorps anti-CYP2C et CYP2C8 n'ont causé aucune inhibition dans la formation de métabolite ce qui est en accord avec les données préalables de notre laboratoire.^{33, 41} Effectivement, la dompéridone serait un substrat spécifique pour les CYP3As et pour CYP2J2 tel qu'observé dans cette étude. Ces données suggèrent que le CYP2J2 serait probablement l'enzyme responsable du métabolisme de la dompéridone observé dans douze échantillons de microsomes de cœurs humains.

La technique pour la préparation de microsomes de cœur a fonctionné de façon reproductible dans douze échantillons. Ceci pourrait être expliqué par la qualité parfois moindre des échantillons de tissu avec les premières techniques de préparation testées ou par la technique en soit. Le groupe de Borlak et Thum a rapporté que le ventricule droit présentait davantage de CYP450s en terme de quantité et d'activité, en utilisant le vérapamil comme substrat, comparativement au

ventricule gauche.^{6, 27} Cependant, l'étude de Delozier *et al.* a montré la présence d'ARNm dans des échantillons de cœur provenant du ventricule gauche mais ils n'ont toutefois pas évalué l'activité.⁷ Une autre étude encore du groupe de Borlak *et al.* a rapporté que le métabolisme de la testostérone était corrélé avec les niveaux d'expression des CYP450s en utilisant cette fois-ci, le ventricule gauche.¹² Il faut noter cependant que notre technique a également été évaluée avec des échantillons de ventricule droit. Les résultats obtenus avec le ventricule droit sont similaires à ceux du ventricule gauche pour un même individu. Également, le choix du ventricule gauche par rapport au droit semble adéquat puisque nous avons démontré antérieurement que les niveaux d'expression sont similaires entre les deux ventricules chez un même sujet.⁴⁶ Notre laboratoire et d'autres groupes de recherche ont rapporté que les niveaux d'expression et la présence d'isoenzymes sont toutefois variables entre les individus.⁴⁶ Ceci est en accord avec le profil métabolique qui diffère entre les échantillons provenant de différents patients.

Différents substrats ont été évalués au cours de notre étude afin de couvrir un éventail de substrats possédant des voies métaboliques préférentielles pouvant différer. De plus, le choix était basé dans une optique logique d'une possibilité de métabolisme intracardiaque en choisissant un médicament dont l'action pharmacologique principale est au niveau cardiovasculaire (vérapamil) et des médicaments qui ont été associés à des effets indésirables cardiaques importants (dompéridone et astémizole) et un substrat endogène (testostérone). Les résultats avec la testostérone et l'astémizole ont été décevants. Ceci est probablement causé par le manque de sensibilité pour la détection des métabolites de l'astémizole et de la testostérone.

Au début du projet, le cobaye a été choisi comme espèce animale car le cobaye est un bon modèle pour évaluer la prolongation de l'intervalle QT par des médicaments qui bloquent le canal potassique cardiaque puisque le cobaye présente des canaux de type IKr dans leurs cardiomyocytes.^{35, 41, 42} De nombreux médicaments (terfénadine, l'astémizole, la dompéridone) qui prolongent l'intervalle QT chez le cobaye sont aussi, pour la plupart, des substrats des CYP450s. D'ailleurs, plusieurs de ces médicaments non-antiarythmiques prolongant l'intervalle QT (par exemple, l'astémizole, la terfénadine, l'ébastine et le cisapride) sont également des substrats de CYP2J2, l'isoenzyme principalement retrouvée dans le tissu cardiovasculaire.^{35, 36, 47} Les cœurs de cobaye ont été utilisés afin de tester de nombreux essais de préparation de microsomes de cœur. Le manque de connaissances quant aux

CYP450s de cobayes et le peu de données existantes relativement aux CYP450s cardiaques de même que les résultats peu probants obtenus nous ont amené à abandonner les expériences avec cette espèce animale.

En conclusion, nous avons développé une technique pour la préparation de microsomes à partir du tissu cardiaque. Nos résultats ont montré que les microsomes cardiaques sont doués d'activité métabolique tel qu'observé avec le vérapamil et la dompéridone. Les études réalisées avec les anticorps ont montré pour la première fois que le CYP2C8 présent dans le cœur peut influencer le métabolisme intracardiaque du vérapamil. Nos résultats soulèvent également la difficulté à obtenir des microsomes cardiaques fonctionnelles. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer précisément la localisation des CYP450s dans les myocytes cardiaques afin d'améliorer la technique de préparation de microsomes. De plus, des analyses doivent être réalisées avec un plus grand nombre d'échantillons de cœur. Finalement, le métabolisme devrait être analysé auprès de cœur provenant de sujet en bonne santé puisque les patients avec des maladies cardiovasculaires prennent plusieurs médicaments ce qui pourrait influencer et moduler l'activité et l'expression de certains CYP450s.

RÉFÉRENCES

1. Abraham NG, Pinto A, Levere RD, et al. Identification of heme oxygenase and cytochrome P-450 in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 1987;19(1):73-81.
2. Guengerich FP, Mason PS. Immunological comparison of hepatic and extrahepatic cytochromes P-450. *Mol Pharmacol.* Jan 1979;15(1):154-164.
3. Wu S, Chen W, Murphy E, et al. Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem.* May 9 1997;272(19):12551-12559.
4. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, et al. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem.* Feb 16 1996;271(7):3460-3468.
5. Stegeman JJ, Woodin BR, Klotz AV, et al. Cytochrome P-450 and monooxygenase activity in cardiac microsomes from the fish *Stenotomus chrysops*. *Mol Pharmacol.* Mar 1982;21(2):517-526.
6. Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet.* Mar 18 2000;355(9208):979-983.
7. Delozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, et al. Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug Metab Dispos.* Apr 2007;35(4):682-688.
8. Sidorik L, Kyyamova R, Bobyk V, et al. Molecular chaperone, HSP60, and cytochrome P450 2E1 co-expression in dilated cardiomyopathy. *Cell Biol Int.* Jan 2005;29(1):51-55.
9. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond).* Apr 2002;102(4):381-386.
10. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, et al. Cytochromes 1A1/1B1- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites mediate estradiol-induced antimitogenesis in human cardiac fibroblast. *J Clin Endocrinol Metab.* Jan 2005;90(1):247-255.
11. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, et al. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem.* Apr 2004;52(4):447-454.
12. Thum T, Borlak J. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *Faseb J.* Oct 2002;16(12):1537-1549.
13. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* Dec 2004;25(6):947-970.
14. Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* Jun 2002;13(3):273-283.
15. Hunter AL, Cruz RP, Cheyne BM, et al. Cytochrome p450 enzymes and cardiovascular disease. *Can J Physiol Pharmacol.* Dec 2004;82(12):1053-1060.
16. Zordoky BN, El-Kadi AO. Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure. *Curr Drug Metab.* Feb 2008;9(2):122-128.
17. Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res.* Oct 26 2001;89(9):753-762.

18. Elbekai RH, El-Kadi AO. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther.* Nov 2006;112(2):564-587.
19. Zhang Y, Oltman CL, Lu T, et al. EET homologs potently dilate coronary microvessels and activate BK(Ca) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jun 2001;280(6):H2430-2440.
20. Yang B, Graham L, Dikalov S, et al. Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *Mol Pharmacol.* Aug 2001;60(2):310-320.
21. Seubert J, Yang B, Bradbury JA, et al. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway. *Circ Res.* Sep 3 2004;95(5):506-514.
22. Hunter AL, Bai N, Laher I, et al. Cytochrome p450 2C inhibition reduces post-ischemic vascular dysfunction. *Vascul Pharmacol.* Oct 2005;43(4):213-219.
23. Granville DJ, Tashakkor B, Takeuchi C, et al. Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 3 2004;101(5):1321-1326.
24. Reilly JG, Ayis SA, Ferrier IN, et al. QTc-interval abnormalities and psychotropic drug therapy in psychiatric patients. *Lancet.* Mar 25 2000;355(9209):1048-1052.
25. Kilian JG, Kerr K, Lawrence C, et al. Myocarditis and cardiomyopathy associated with clozapine. *Lancet.* Nov 27 1999;354(9193):1841-1845.
26. Tran HT. Torsades de pointes induced by nonantiarrhythmic drugs. *Conn Med.* May 1994;58(5):291-295.
27. Walles M, Thum T, Levsen K, et al. Verapamil: new insight into the molecular mechanism of drug oxidation in the human heart. *J Chromatogr A.* Sep 13 2002;970(1-2):117-130.
28. Busse D, Templin S, Mikus G, et al. Cardiovascular effects of (R)- and (S)-verapamil and racemic verapamil in humans: a placebo-controlled study. *Eur J Clin Pharmacol.* Aug 2006;62(8):613-619.
29. Wang YH, Jones DR, Hall SD. Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil. *Drug Metab Dispos.* May 2005;33(5):664-671.
30. He L, Wang S. Pharmacokinetic behavior and tissue distribution of verapamil and its enantiomers in rats by HPLC. *Arch Pharm Res.* Sep 2003;26(9):763-767.
31. Busse D, Cosme J, Beaune P, et al. Cytochromes of the P450 2C subfamily are the major enzymes involved in the O-demethylation of verapamil in humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Dec 1995;353(1):116-121.
32. Kroemer HK, Gautier JC, Beaune P, et al. Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Sep 1993;348(3):332-337.
33. Matsumoto S, Hirama T, Kim HJ, et al. In vitro inhibition of human small intestinal and liver microsomal astemizole O-demethylation: different contribution of CYP2J2 in the small intestine and liver. *Xenobiotica.* Jun 2003;33(6):615-623.

34. Hashizume T, Imaoka S, Mise M, et al. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. Jan 2002;300(1):298-304.
35. Hey JA, del Prado M, Kreutner W, et al. Cardiotoxic and drug interaction profile of the second generation antihistamines ebastine and terfenadine in an experimental animal model of torsade de pointes. *Arzneimittelforschung*. Feb 1996;46(2):159-163.
36. Matsumoto S, Hirama T, Matsubara T, et al. Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug Metab Dispos*. Nov 2002;30(11):1240-1245.
37. Matsumoto S, Yamazoe Y. Involvement of multiple human cytochromes P450 in the liver microsomal metabolism of astemizole and a comparison with terfenadine. *Br J Clin Pharmacol*. Feb 2001;51(2):133-142.
38. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet*. Jan 2000;38(1):41-57.
39. Simard C, Michaud V, Gibbs B, et al. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of domperidone. *Xenobiotica*. Nov-Dec 2004;34(11-12):1013-1023.
40. Ward BA, Morocho A, Kandil A, et al. Characterization of human cytochrome P450 enzymes catalyzing domperidone N-dealkylation and hydroxylation in vitro. *Br J Clin Pharmacol*. Sep 2004;58(3):277-287.
41. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, et al. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation*. Oct 17 2000;102(16):1883-1885.
42. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, et al. Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation*. Jan 20 1998;97(2):204-210.
43. Tsai WC, Tsai LM, Chen JH. Combined use of astemizole and ketoconazole resulting in torsade de pointes. *J Formos Med Assoc*. Feb 1997;96(2):144-146.
44. Michaud V, Simard C, Turgeon J. An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to in vitro drug metabolism studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Jun 1 2007;852(1-2):611-616.
45. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. I. Evidence For Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem*. Jul 1964;239:2370-2378.
46. Michaud V, Frappier M, Bélanger F, et al. Determination of cardiac mRNA levels of CYP450s involved in the metabolism of drugs from a large cohort of patients with end-stage heart failure and healthy subjects. *FASEB Journal*. 2008;Submitted.
47. Kyrmizakis DE, Chimona TS, Kanoupakis EM, et al. QT prolongation and torsades de pointes associated with concurrent use of cisapride and erythromycin. *Am J Otolaryngol*. Sep-Oct 2002;23(5):303-307.

LÉGENDE DES FIGURES

FIGURE 1: Exemples de formation de métabolites de vérapamil et de dompéridone en présence de microsomes préparés à partir de tissus cardiaques humains. La quantité de métabolites formés diffère entre les sujets. A) vérapamil, B) dompéridone et C) microsomes préparés avec ou sans sonication et incubés avec vérapamil. Le processus de sonication semble améliorer le recouvrement pour la préparation de microsomes de cœur.

FIGURE 2 :Évaluation du métabolisme du vérapamil à partir de fractions microsomales provenant de ventricules gauche et droit. Les incubations contrôles sont aussi illustrées.

FIGURE 3 : Illustration du métabolisme de la dompéridone chez différents individus en présence de dompéridone 200 μM A) microsomes de ventricule gauche et B) microsomes de ventricule droit.

FIGURE 4 : Illustration de différences observées dans le métabolisme du vérapamil en présence de fractions microsomales cardiaques de ventricules gauche et droit.

FIGURE 5 : Évaluation du temps dans la formation des métabolites du vérapamil.

FIGURE 6 : Évaluation du métabolisme du vérapamil à partir de différentes fractions microsomales : des incubations ont été réalisées avec du vérapamil 400 μM en présence 1) d'homogénat obtenu suite à l'homogénéisation du tissu dans le tampon, 2) du surnageant obtenu après la centrifugation à 10 000g et 3) du culot obtenu après l'ultracentrifugation à 100 000g. Deux expériences provenant de deux sujets différents sont présentées.

FIGURE 7 : Analyse par LCMS de la dompéridone et de ses métabolites suite à une incubation avec des microsomes de cœur humain.

FIGURE 8 :Études d'inhibition avec les microsomes cardiaques. Incubations réalisées avec le vérapamil A) en présence d'inhibiteurs puissants des CYP450s et des FMO et B) avec des anticorps monoclonaux dirigés

contre le CYP2C8. Une diminution pratiquement complète dans le métabolisme du vérapamil est observée suivant l'ajout des anticorps anti-CYP2C8.

TABLE IA : Paramètres cinétiques *in vitro* pour le S-vérapamil

Isoenzymes	Norvérapamil			M2-vérapamil		
	Km (μM)	Vmax (nmol/mL/nmolP450/min)	Clint (mL/nmolP450/min)	Km (μM)	Vmax (nmol/mL/nmolP450/min)	Clint (mL/nmolP450/min)
CYP1A2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CYP2C8	21 \pm 7	11.8 \pm 0.8	0.56	25 \pm 8	7.5 \pm 0.6	0.3
CYP2C9*1	92 \pm 30	0.9 \pm 0.1	0.01	124 \pm 31	1.0 \pm 0.1	0.01
CYP2J2	ND	ND	ND	11 \pm 6	1.2 \pm 0.1	0.11
CYP3A4	72 \pm 23	23 \pm 2	0.32	ND	ND	ND
CYP3A5	14 \pm 2	4.5 \pm 0.1	0.32	61 \pm 11	0.86 \pm 0.03	0.01

TABLE IB : Paramètres cinétiques *in vitro* pour le R-vérapamil

Isoenzymes	Norvérapamil			M2-vérapamil		
	Km (μM)	Vmax (nmol/mL/nmolP450/min)	Clint (mL/nmolP450/min)	Km (μM)	Vmax (nmol/mL/nmolP450/min)	Clint (mL/nmolP450/min)
CYP1A2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CYP2C8	29 \pm 9	11.1 \pm 0.8	0.38	25 \pm 8	7.5 \pm 0.6	0.3
CYP2C9*1	145 \pm 55	1.4 \pm 0.2	0.01	59 \pm 13	1.6 \pm 0.1	0.03
CYP2J2	ND	ND	ND	4.4 \pm 2	0.62 \pm 0.04	0.14
CYP3A4	82 \pm 15	30 \pm 2	0.37	ND	ND	ND
CYP3A5	19 \pm 3	8.8 \pm 0.3	0.46	ND	ND	ND

TABLE IC : Paramètres cinétiques *in vitro* pour la dompéridone

Isoenzymes	M3-dompéridone		
	Km (μM)	Vmax (nmol/mL/nmolP450/min)	Clint (mL/nmolP450/min)
CYP2J2	44 \pm 12	2.1 \pm 0.2	0.05
CYP3A4	49 \pm 5 (n=1.3)	41.9 \pm 1.5	0.86
CYP3A5	94 \pm 11	14.9 \pm 0.6	0.16

TABLE II : Technique de préparation de microsomes à partir de tissu cardiaque humain.

Cœurs	Solutions	Étapes & Fractions	Notes	Résultats <i>N=négatif</i> <i>P=positif</i>
C	Tampon TRIS 250 mM, KCL 154 mM et EDTA 1 mM	Culot (2x) 100 000g	Substrat: Dompéridone	N
C	Tampon TRIS 125 mM (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 1mM et sucrose 0,025M	Culot (2x) 100 000g	Substrat : Dompéridone	N
C	Tampon TRIS 125 mM (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 1mM, sucrose 0,025M et DTT 1 mM	Culot (2x) 100 000g	Substrat : Dompéridone	N
C	Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 0.3 mM et sucrose 0,3M	Culot (2x) 100 000g	Substrat : Dompéridone	?
	Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 0.3 mM	Culot (2x) 100 000g	Substrat : Dompéridone Interférence avec sucrose ?	N
C	Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 1 mM et CHAPS 2 mM	Culot (2x) 100 000g	Scan CYP450	N (CYP420)
C	Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 1 mM et CHAPS 2mM, sucrose 25 mM et glycérol 10%	Culot 100 000g (x1hr)	Scan CYP450 à partir des différentes fractions.	N (CYP420)
C	Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 2 mM et CHAPS 2 mM	Culot 100 000g (x1hr)	Scan CYP450	N (CYP420)

C	Tampon TRIS (pH 7,4), KCL 154 mM, EDTA 1 mM et 0,5% TRITON 100x	Culot 100 000g (x1hr)	Scan CYP450	N (CYP420)
C	Tampon TRIS (pH 7,4), KCL, EDTA 2 mM et sucrose	Culot 100 000g (x1hr)	Scan CYP450 à partir des différentes fractions Substrat : Dompéridone	N (CYP420)
C	Tampon TRIS 125 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 5 mM, sucrose 25 mM, glycérol et 1% de sodium cholate	Culot (2x) 100 000g	Scan CYP450 à partir des différentes fractions Substrat : Dompéridone	N (CYP420)
C	Tampon TRIS 50 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, Complete®	Culot (2x) 100 000g	Substrat : Dompéridone	N
C	Tampon TRIS, KCL 150 mM, Complete® et glycérol 20%	Culot (2x) 100 000g	Substrat : Dompéridone	N
C	Tampon TRIS 50 mM, KCL 150 mM, Complete® et glycérol 40%	Culot (2x) 100 000g	Substrat : Dompéridone	N
C	Tampon TRIS 50 mM, KCL 150 mM, Complete® et sucrose 25 mM	Culot 100 000g (x1.5hr)	Substrat : Dompéridone Incubations avec tampon PO4 pH7.4 et pH8.0	N
C	Tampon TRIS 50 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, Complete® et PMSF 0,01 mM	Culot 100 000g (x1.5hr)	Substrat : Dompéridone	N

C	Tampon TRIS, KCL, glucose 25 mM et Complete®	Culot 100 000g (x1.5hr)	Substrat : Dompéridone	N
H	Tampon TRIS 125 mM (pH 7,4), KCl 154 mM, EDTA 1 mM, sucrose 25 mM	Culot (2x) 100 000g	Substrats: Astemizole et Vérapamil Temps d'incubation : 2h et 4h	N
H	Tampon TRIS 50 mM, KCL 150 mM, EDTA, Complete (EDTA free)	Culot (1x) 100 000g	Substrats: Astemizole et Vérapamil Incubations: avec toutes les fractions	N
H	Tampon PO ₄ 100mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM	Sonication (4x5sec) Culot (1x) 100 000g	Substrat: Vérapamil	N
H	Tampon PO ₄ 100 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM	Sans sonication Culot (1x) 100 000g	Substrat: Vérapamil	N
H	Tampon PO ₄ 20 mM (pH 7,0), glycérol 20%, EDTA 1 mM, DTT 0,5 mM	Culot (1x) 100 000g	Substrat: Vérapamil	N
H	Tampon PO ₄ 100 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM	Sonication (4x5sec) Culot (2x) 100 000g	Reconstitution sans PMSF et DTT	P
H (n=3)	Tampon PO ₄ 100 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM	Sonication (3x10sec) Culot (2x) 100 000g	Reconstitution sans PMSF et DTT	P
H	Tampon PO ₄ 100 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM, glycérol 10%	Sonication (3x10sec) Culot (2x) 100 000g	Substrats : Vérapamil et dompéridone	N
H	Tampon PO ₄ 100 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM,	Sonication (3x10sec) Culot (2x) 100 000g	Substrats : Vérapamil et dompéridone	N

H Tampon PO₄ 100 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM, glycérol 15% Culot (1x) 100 000g Reconstitution sans PMSF et DTT
Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone N

H	Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA, sucrose, PMSF 0,01 mM, DTT 0,5 mM et glycérol 15%	Culot 100 000g (x3hrs)	Reconstitution sans PMSF et DTT Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone	N
---	--	------------------------	---	---

H Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 5mM, sucrose, DTT 0,5 mM et glycérol 15% Culot 100 000g (x3hrs) Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone N

H	Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 5mM, sucrose 250 mM, DTT 0,5 mM et glycérol 15%	Culot 100 000g (x3hrs)	Reconstitution sans PMSF, DTT et glycérol Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone	N
---	---	------------------------	---	---

H Tampon TRIS 250 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 3mM, sucrose 25 mM, PMSF 0,01mM, DTT 0,5 mM et glycérol 15% Culot 100 000g (x3hrs) Reconstitution sans PMSF, DTT et glycérol
Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone N

H	Tampon PO ₄ 100 mM (pH7,4), KCL 150 mM, EDTA 3 mM, PMSF 0,01 mM (nouveau lot), DTT 0,5 mM, glycérol 10%	Culot 100 000g (x3hrs)	Reconstitution sans PMSF et DTT Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone	N
---	--	------------------------	---	---

N

H Tampon TRIS 25 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 3mM, sucrose 250 mM, PMSF 0,01mM, DTT 0,5 mM et glycérol 15% Culot 100 000g (x3hrs) Reconstitution sans PMSF, DTT et glycérol
Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone

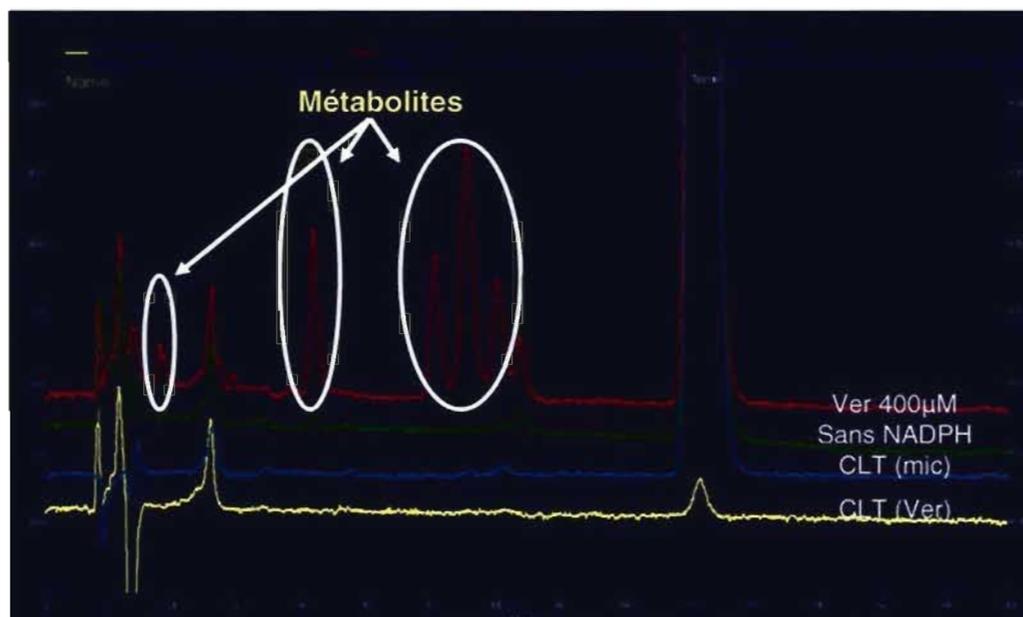
H (n=2: VG-VD)	Tampon TRIS 25 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 3mM, sucrose 250 mM, PMSF 0,5 mM et glycérol 15%	Culot 100 000g (x3hrs)	Reconstitution sans PMSF et glycérol Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone Incubation avec les différentes fractions	N
H	Tampon TRIS 25 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 3mM, sucrose 250 mM, PMSF 0,5 mM et glycérol 15%	Sonication (3x10sec) Culot 100 000g (x3hrs)	Reconstitution sans PMSF et glycérol Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone	N
H (VD)	Tampon PO ₄ 10 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 2 mM, PMSF 0,5 mM et glycérol 15%	Sonication (3x10sec) Culot 100 000g (x3hrs)	Reconstitution sans PMSF Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone Incubations : culot et surnagent 100 000g	N

H	KCL 154 mM	Sonication (3x10sec) Culot 100 000g (x3hrs)	Reconstitution avec : tampon TRIS 200 mM (pH 7,4), KCL 150 mM, EDTA 1 mM et sucrose 25 mM Substrats : Vérapamil, dompéridone et testostérone Incubations : culot et surnagent 100 000g	N
---	------------	--	--	---

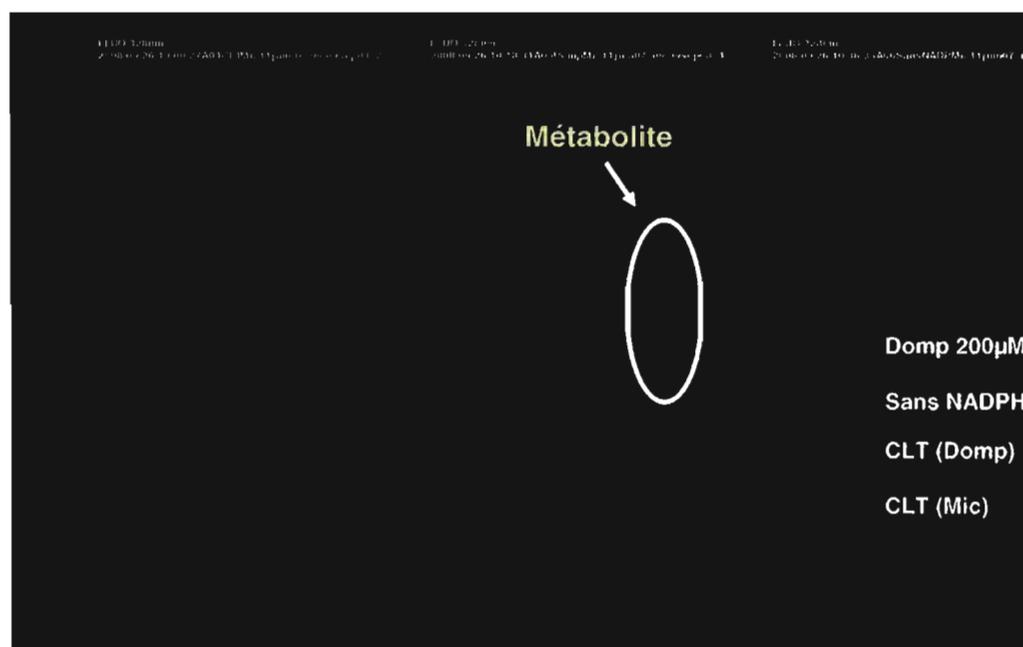
C : cobaye, H : humain, N : négatif, P : positif, VG : ventricule gauche et VD : ventricule droit.

FIGURE 1

A) Vérapamil



B) Dompéridone



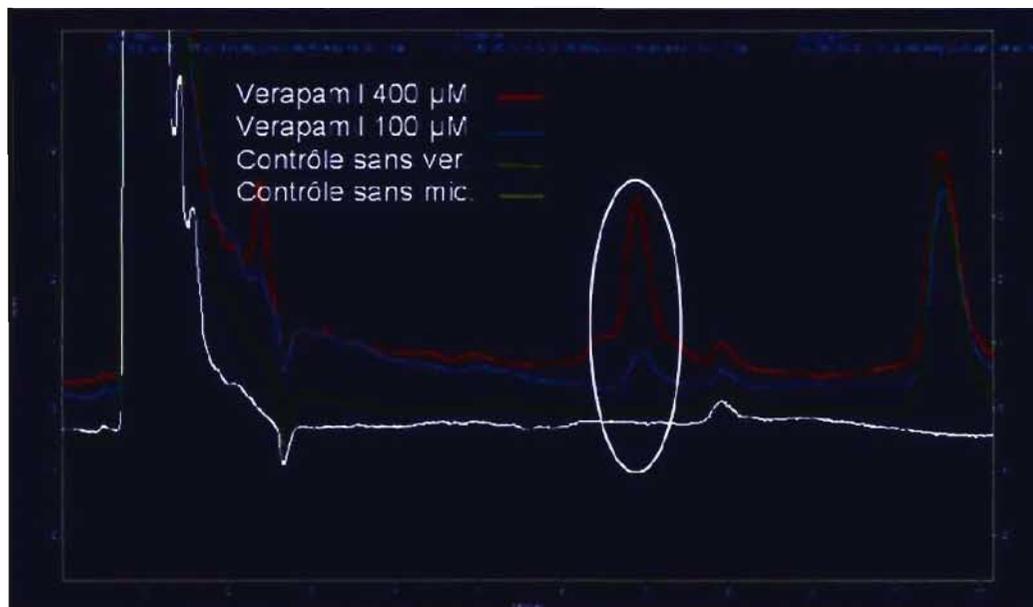
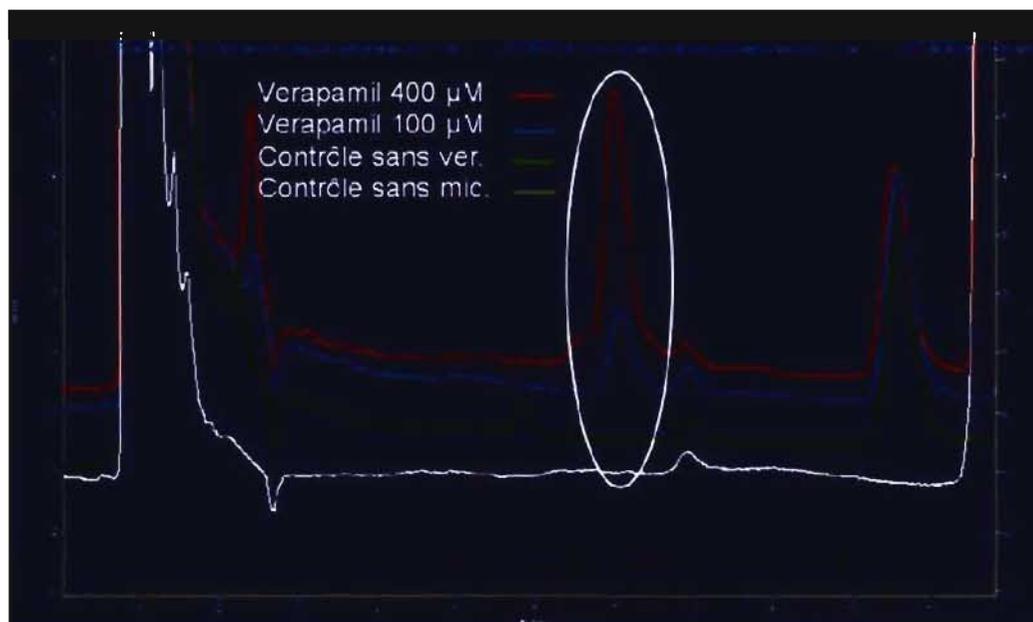
C) Sans sonication**Avec sonication**

FIGURE 2
Vérapamil

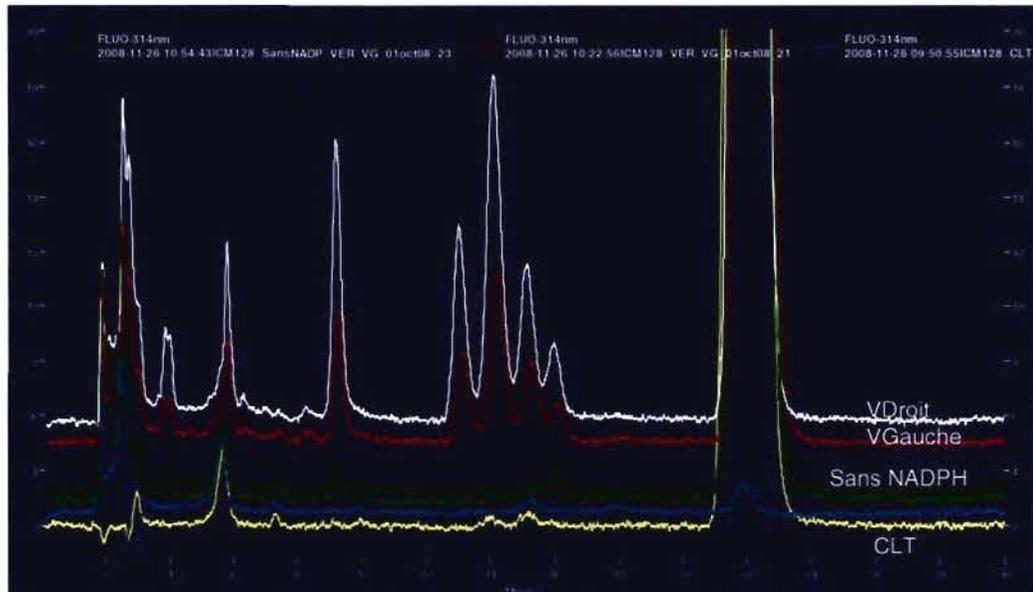
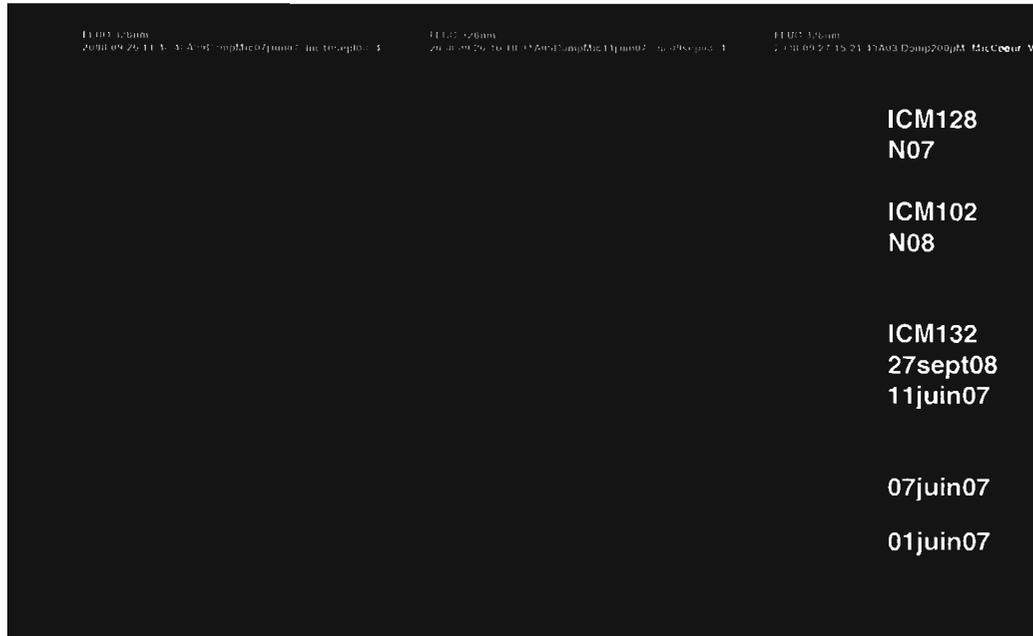


FIGURE 3

A) Ventricule Gauche



B) Ventricule Droit

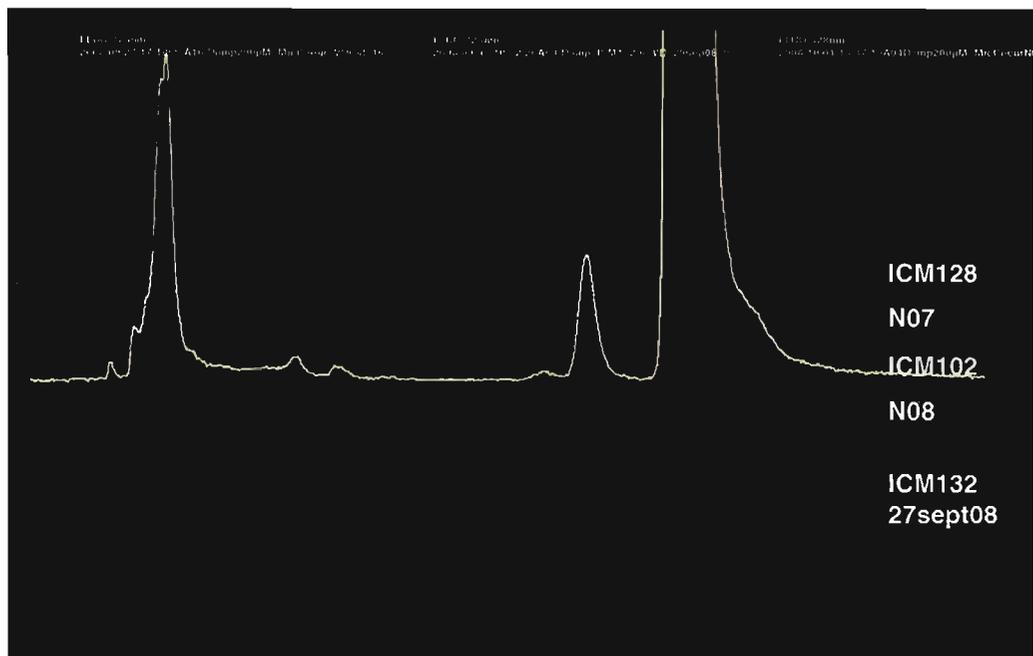


FIGURE 4

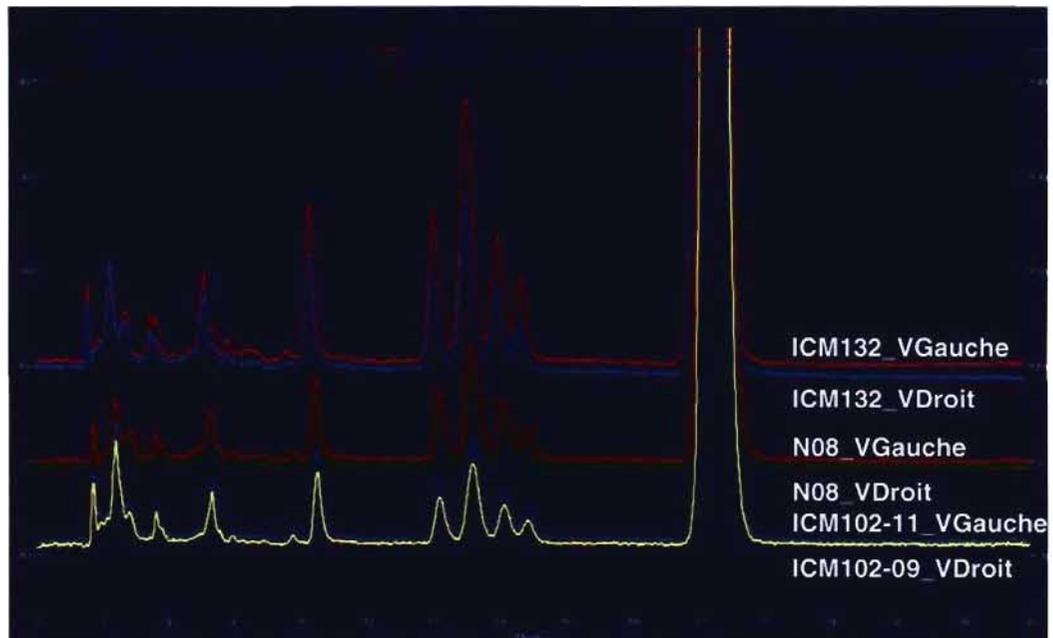


FIGURE 5

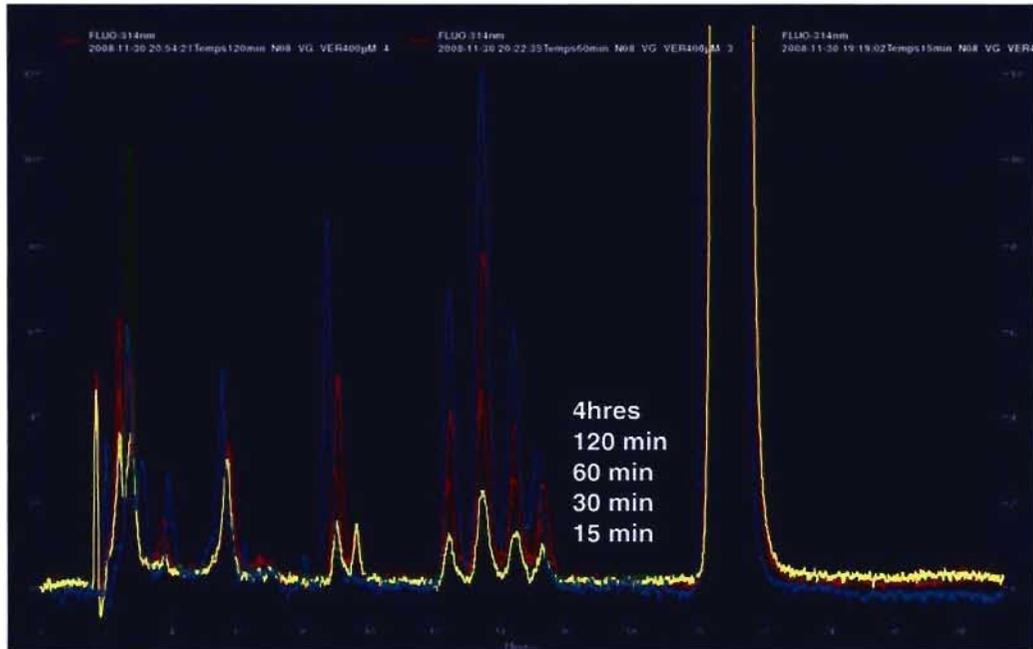
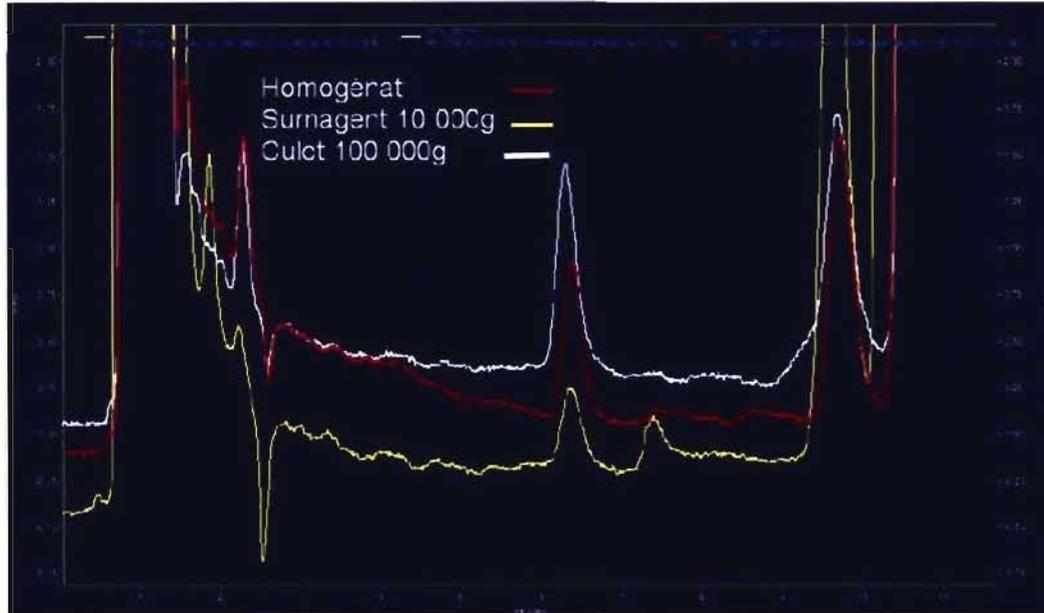
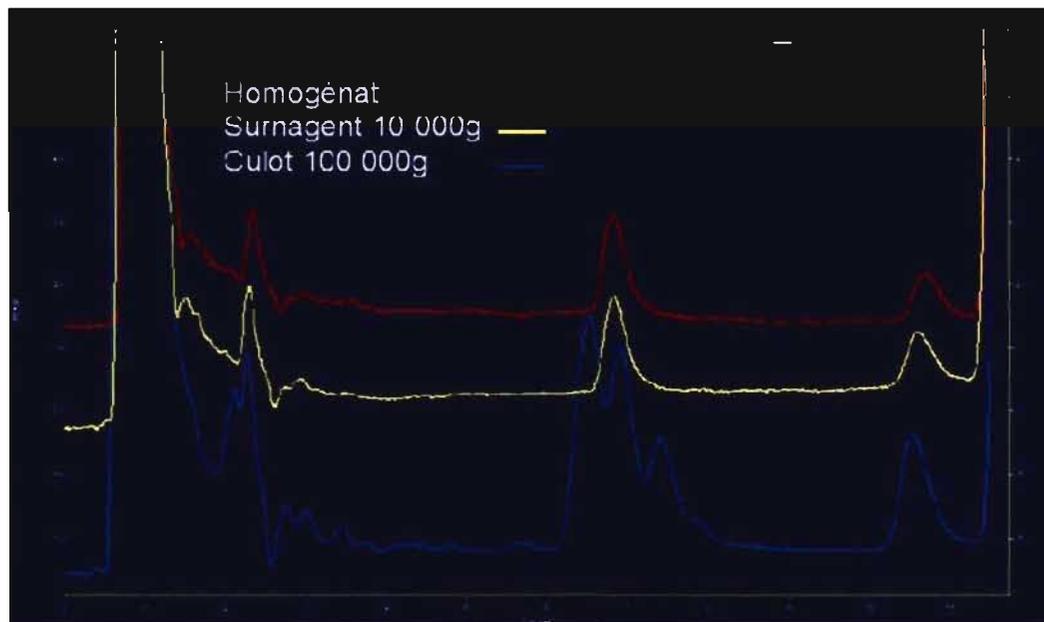


FIGURE 6

Sujet A



Sujet B



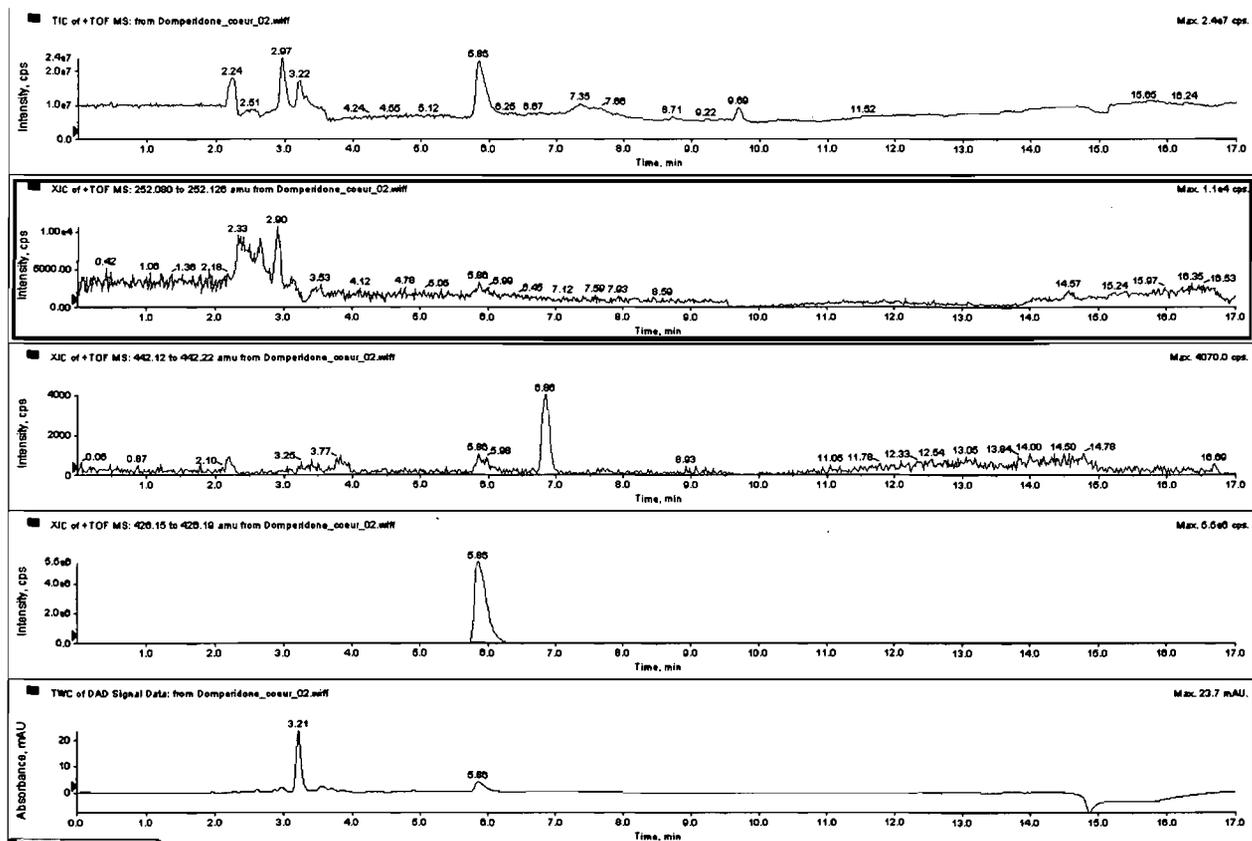
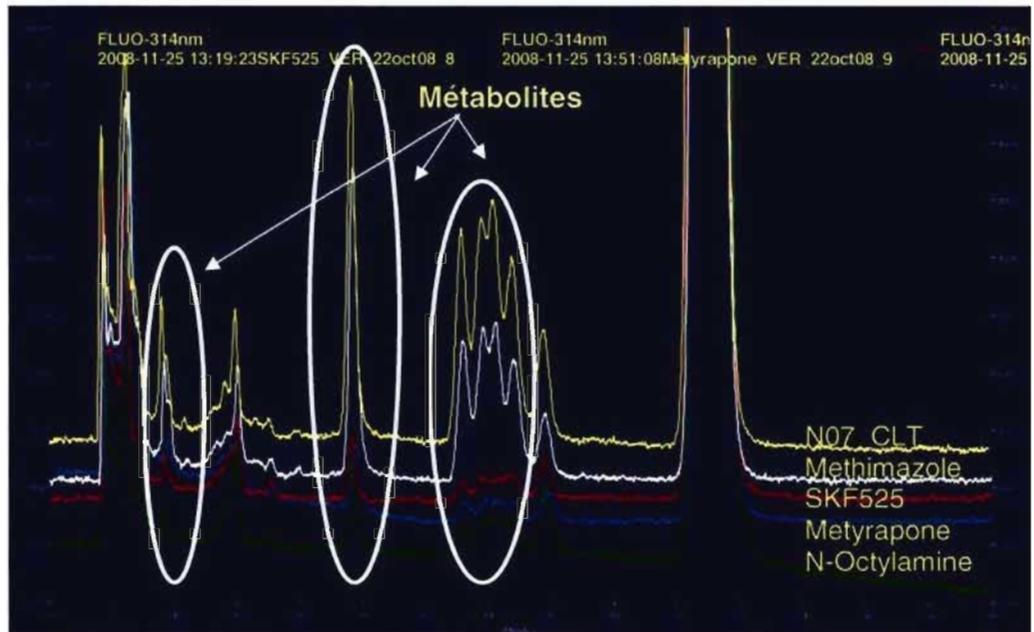


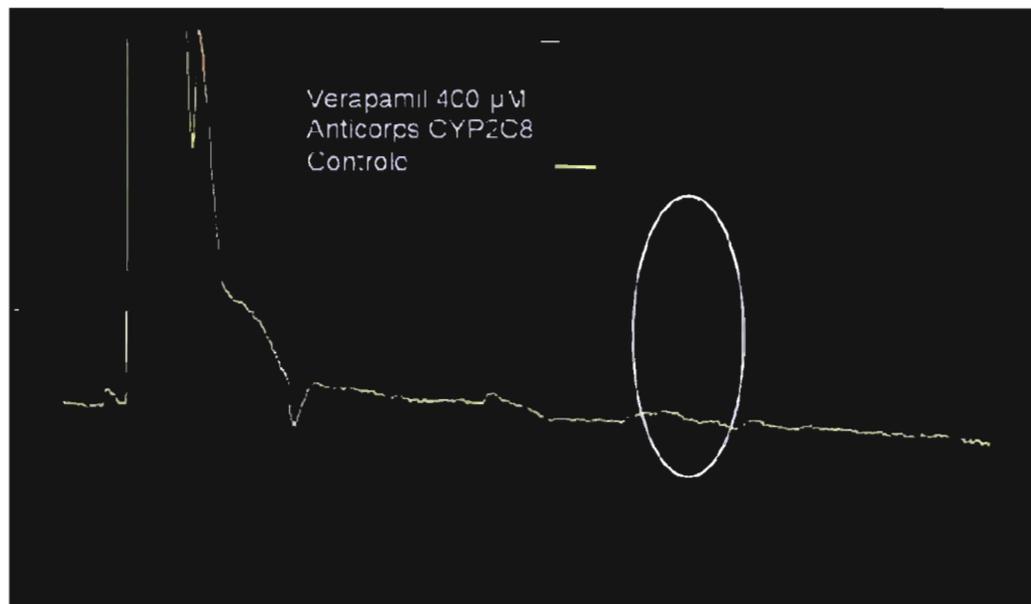
FIGURE 7

FIGURE 8

A)



B)



vii) DISCUSSION

La première partie de la discussion portera sur les résultats obtenus et observés dans ce projet de recherche et elle sera suivie d'une discussion en lien avec la pertinence clinique réelle ou potentielle sur le risque d'effets indésirables cardiaques avec la dompéridone en regard avec les données de la littérature et les résultats présentés dans cette thèse.

Discussion par rapport à nos résultats :

Le premier volet de cette étude a permis d'identifier la présence de différentes isoenzymes dans le tissu cardiaque humain. Ce résultat est en accord avec quelques études ayant détecté des CYP450s dans différentes régions du cœur. Un point important est que notre étude a été réalisée à l'aide d'une cohorte de 79 patients ce qui représente le plus grand nombre d'échantillons jamais analysés jusqu'ici. D'ailleurs, ceci permet d'expliquer les différences parfois observées entre nos résultats et ceux obtenus dans d'autres études qui possédaient une puissance statistique inférieure.^{331, 332} En accord avec les résultats de la littérature, nous avons aussi observé que le CYP2J2 est l'isoenzyme prédominante dans le tissu cardiaque. En présence d'insuffisance cardiaque, l'expression d'ARNm associée à certaines isoenzymes semble diminuée. Bien que la présence d'ARNm de CYP450s ait été détectée dans le tissu cardiaque, ceci ne confirme pas nécessairement la présence de la protéine active dans ce tissu.

Dans le second volet de notre étude, nous avons mis au point une technique permettant l'obtention des microsomes de cœur humain. Les résultats de notre étude nous ont permis d'affirmer que les CYP450s présents dans le cœur sont doués d'activité catalytique. Ceci suggère que les CYP450s cardiaques puissent avoir un rôle dans le métabolisme intra-tissulaire et ainsi pouvoir influencer l'effet pharmacologique ou encore la toxicité à certains médicaments comme le vérapamil et la dompéridone.

L'évaluation de l'activité catalytique des CYP450s cardiaques fut possible grâce à la mise au point d'une technique de préparation de microsomes de cœur car il n'existe pas actuellement des microsomes de cœur disponibles sur le marché. La préparation de microsomes extrahépatiques est souvent plus délicate et complexe. Des difficultés quant à la préparation de microsomes à partir de tissus comme le cerveau, les poumons et les reins ont déjà été soulevés. Le problème n'est pas de

détecter la protéine, mais de conserver l'intégrité de celle-ci lors des différentes étapes afin qu'elle préserve son activité. Il a fallu de nombreux essais afin de mettre au point une technique prévenant la dégradation de l'enzyme. Étant donné que la méthode de préparation a été vu que brièvement dans l'article, elle sera davantage discutée dans cette section.

De nombreux protocoles utilisant la méthode d'ultracentrifugation ont été testés et essayés tout d'abord avec des cœurs de cobaye. Parmi les différentes méthodes expérimentées, nous avons évalué l'effet de différentes combinaisons de tampon : par exemple, tampon phosphate vs TRIS, du sucrose, du chlorure de potassium, des détergents, du glycérol et différents inhibiteurs de protéases. Nous avons aussi étudié différentes techniques de perfusion afin de retirer le sang avant d'entreprendre l'homogénéisation et les ultracentrifugations. Par exemple, le cœur a été perfusé 1) avec du tampon Krebs-Henseleit à différentes températures à l'aide d'un montage *ex vivo*, 2) directement soit via la veine cave inférieure ou encore directement dans le ventricule gauche. Et l'effet d'une congélation immédiate dans l'azote liquide après le retrait du cœur de l'animal a aussi été exploré. L'effet de l'âge et du sexe a été évalué en répétant les expériences avec des cobayes femelles vs mâles et en utilisant de jeunes cobayes (poids ~250g) comparativement à des cobayes d'âge mature (poids ~800-900g). Une autre espèce animale a également été évaluée, c'est-à-dire le rat. Nous avons aussi isolé des cardiomyocytes de rat et effectué des incubations directement avec ces cellules. Mais aucune de ces approches ne fut positive et concluante. Étant donné les multiples échecs et le manque de données quant à l'expression possible de CYP450 dans le cœur de cobaye, cette espèce animale a été abandonnée. Des échantillons de cœurs humains provenant du ventricule gauche ont été par la suite utilisés pour la préparation de fractions microsomaux de cœur. Différents protocoles similaires à ceux mentionnés ci-haut ont également été évalués.

Tel que décrit dans l'article, nos résultats démontrent qu'à partir de la méthode mise au point, les microsomes ont une activité métabolique pour le vérapamil et la dompéridone. Ces résultats demeurent préliminaires puisque la technique d'analyse HPLC pour la quantification des métabolites formés manque de sensibilité. Ainsi, différents métabolites produits en présence de microsomes de cœur ont pu être détectés, mais difficilement quantifiables dû au manque de sensibilité comme mentionné précédemment mais aussi dû au fait que ces métabolites sont parfois

inconnus. En fait, les métabolites formés peuvent être spécifiques selon l'isoenzyme mais aussi selon le tissu.

Les résultats des différentes études menées par le groupe de Thum et Borlak montrent la présence d'une activité catalytique reliée aux CYP450s cardiaques et ceci tant chez le rat que chez l'humain.^{331, 332, 377, 422} Globalement, nos résultats sont en accord avec les observations faites par ces auteurs en ce qui a trait à la présence de CYP450s dans le cœur. De plus, nos analyses ont révélé la présence d'une activité catalytique. Le groupe de Borlak et Thum n'avait pu détecter les différents métabolites du vérapamil en utilisant des échantillons de ventricule gauche. Au contraire, nous avons démontré la formation de métabolites de vérapamil en utilisant des microsomes de ventricule gauche isolés selon notre technique et confirmer le rôle des CYP2Cs par l'ajout d'anticorps sélectifs. Également, les études en présence d'inhibiteurs confirment que la formation des métabolites tant avec le vérapamil que la dompéridone est CYP450-dépendante. Le méthimazole, un inhibiteur puissant des FMO n'a causé aucune inhibition alors que les inhibiteurs non-spécifiques des CYP450s comme le SKF 525, la métyrapone et la N-octylamine ont diminué significativement la quantité de métabolites formés.

La méthode d'analyse du groupe de Thum et Borlak qui utilise un LCMS est plus sensible que notre méthode analytique par HPLC. Ceci suggère que les différences dans la formation des métabolites observés entre notre étude et la leur sont davantage expliquées par la technique de préparation des microsomes que par la technique de détection des métabolites. Également, Thum et Borlak utilisent quatre fois plus de protéines microsomales pour effectuer leurs incubations avec le vérapamil et ils procèdent à une filtration de leur milieu d'incubation afin de concentrer l'échantillon. Ceci supporte aussi l'affirmation à savoir que leur technique de préparation des microsomes serait moins efficace que la nôtre.

Une étude s'intéressant à l'effet catalytique des CYP450s cardiaques a évalué l'influence de l'insuffisance cardiaque sur le métabolisme cardiaque de la testostérone dans des microsomes de cœurs humains.³³² Une augmentation de l'hydroxylation de la testostérone a été trouvée dans les cœurs hypertrophiques comparativement aux cœurs normaux. Cette élévation du métabolisme de ce stéroïde était corrélée avec les changements dans l'expression de certaines isoenzymes du CYP450. De fait, l'expression relative d'ADNc des isoformes CYP2A6 et CYP4A11 dans les échantillons de ventricule gauche hypertrophique

était 2-3 fois plus élevée que dans les cœurs contrôlés. Cette étude a montré que le métabolisme de la testostérone peut être affecté par l'hypertrophie cardiaque et ces auteurs ont suggéré un rôle des CYP450s dans l'hypertrophie cardiaque par la modulation du métabolisme local cardiaque de la testostérone.

En conclusion, nous avons montré la présence de messagers associés à l'expression de CYP450s dans du tissu cardiaque (cœurs normaux et cœurs malades, ventricules gauche et droit). En accord avec les données de la littérature, le CYP2J2 est l'isoenzyme prédominante dans le cœur. Une variabilité interindividuelle importante caractérise l'expression des ARNm des différentes isoenzymes des CYP450s évaluées. La préparation de microsomes de cœur fut excessivement difficile dû à un manque d'information quant à l'emplacement des CYP450s dans le cardiomyocyte ou à une dégradation de l'enzyme ou encore la technique de préparation des cœurs suivant l'explantation. Malgré cette problématique, une activité catalytique a été observée avec quelques échantillons de cœurs de ventricule gauche (malades). Une activité catalytique qui semble également variable entre les sujets tel que montré avec les essais réalisés avec le vérapamil. Ainsi, le cœur semble doué d'activité métabolique laquelle pourrait être influencée lors de conditions pathologiques et causer une variabilité dans la réponse aux médicaments utilisés dans le traitement de diverses pathologies cardiovasculaires. Par conséquent, nos études supportent fortement le rôle du métabolisme intracellulaire (extrahépatique) comme facteur de variabilité dans la réponse aux médicaments.

Discussion par rapport à la pertinence clinique :

La variabilité dans le métabolisme des médicaments et son importance clinique dépendra d'une combinaison de facteurs dont l'activité ou non du produit mère et de ses métabolites. En présence d'un métabolisme diminué, on observera une augmentation des concentrations du médicament et une diminution des métabolites formés par l'enzyme affecté. L'inverse sera observé en présence d'une activité catalytique élevée, par exemple en présence d'inducteurs. Les répercussions cliniques seront donc influencées par les propriétés tant de la molécule mère que des métabolites produits. Dans le cas de la dompéridone, les métabolites ont été identifiés mais, il n'y a aucune donnée concernant l'activité des métabolites sur les canaux potassiques. Donc, l'importance de nos résultats, à ce jour, repose sur la pertinence des concentrations associées à la dompéridone.

Des concentrations plasmatiques plus élevées d'un médicament augmentent généralement le risque d'effets indésirables. Une augmentation des concentrations plasmatiques entraîne ainsi une exposition de différents tissus comme le cœur à des concentrations plus élevées du médicament. Des concentrations intracellulaires élevées augmentent les différents effets bénéfiques ou nocifs des médicaments dans cet organe lorsque la cible de ces effets est intracellulaire. Dans le cas des médicaments qui prolongent l'intervalle QT, des inhibitions enzymatiques (de leurs métabolismes) dans l'intestin ou dans le foie provoquent une augmentation de leurs concentrations plasmatiques. Par le fait même, leurs concentrations intracardiaques seraient augmentées.

Notre hypothèse de recherche est à l'effet que des variations dans la capacité intrinsèque intra-myocardique à métaboliser certains médicaments pourraient expliquer la variabilité interindividuelle associée aux médicaments causant une prolongation de l'intervalle QT.

En effet, un grand nombre des patients traités avec un médicament pouvant prolonger l'intervalle QT ne développeront jamais de torsade de pointes. Différents facteurs de risque (par exemple ; le sexe féminin, l'hypokaliémie, la bradycardie, des cardiomyopathies, ect.) prédisposent les patients à l'apparition du long QT médicamenteux et à la torsade de pointes. Zeltser *et al.* ont réalisé une étude faisant la revue d'environ 250 cas de torsades de pointes causées par des médicaments classifiés comme «non cardiaques» (c'est-à-dire que l'indication devait être autre que cardiaque).⁴²³ Ces auteurs ont rapporté que tous les patients ayant présentés une torsade de pointes présentaient au moins un facteur de risque et que 71% des cas étudiés étaient chez des patients de sexe féminin.⁴²³ Les interactions médicamenteuses, particulièrement celles qui affectent le métabolisme des médicaments, figurent parmi les facteurs de risque importants. En effet, la présence d'interactions médicamenteuses potentielles était associée à 32-51% des cas de torsades de pointes reliés à des médicaments qualifiés «non cardiaques». Par exemple, la majorité des cas de torsades de pointes rapportés avec le cisapride, un analogue de la dompéridone, ont été observés en situation d'interactions médicamenteuses. De fait, il a été montré que le cisapride seul n'augmente l'intervalle QT que ~10 msec.⁴²⁴⁻⁴²⁶ Toutefois, la présence d'inhibiteurs du métabolisme du cisapride comme le kétoconazole, l'érythromycine ou la clarithromycine, a été associée à un risque important de torsades de pointes avec le cisapride.⁴²⁷⁻⁴³¹ Djeddi *et al.* ont évalué la prolongation de l'intervalle QT chez 31

enfants recevant de la dompéridone par voie orale.⁴³² Leurs résultats ont montré que l'intervalle QT était prolongé en moyenne de 14 msec.⁴³² Bien que ces auteurs recommandent qu'une mesure de l'intervalle QT devrait être effectuée avant et pendant le traitement oral de dompéridone, ils suggèrent l'administration orale de dompéridone en première ligne de traitement en remplacement au cisapride.⁴³² Ceci soulève des questionnements quant à l'innocuité de la dompéridone comparativement au cisapride. Chez les enfants, le cisapride a montré prolonger l'intervalle QT de 10 à 15 msec ce qui est comparable à la dompéridone qui est associée à une prolongation de 14 msec.^{424, 425, 432} Par conséquent, un risque similaire au cisapride semble exister pour la dompéridone.

Drolet *et al.* ont rapporté qu'à une concentration de 100 nmol/L la dompéridone cause une prolongation significative de la repolarisation cardiaque (valeur estimée d' IC_{50} à 162 nmol/L dans des cellules transfectées avec HERG).⁴³³ Une étude effectuée chez des sujets sains, a montré qu'après un traitement de 14 jours de dompéridone, les concentrations plasmatiques de ce médicament étaient de 49 nmol/L.⁴³⁴ Dans une autre étude, Heykants *et al.* ont rapporté que les concentrations maximales atteintes de dompéridone s'échelonnaient de 54

à 188 nmol/L, trente minutes après son administration orale (dose de 10 à 60 mg).⁴³⁵ Plus récemment, une étude chinoise réalisée auprès de dix-huit volontaires sains qui ont reçu une dose orale de 20 mg de dompéridone a rapporté des valeurs de C_{max} $\sim 50 \pm 32$ $\mu\text{g/L}$ (117 ± 75 nmol/L).⁴³⁶ Toutes ces études supportent le fait que certains patients peuvent présenter des concentrations plasmatiques avoisinant les concentrations nécessaires pour affecter la repolarisation cardiaque. Sachant que la biodisponibilité orale de la dompéridone est d'environ 17%, on s'attend que lors d'interactions médicamenteuses, les concentrations plasmatiques pourront s'élever significativement.⁴³⁷ En fait, la faible biodisponibilité de la dompéridone est un indice que la dompéridone sera particulièrement affectée lors d'une diminution de l'effet du premier passage hépatique-intestinal. On peut estimer que les concentrations plasmatiques maximales de dompéridone puissent augmenter jusqu'à de 5 fois lors d'une inhibition complète du premier passage. Dans de telles situations, les concentrations plasmatiques augmentées secondaire à la présence d'un inhibiteur de son métabolisme par le CYP3A4 et/ou de son transport par la glycoprotéine-P pourraient être suffisantes pour entraîner une prolongation importante du QT et des effets électrophysiologiques cliniquement significatifs.

En accord avec les concepts soulevés précédemment en lien avec l'impact clinique réel et potentiel avec la dompéridone sur le risque de torsades de pointes, Medecines Control Council a émis une alerte aux professionnels de la santé faisant mention de l'interaction médicamenteuse significative entre le kétoconazole et la dompéridone et indique que l'administration concomitante de ces deux agents est contre-indiquée.⁴³⁸ Ces auteurs rapportent des résultats d'études qui auraient montré une augmentation de 3 à 10 fois des valeurs de C_{max} et d'AUC de la dompéridone après la co-administration de kétoconazole. Selon les données de l'une de leurs études, ils rapportent une prolongation de l'intervalle de 10 à 20 msec lors de l'administration concomitante de dompéridone et de kétoconazole. Enfin, il faut noter que la dompéridone n'est pas sur le marché américain en raison du risque de torsades de pointes et que des contre-indications à son utilisation ont été émises en Afrique.

La démonstration de la présence d'une activité des CYP450s retrouvés dans le tissu cardiaque selon les résultats de cette thèse doit être considérée comme un déterminant des concentrations intracellulaires de la dompéridone. Ceci aura un impact important puisque la cible d'action est le canal potassique I_{Kr} et le site de liaison à ce canal s'effectue au niveau intracellulaire.^{439, 440} Pour la même concentration plasmatique, une diminution de l'activité

catalytique des CYP450s cardiaques pourrait entraîner une augmentation des concentrations intracellulaires de la dompéridone. Ceci suggère un risque augmenté du bloc du canal potassique et par conséquent, une plus grande propension à l'apparition de torsade de pointes.

Un autre volet étudié dans le laboratoire est celui des transporteurs. En plus du métabolisme des médicaments, il est maintenant bien établi que la variabilité interindividuelle est aussi due à la présence de transporteurs des médicaments. Couture *et al.* ont rapporté que de nombreux transporteurs sont exprimés dans le tissu cardiaque.⁴⁴¹ La dompéridone est un substrat de la glycoprotéine-P, un transporteur d'efflux.⁴⁴²⁻⁴⁴⁴ Des études menées dans notre laboratoire ont montré un lien «physique» entre I_{Kr} et la glycoprotéine-P. Il faut mentionner que de nombreux médicaments substrats ou inhibiteurs des CYP3As le sont également pour la glycoprotéine-P. Par conséquent, l'augmentation des concentrations intracellulaires de la dompéridone peuvent s'expliquer non seulement par un métabolisme intracellulaire diminué mais également par un efflux moindre par la glycoprotéine-P.

Ils existent des transporteurs d'influx qui pourraient aussi favoriser l'entrée de la dompéridone dans la cellule cardiaque. Toutefois, au cours de mes études doctorales, différents oocytes transfectés avec les gènes associés à OATP8 (SLC21A8), OATP1 (SCL21A3), OATP2 (SLC21A6) et OCT1 (SLC22A1) ont été utilisés afin d'évaluer si la dompéridone était transportée par ceux-ci. Les résultats de ces études se sont avérés non concluants.

TRAVAUX DE RECHERCHE

SECTION 2.2

VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE DANS LA RÉPONSE
À LA WARFARINE.

i) OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Mise en contexte: La warfarine, un antagoniste de la vitamine K, est l'anticoagulant le plus prescrit pour le traitement et la prophylaxie de maladies thromboemboliques.^{445, 446} La warfarine possède un index thérapeutique étroit associé à des risques de saignements. Afin de s'assurer d'une efficacité et d'une sécurité avec la warfarine, les doses de warfarine sont ajustées régulièrement en fonction du ratio international normalisé (INR). Il est reconnu que le traitement à la warfarine est difficile et encore aujourd'hui, l'administration de la warfarine demeure problématique en clinique. Malgré plusieurs stratégies proposées, l'initiation du traitement à la warfarine est encore empirique. Il a été proposé que la variabilité interindividuelle importante dans la réponse à la warfarine soit expliquée entre autres par la présence de variabilité tant au niveau pharmacocinétique que pharmacodynamique.

Parmi les divers facteurs pouvant expliquer la variabilité dans la réponse à la warfarine, on note des facteurs génétiques et des facteurs non-génétiques. Un intérêt particulier est porté depuis quelques années aux facteurs de variabilité génétique. Il existe des polymorphismes génétiques dans les isoenzymes responsables du métabolisme de la warfarine, entre autres le CYP2C9, de même qu'au niveau de la protéine sur laquelle la warfarine exerce son action, la vitamine K époxyde réductase (VKOR). Plusieurs SNPs de VKOR ont été récemment identifiés et ont été corrélés à des doses variables de warfarine; certaines mutations sont associées à une résistance alors que d'autres sont associées à une sensibilité accrue à la warfarine.

Objectifs: Plusieurs études ont tenté d'établir une corrélation entre les génotypes de CYP2C9 et la dose de warfarine, mais les résultats se sont avérés décevants. En fait, pour les individus porteurs de l'allèle sauvage *CYP2C9* ce qui représente ~90% de la population caucasienne, le génotype possède une très faible valeur prédictive chez les patients. Deux stratégies peuvent être utilisées afin de pouvoir prédire le profil métabolique de la warfarine, soit un génotype ou encore un phénotype. Il faut noter que les patients recevant de la warfarine présentent souvent un profil pharmacologique complexe composé de plusieurs médicaments. Nous croyons que l'utilisation d'un phénotype pour caractériser l'activité enzymatique du métabolisme de la warfarine serait plus approprié puisque cette stratégie reflète tous les facteurs

combinés pouvant influencer l'activité de l'isoenzyme CYP2C9. De fait, en plus du génotype, l'activité d'une enzyme peut être modulée par différents facteurs dont les interactions médicamenteuses. Nous avons alors émis l'hypothèse que le phénotype de CYP2C9 serait un meilleur prédicteur des doses de warfarine à utiliser en clinique puisque la majorité des patients reçoivent une polythérapie médicamenteuse.

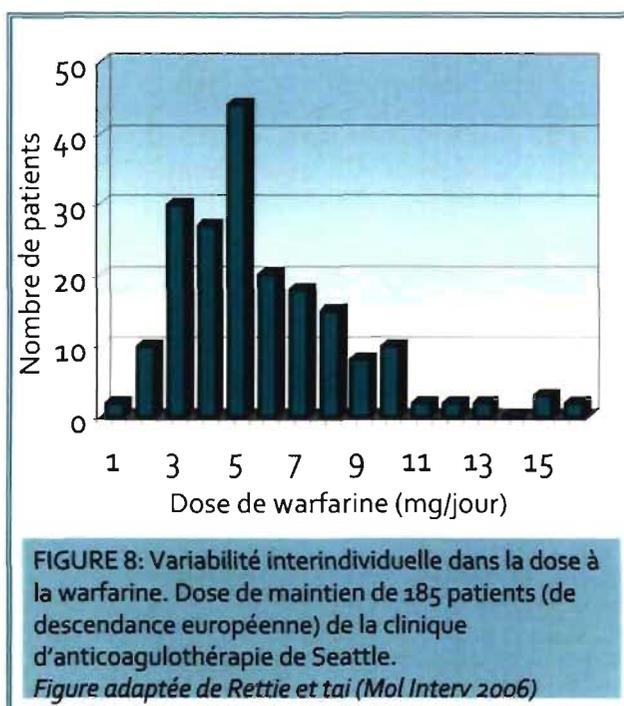
L'objectif de ce projet était 1) d'évaluer différentes approches phénotypiques (losartan, warfarine et INR), 2) de déterminer si différentes covariables (âge, sexe, poids, taille, génotypes de *CYP2C9* et de *VKOR*, médicaments, tabac, alcool et alimentation) sont en partie responsables de la variabilité dans la réponse à la warfarine, et 3) de combiner les approches phénotypique et génotypique afin d'établir un nomogramme de traitement pouvant prédire la dose de warfarine à prescrire. Ainsi, notre modèle évalue un phénotype déterminé à l'aide du losartan, un substrat spécifique au CYP2C9, un phénotype basé sur la warfarine laquelle est utilisée comme son propre substrat marqueur et finalement, un troisième phénotype lequel tient compte de tous les facteurs affectant l'effet pharmacologique de la warfarine, soit un INR au jour 4. L'aboutissement de ce projet était de déterminer la contribution des différentes covariables dans la variabilité de la réponse à la warfarine et ultimement, de proposer un modèle combinant différentes approches phénotypiques et les génotypes d'intérêt. Brièvement, cette étude s'est déroulée auprès de 144 patients hospitalisés chez qui un traitement à la warfarine était initié avec un suivi moyen de 14 jours.

ii) INTRODUCTION

Les anticoagulants coumariniques dont le prototype est la warfarine constituent la pierre angulaire du traitement de maladies thromboemboliques. La warfarine est le premier dérivé hydroxycoumarin synthétisé en 1948 par le laboratoire de Karl Link qui travaillait alors à développer de puissants rodenticides. Depuis son introduction dans la pratique clinique dans les années 50, la warfarine a largement gagné en popularité et compte parmi les médicaments les plus prescrits. De fait, aux États-Unis, la warfarine, l'anticoagulant oral le plus utilisé mondialement, représente un marché de plus de 30 millions de prescriptions annuelles dont un million de nouveaux patients chez qui un traitement à la warfarine est initiée.^{447, 448} La

warfarine a montré son efficacité dans la prophylaxie et le traitement de thrombose veineuse et d'embolie pulmonaire, pour les complications thromboemboliques associées avec la fibrillation auriculaire, avec le remplacement de valve mécanique cardiaque et en post-infarctus du myocarde.^{449, 450} Bien que les anticoagulants oraux soient très efficaces pour réduire le risque de mortalité et de morbidité, il n'en demeure pas moins que certaines études mentionnent que la warfarine est sous-utilisée due aux risques de toxicité possibles.⁴⁵¹⁻⁴⁵⁴ Effectivement, des risques importants d'effets indésirables majeurs, comme les hémorragies, sont associés avec l'administration d'anticoagulants oraux comme la warfarine. D'ailleurs, Wysowski *et al.* mentionnaient que la warfarine était parmi les dix médicaments les plus mentionnés dans les rapports d'effets secondaires à la Food and Drug Administration.⁴⁵⁵

La warfarine est un médicament à index thérapeutique étroit pour lequel les risques d'une sur-anticoagulation associée à des saignements et des hémorragies doivent être minimisés tout en maintenant une anticoagulation optimale et adéquate. Ceci requiert un suivi fréquent et rigoureux pour les cliniciens et les patients. L'outil clinique utilisé pour monitorer l'intervalle thérapeutique est une mesure phénotypique de l'état d'anticoagulation que l'on nomme un INR (international normalized ratio) qui brièvement, est basé sur le temps de prothrombine.^{456, 457} La fenêtre thérapeutique de l'INR visé pour la majorité des patients prenant des anticoagulants oraux se situe généralement entre 2-3.⁴⁵⁷



Malgré un suivi très étroit, une variabilité importante dans les doses de maintien d'anticoagulant est observée pour un même INR tel que démontré par la figure suivante.⁴⁵⁸⁻⁴⁶¹ En effet, l'administration de doses équivalentes corrigées par le poids (kilogramme) d'anticoagulant oral résulte en un effet pharmacologique,

représenté par une valeur d'INR, qui diffère grandement entre les patients.⁴⁵⁸ Par exemple, Higashi *et al.*, ont observé chez 200 patients caucasiens que les doses quotidiennes de warfarine requises pour atteindre un INR entre 2-3 variaient ~30 fois, soit de 0,6-15,5 mg/jour.⁴⁶⁰ Toutefois, il faut noter que la variabilité réelle doit être estimée à la hausse puisque ces études n'incluaient généralement pas les cas de résistance aux anticoagulants où des doses très élevées de l'ordre de 30 mg par jour de warfarine ou de phenprocoumon sont requises pour obtenir l'effet pharmacologique désiré.⁴⁶² Plusieurs facteurs peuvent affecter la dose de warfarine administrée à un patient incluant les facteurs génétiques et les facteurs non-génétiques, comme les interactions médicamenteuses, les facteurs environnementaux (diète, alcool, tabagisme), l'âge, le poids et le sexe. Des polymorphismes dans les gènes encodant pour une protéine ou une enzyme ayant un rôle significatif tant dans la pharmacocinétique que dans la pharmacodynamique pourra causer une variabilité dans l'efficacité du médicament d'un patient à l'autre. La variabilité interindividuelle expliquée par des différences au niveau pharmacocinétique sera élaborée dans un premier temps, suivi en second lieu, des facteurs de variabilité au niveau pharmacodynamique.

iii) PHARMACOCINÉTIQUE

La warfarine est administrée sous forme d'un mélange racémique composé de deux énantiomères actifs, la S- et la R-warfarine qui possèdent des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques distinctes. De fait, l'énantiomère S-warfarine possède une clairance systémique supérieure et une activité intrinsèque de 2-5 fois plus puissante que la R-warfarine.⁴⁶³⁻⁴⁶⁵ La warfarine qui est faiblement éliminée inchangée dans l'urine, subit un métabolisme important et stéréosélectif produisant une série de métabolites hydroxylés inactifs via l'action de diverses isoenzymes des CYP450s.⁴⁶⁶ La S-warfarine est principalement métabolisée en métabolites 7-hydroxy et 6-hydroxywarfarine par l'isoenzyme CYP2C9.^{466, 467} Alors que l'isomère R est majoritairement transformé en 10-hydroxy, 8-hydroxy et 6-hydroxywarfarine par les CYP3A4, CYP2C19 et CYP1A2, respectivement.^{461, 466}

Facteurs génétiques :

Le CYP2C9, soit l'enzyme responsable du métabolisme de la S-warfarine qui est l'énantiomère le plus actif, représente un des déterminants pharmacogénétiques majeurs pouvant expliquer la variabilité associée aux doses de warfarine requises.. Il a alors été proposé que les individus porteurs d'allèles mutés de CYP2C9 métabolisent la S-warfarine plus lentement et conséquemment, ils nécessiteraient une dose de maintien inférieure.

En 1995, Furaya *et al.* rapportent la première étude montrant l'influence du polymorphisme génétique (*CYP2C9*1* vs **2*) du gène *CYP2C9* sur les doses de maintien de la warfarine.⁴⁶⁸ Les patients hétérozygotes *CYP2C9*1*2* prenaient des doses de warfarine de 20% inférieures à celles prises par les patients homozygotes pour l'allèle sauvage *CYP2C9*1*. Le groupe de Loebstein a montré une diminution de l'ordre de 37% de la clairance de la warfarine dans le groupe *CYP2C9*3*.⁴⁶⁹ L'étude de Takahashi *et al.* réalisée auprès de 86 japonais a trouvé que le génotype *CYP2C9*1*3* (n=3) était associé à une valeur de clairance métabolique 4-fois moindre que celles des patients *CYP2C9*1*1*.⁴⁷⁰ Étrangement, le même groupe ont publié en 2003 qu'il n'y avait pas de différences significatives dans les doses moyennes de warfarine entre les groupes de patients *CYP2C9*1*1*, **1*2* et **1*3*.⁴⁷¹ Quant au groupe de Linder *et al.*, ils ont observé des différences dans les doses requises entre les patients exprimant le *CYP2C9*1*1* et ceux avec les génotypes *CYP2C9*1*2* et **1*3*.⁴⁷²

Il est intéressant de noter que pour un même INR, les concentrations de S-warfarine sont semblables entre les différents génotypes du CYP2C9 (*CYP2C9*1*1*, **1*2*, **1*3*, **2*2*, **2*3*).⁴⁷² Également, différentes études ont montré que les variants alléliques (**2* et/ou **3*) étaient associés à un ratio S /R-warfarine plus élevé.^{472, 473} Au contraire, d'autres études ont observé un chevauchement considérable dans les ratios S/R-warfarine entre le génotype *CYP2C9*1*1*, **1*2* et **1*3*.^{474, 475} De fait, Scordo *et al.* proposent que le ratio S/R-warfarine ne soit utile qu'en présence de deux allèles mutés où une activité faible voire nulle du CYP2C9 est alors observée.⁴⁷⁵ Ils observent aussi que la fréquence d'allèles mutés est plus élevée dans le groupe recevant de faibles doses de warfarine et aucun allèle muté n'est retrouvé dans le groupe recevant des doses élevées. Toutefois, 30% des patients recevant de petites doses avaient un génotype *CYP2C9*1*1*. Par conséquent, ils ont conclu que le génotype n'était pas assez rigoureux pour les individus *CYP2C9*1*

et qu'il était prédictif seulement pour les patients avec deux allèles mutés ce qui représente 4-6% de la population caucasienne.⁴⁷⁵

Des études ont montré une association entre le risque d'une sur-anticoagulation et de saignements et les génotypes du CYP2C9.^{460, 476-478} Les patients avec des allèles mutés présentent un premier saignement plus tôt et la présence d'un ou de deux variants alléliques augmente de 5-6 fois le risque d'avoir un INR au-delà de la limite supérieure de l'intervalle thérapeutique. Une méta-analyse regroupant 9 études et comptabilisant près de 3000 patients indique que le risque relatif de saignements est significativement augmenté chez les porteurs d'allèle *CYP2C9*2* et *CYP2C9*3*.⁴⁷⁶

La prévalence ainsi que le patron des variants alléliques varient considérablement selon les groupes ethniques. La population caucasienne est la plus largement étudiée et en moyenne, le génotype CYP2C9 (pour les allèles *1, *2 et *3) prédit ~10% (5-22%) de la variabilité dans la dose de warfarine.

Facteurs non-génétiques:

Parmi les différents facteurs pouvant altérer la pharmacocinétique de la warfarine, on note principalement ceux affectant son absorption ou son métabolisme. Par exemple, la cholestyramine peut réduire l'effet anticoagulant de la warfarine en diminuant son absorption.^{479, 480} Certains médicaments peuvent réduire ou encore augmenter la clairance hépatique de la warfarine et conséquemment, affecter à la hausse ou à la baisse l'effet de la warfarine. Ainsi, l'administration concomitante de warfarine avec des médicaments inhibant son métabolisme comme l'amiodarone (CYP2C9, CYP3A4)⁴⁸¹⁻⁴⁸⁴, des dérivés azoles (métronidazole, voriconazole, fluconazole ; CYP2C9, CYP3A4)⁴⁸⁵⁻⁴⁸⁸, la fluvastatine (CYP2C9)⁴⁸⁹, la simvastatine (CYP3A4)⁴⁹⁰, la ciprofloxacine (CYP1A2)⁴⁹¹, l'antibiotique triméthoprim-sulfaméthoxazole (CYP2C9)⁴⁹² oblige l'utilisation de doses plus faibles de warfarine. À l'inverse, des doses plus élevées sont nécessaires lorsque des médicaments comme la rifampicine, la carbamazépine et des barbituriques lesquels induisent les isoenzymes des CYP450s impliquées dans le métabolisme de la warfarine sont coadministrés.⁴⁹³⁻⁴⁹⁶

Par ailleurs, bien que la warfarine soit hautement liée aux protéines plasmatiques (~98%), il est rapporté qu'une augmentation de l'effet anticoagulant due à

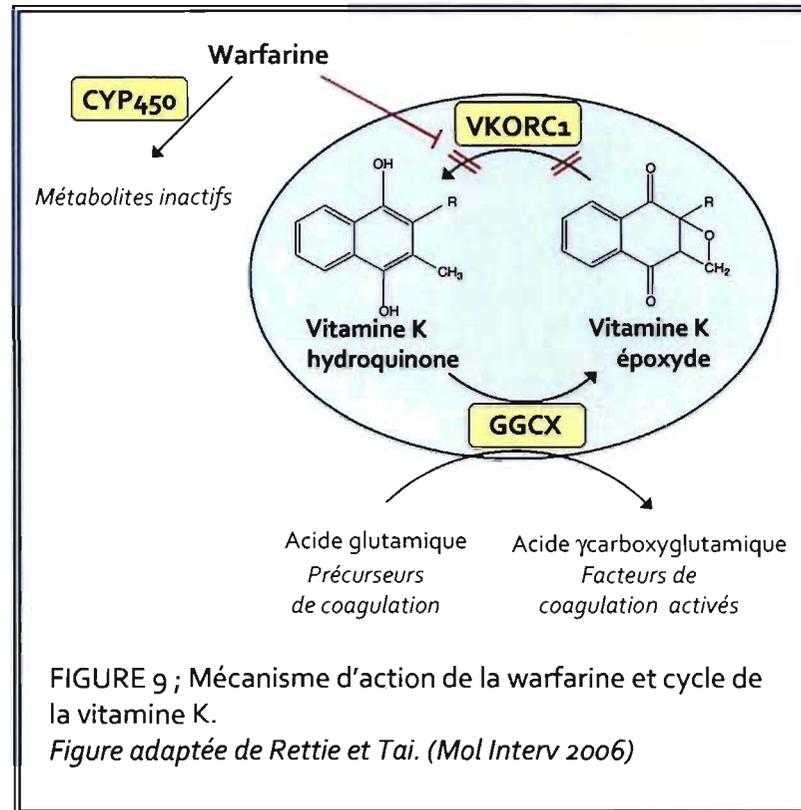
l'augmentation de la fraction libre causée par la présence abondante de médicaments aussi liés à l'albumine serait excessivement rare. Il a été proposé que ce type d'interaction médicamenteuse affectant la fixation protéique soit davantage théorique. D'autre part, les données concernant l'impact de l'insuffisance rénale sur l'activité de la warfarine sont controversées. Certains affirment que la clairance rénale ne jouerait pas un rôle significatif dans la réponse à la warfarine, alors que d'autres proposent que l'insuffisance rénale chronique pourrait altérer le degré de liaison aux protéines plasmatiques et ainsi expliquer le risque augmenté d'effets indésirables associés à la warfarine chez ces patients.⁴⁹⁷ Cependant, un autre mécanisme a aussi été proposé et celui-ci porte sur la capacité métabolique modifiée chez les patients avec insuffisance rénale.⁴⁹⁸⁻⁵⁰⁰ Par exemple, l'étude de Dreisbach a montré que l'activité du CYP2C9 était réduite de 50% chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique.⁴⁹⁹

Il existe une corrélation entre l'âge des patients et l'activité anticoagulante de la warfarine. En effet, les doses de warfarine tendent à diminuer plus l'âge des patients augmente. Loebstein *et al.* associent cette diminution des doses quotidiennes à une clairance amoindrie de la warfarine puisqu'ils ont trouvé que les niveaux plasmatiques de warfarine et de vitamine K étaient similaires selon les groupes d'âge.⁴⁶⁹ Sur un autre point de vue, l'étude de Kamali *et al.* semble montrer un lien entre l'âge et le contenu hépatique en vitamine K époxyde réductase qui apparaissait réduit chez les patients plus âgés.

iv) PHARMACODYNAMIE

Les analyses pharmacodynamiques ont montré que la warfarine est un antagoniste de la vitamine K c'est-à-dire qu'elle produit son effet anticoagulant en interférant avec l'inter-conversion de la vitamine K et son époxyde 2,3 vitamine K lesquels sont des cofacteurs essentiels dans la formation de facteurs de coagulation (figure 9).⁴⁶¹ Les facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K ainsi que des anticoagulants dits naturels, les protéines C et S, requièrent une carboxylation laquelle est catalysée via la γ -carboxylase vitamine K-dépendante (GGCX).^{501, 502} L'enzyme GG CX nécessite la forme réduite de la vitamine K (vitamine KH_2) à titre de cofacteur de même que la vitamine K époxyde réductase (VKOR) puisque celle-ci produit le cofacteur.⁵⁰¹ En résumé, la warfarine inhibe VKORC1 (C1; complexe 1)

ce qui entraîne une déplétion en vitamine hydroquinone (vitamine KH_2) et conséquemment, limite la γ -carboxylation.⁵⁰¹



Facteurs génétiques :

Le gène encodant pour VKORC1, enzyme cible sur lequel la warfarine exerce son action inhibitrice, a été identifié en 2004 par les groupes Li *et al.* ainsi que Rost *et al.*^{503, 504} Le rôle central de ce gène dans le cycle de la vitamine K a été mis en évidence par l'identification d'un polymorphisme génétique dans VKORC1 chez des patients résistants à la warfarine.^{504, 505} Cependant, ces variants dits résistants sont extrêmement rares et comptent seulement pour un faible pourcentage de la variabilité dans la population (fréquence <0.1%). Rieder *et al.* ont procédé à une analyse de re-séquencage du gène de VKORC1 auprès d'une cohorte ~200 patients européen-américains recevant de la warfarine.⁵⁰⁶ Ils ont identifié 28 SNPs dont 10 SNPs (aux positions ; 381, 861, 2653, 3673, 5808, 6009, 6484, 6853, 7566, 9041) ayant une fréquence supérieure à 5%. De plus, 7 de ces SNPs (aux positions ; 381, 3673, 5808, 6484, 6853, 7566, 9041) étaient significativement associés avec les doses de warfarine. Des 10 SNPs communs, 5 haplotypes

majeurs ont été dérivés ; le groupe A est constitué des haplotypes H1 et H2 qui sont associés à de faibles doses de warfarine tandis que le groupe B est composé des haplotypes H7-H9 lesquels sont associés à des doses élevées. Les individus hétérozygotes combinant les groupes A et B seraient associés à des doses intermédiaires. Ainsi, les haplotypes de VKORC1 peuvent être utilisés pour stratifier les patients selon les groupes nécessitant soit une dose faible (AA ; 2,7 mg/jour), intermédiaire (AB ; 4,9 mg/jour) ou élevée (BB ; 6,2 mg/jour).

De nombreuses études ont par la suite investigué l'impact des variations génétiques sur la réponse aux anticoagulants oraux. Pour simplifier les analyses, plusieurs études n'ont utilisé qu'un seul SNP afin de différencier les individus selon les doses de warfarine. D'Andrea *et al.* ont trouvé que les patients avec la mutation à la position 1173 T/C (selon la nomenclature ; équivalent à 6484) nécessitaient des doses inférieures de warfarine.⁵⁰⁷ Dans certains cas, il semble que l'utilisation d'un seul SNP est suffisamment discriminante pour assigner directement le groupe-haplotype. En effet, le SNP 1173 assignerait les sujets soit dans les groupes A ou B dans 95% du temps (où l'allèle 1173T représente le groupe B).⁵⁰⁶⁻⁵⁰⁸ Le polymorphisme -1639 G/A (équivalent à 3673) lequel est situé dans la région promotrice a aussi été largement étudié.^{509, 510} Yuan *et al.* ont montré que le polymorphisme 1173 T/C était en déséquilibre avec le polymorphisme -1639 G/A.⁵¹⁰ Plusieurs études ont rapporté une augmentation de l'activité (~44%) transcriptionnelle du gène 1689 avec l'allèle G comparativement à l'allèle A.^{508, 510, 511}

Il existe des évidences suggérant que les différences ethniques dans la sensibilité à la warfarine soient en partie expliquées par des variations dans le gène de VKOR. De fait, les asiatiques présentent un profil de polymorphismes différents de celui des caucasiens. Par exemple, la fréquence du génotype -1639AA est de 83% et 82% chez les patients japonais et chinois, respectivement, comparativement à 14% chez les caucasiens.^{505, 509, 512} De plus, le groupe haplotype A est davantage fréquent chez les asiatiques, soit 89%, alors que le groupe haplotype B est plus fréquent chez les caucasiens, soit 58%.⁵⁰⁶ Ceci est en accord avec les observations cliniques mentionnant que les asiatiques nécessitent des doses plus faibles d'anticoagulant pour atteindre le même degré d'anticoagulation.

Des études ont également rapporté que le risque de sur-anticoagulation (INR>3 ou 6) est augmenté chez les patients porteurs de l'allèle 1173T.⁵¹³⁻⁵¹⁵ Bien que peu d'études ont évalué l'effet du polymorphisme de VKORC1 sur le risque de

saignement, les données semblent toutefois bien montrer qu'il n'existerait pas de lien entre le génotype de VKORC1 et les saignements.^{516, 517} Le risque d'hémorragies serait augmenté seulement chez les porteurs de variants de CYP2C9 mais non pour VKORC1.⁵¹⁶

En résumé, toutes ces données suggèrent que les différents haplotypes exercent une influence sur les doses de maintien de la warfarine à administrer en affectant la transcription du gène puisque les haplotypes sont corrélés avec les niveaux d'expression d'ARNm associé au gène *VKORC1*.⁵⁰⁶ Globalement, une analyse récente incluant 10 études indépendantes révèle que le polymorphisme de VKORC1 contribue pour 25±8% (6-37% selon les études) de la variance dans les doses de warfarine.^{506, 518}

Il y a encore plusieurs projets de recherche qui tentent d'identifier si d'autres gènes additionnels pourraient contribuer à la variabilité observée dans la réponse à la warfarine. Parmi les enzymes qui pourraient avoir un impact sur les doses de warfarine, certains ont proposé la γ -glutamyle-carboxylase (GGCX), enzyme catalysant l'étape finale de la carboxylation des protéines vitamine K-dépendante. Cependant, les résultats d'études récentes sont peu concluants; les auteurs suggèrent que la contribution du polymorphisme de GGCX comme facteur de variabilité dans la réponse à la warfarine serait minime.^{519, 520}

Facteurs non-génétiques :

Il existe également des facteurs non-génétiques pouvant interférer avec l'activité de la warfarine. La diète, particulièrement l'apport en vitamine K soit par l'alimentation ou des suppléments diététiques, peut affecter la réponse anticoagulante par une action antagoniste compétitive.⁵²¹ Par exemple, l'effet anticoagulant de la warfarine est réduit suite à une augmentation de la consommation en légumes verts riches en vitamine K. Et à l'inverse, une diminution de l'apport en vitamine K ou une malnutrition importante peuvent causer une augmentation de l'activité de la warfarine. De plus, la présence de dysfonction hépatique chronique peut augmenter la sensibilité à la warfarine secondairement à une synthèse altérée des facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K.⁵²² Il a aussi été proposé que les états hypermétaboliques comme la fièvre ou l'hyperthyroïdie ou suivant l'administration de thyroxine, une augmentation de la réponse à la warfarine puisse être observée ce qui serait causée par un catabolisme accru des facteurs de coagulation.^{502, 523, 524}

L'administration concomitante de certains médicaments affectant l'hémostase peuvent causer des interactions médicamenteuses pharmacodynamiques avec l'anticoagulant par synergisme. Ainsi, des médicaments comme l'acide acétyl salicylique, le clopidogrel et des anti-inflammatoires non-stéroïdiens augmentent le risque de saignements associés à la warfarine en inhibant la fonction plaquettaire.⁵²⁵⁻⁵²⁷ Une étude a montré que chez des patients suivi en clinique d'anticoagulathérapie, des doses hebdomadaires d'acétaminophène de l'ordre de 2275 mg à 4759 mg étaient associées à des élévations des valeurs d'INR significatives ($INR \geq 6$).⁵²⁸

Conclusion:

En bref, la warfarine demeure difficile à gérer dû à son index thérapeutique étroit et à la grande variabilité observée dans la réponse anticoagulante. Nous voulions tenter de mieux comprendre les facteurs de variabilité, les identifier et proposer un outil pouvant décrire et prédire les doses de warfarine, dans une situation clinique réelle, chez des patients sans regard restrictif quant à la médication prise.

v) ARTICLE

nature publishing group

ARTICLES

Combination of Phenotype Assessments and *CYP2C9-VKORC1* Polymorphisms in the Determination of Warfarin Dose Requirements in Heavily Medicated Patients

V Michaud¹, M-C Vanier^{1,7}, D Brouillette², D Roy², L Verret², N Noel², I Taillon³, G O'Hara³, D Gossard⁴, M Champagne⁵, K Goodman⁵, Y Renaud⁶, A Brown⁶, M Phillips⁶, AM Ajami⁵ and J Turgeon¹

**COMBINATION OF PHENOTYPE ASSESSMENTS AND *CYP2C9-VKORC1* POLYMORPHISMS
IN THE DETERMINATION OF WARFARIN DOSE REQUIREMENTS IN HEAVILY MEDICATED
PATIENTS**

Veronique Michaud BPharm MSc¹, Marie-Claude Vanier BPharm MSc^{1,7}, Denis Brouillette BPharm MSc², Denis Roy MD², Lucie Verret BPharm MSc², Nicolas Noel BPharm MSc², Isabelle Taillon BPharm MSc³, Gilles O'Hara MD³, Denis Gossard MD⁴, Monique Champagne BPharm⁵, Keith Goodman PhD⁵, Yannick Renaud MSc⁶, Andrew Brown BSc⁶, Micheal Phillips PhD⁶, Alfred M. Ajami PhD⁵, Jacques Turgeon BPharm PhD¹

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

² Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

³ Institut Universitaire de Cardiologie, Hôpital Laval, Quebec, Quebec, Canada

⁴ Haut-Richelieu Hospital, St-Jean sur Richelieu, Quebec, Canada

⁵ Xanthus Pharmaceuticals, Cambridge, Massachusetts, USA

⁶ Genome Quebec & Montreal Heart Institute Pharmacogenomic Centres, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

⁷ Cité de la Santé de Laval, Laval, Quebec, Canada

Correspondance: Jacques Turgeon, B.Pharm., PhD.

Faculté de pharmacie

Université de Montréal

C.P.6128, Succursale Centre-ville

Montréal, Québec, Canada

H3C 3J7

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

ABSTRACT

The relative contribution of phenotypic measures and of *CYP2C9-VKORC1* polymorphisms to warfarin dose requirements on Day 14 was determined in 132 hospitalized, heavily medicated patients. Phenotypic measures were 1) the urinary losartan metabolic ratio prior to the first dose of warfarin, 2) the S:R-warfarin ratio on Day 1, and 3) a dose adjusted INR on Day 4. *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes were determined by gene chip analysis. In multivariate analyses, the dose adjusted INR on Day 4 explained 31% of variability observed in warfarin doses at Day 14 while genotypic measures (*CYP2C9-VKORC1*) contributed 6.5%. When S:R-warfarin ratio was used, genotypes contributed more significantly (23.5%). Finally, losartan urinary metabolic ratio was of low predictive value. Best models obtained explained 51% of intersubject variability in warfarin dose requirements. Thus, combination of a phenotypic measure to *CYP2C9-VKORC1* genotypes represents a useful strategy to predict warfarin doses in patients receiving multiple drugs (11 ± 4 drugs/day).

INTRODUCTION

Warfarin is a widely prescribed anticoagulant drug in the prophylactic and curative treatment of pulmonary embolism and venous and arterial thrombosis.^{1, 2} Initiation of warfarin therapy remains largely empirical and its use requires careful patient monitoring. Bleeding is observed in 7.6 to 16.5% of patients/ year and serious haemorrhages are observed at a rate of 1.3 to 4.2 per 100 patients/year of exposure.^{3, 4} Furthermore, the time needed to achieve a stable effect is frequently long (6-8 weeks) and the weekly dose required to maintain an acceptable level of efficacy while avoiding a high risk of side-effects varies more than 5-fold.⁵ Ageing of the population receiving multiple drugs makes warfarin dose adjustment even more complicated.

Warfarin is used clinically as a racemate. The pharmacological activity is found mainly at the level of S-warfarin which is 2-5 times more potent than the R-isomer.^{6, 7} However, R-warfarin predominates at steady state in patients with plasma concentrations that are approximately double those of S-warfarin.^{7, 8} Numerous factors including age, sex, genetic variants, illnesses and drug interactions affect the plasma pharmacokinetics and response to warfarin.^{9, 10}

CYP2C9 is principally responsible for the metabolism of S-warfarin, while CYP3A4/5, CYP1A2 and CYP2C19 are responsible for the metabolism of R-warfarin.¹¹⁻¹³ Numerous allele variants have been identified for *CYP2C9*. Two of these allele variants (*3 and *6) are associated with a loss of activity while *2, *4, *5 and *11 are associated with weaker enzyme activities.¹⁴⁻¹⁸ Probe drugs such as losartan, tolbutamide, phenytoin and warfarin have been used to determine the phenotypic activity of CYP2C9.¹⁹

Warfarin exerts its effects through inhibition of the vitamin K epoxide reductase (VKOR) that affects the synthesis of various coagulation factors. Rare mutations leading to amino acid changes in the VKOR protein have been described in patients exhibiting resistance to warfarin treatment. Moreover, other variants of the VKOR complex subunit 1 (*VKORC1*) gene have been described and five major haplotypes based on ten single nucleotide polymorphisms (SNP) have been shown to correlate with expression of *VKORC1* mRNA in human liver.²⁰

Thus, the main objective of our study was to determine the relative contribution of phenotypic measures, *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms, and multiple clinical covariates to the intersubject variability in warfarin dose requirements in a hospitalized, heavily medicated population of patients requiring initiation of warfarin treatment. Phenotypic measures were obtained through 1) the determination of losartan urinary metabolic ratio prior to the first dose of warfarin, 2) the measurement of plasma levels of S- and R-warfarin at various times after the first dose of the drug, and 3) through the estimation of the ratio of INR at Day 4 over the mean dose of warfarin administered from Day 1-3. Finally, major single nucleotide polymorphisms for *CYP2C9* and *VKORC1* were determined.

RESULTS

From the 143 patients initially included, 11 patients did not complete the study at Day 14 (Table I). Patients ranged in age from 24 to 86 years and their most common indication for warfarin therapy was atrial fibrillation (n=67, 51%). Patients took on average 11 drugs per day (1 to 30). A large proportion of patients (n=103; 72%) were receiving concurrent medication known to alter warfarin pharmacokinetics or pharmacodynamics: amiodarone (n=36), aspirin (n=45), acetaminophen (n=53), drugs interacting with *CYP2C9* (n=27), *CYP3A4* (n=39) and *CYP1A2* (n=15), inducer drugs (n=3) and fibrates (n=13).

Phenotypic Approaches

Data from 82 patients could be used for the assessment of the phenotypic approach using the losartan metabolic ratio. Patients were excluded from the phenotypic analysis because of the following reasons; losartan and/or metabolite (EXP3174) not detected (n=23), urine not collected adequately (n=9), urine could not be collected (n=7), patients were already on losartan therapy at entry (n=6) and in 8 patients, drugs known to modulate *CYP2C9* activity were removed or added to the drug regimen between Day 1 and Day 14. Overall, the urinary metabolic ratio of losartan ranged from 0.11 to 22.17 with a mean \pm SD of 4.6 ± 4.5 .

The urinary metabolic ratio of losartan tended to be higher among patients receiving a low dose of warfarin (6.5 ± 6.3) compared to medium (4.1 ± 4.3) and high dose groups

(1.7 ± 1.1); (Figure 1A; $p > 0.05$). By definition, a high metabolic ratio is indicative of a lower capacity to transform losartan into its metabolite and thus, indicative of low CYP2C9 activity. Patients with low losartan urinary metabolic ratios received 4.3 ± 1.7 mg/d compared to intermediate and high losartan ratio groups who took on average, 3.5 ± 1.7 and 2.5 ± 1.6 mg/d, respectively (Figure 2A; $p < 0.05$, low vs high ratio groups).

Data from 105 patients were available for the assessment of warfarin plasma concentrations as a marker of phenotypic activity. Data are lacking in some patients because of the following reasons: blood samples could not be obtained ($n=3$), or were missed ($n=7$), plasma concentrations of one isomer of warfarin or its metabolite were below the limit of detection ($n=7$). Modifications in drug regimens that modulate warfarin pharmacokinetics or pharmacodynamics caused the removal of 27 patients. S:R-warfarin ratio obtained at 3 ($n=92$), 14 ($n=91$) and 24 ($n=85$) hours after the first dose of warfarin ranged from 0.22 to 1.71 (mean \pm SD: 0.85 ± 0.23), 0.26 to 1.19 (0.68 ± 0.18) and 0.24 to 1.43 (0.63 ± 0.21), respectively. For a given dose, a high S:R-warfarin ratio is likely indicative of a low CYP2C9 activity (responsible for the metabolism of S-warfarin). Accordingly, patients receiving lower doses of warfarin on Day 14 exhibited higher S:R-warfarin ratios at 14 hours post-dose on Day 1 (Figure 1B; $p < 0.01$). Moreover, patients with a low S:R-warfarin ratio (14 hours) received 5.0 ± 1.9 mg/d compared to intermediate and high S:R ratio groups who took on average, 3.7 ± 1.6 and 2.9 ± 1.8 mg/d, respectively (Figure 2B; $p < 0.05$, low vs high ratio groups). No relationship could be demonstrated between levels of S-warfarin, R-warfarin, 7-hydroxy-S-warfarin or 7-hydroxy-S-warfarin/R-warfarin ratio and mean dose administered to our patients (Days 12, 11 and 10) corresponding to INR on Day 14.

The third marker of a phenotypic measure assessed was INR at Day 4 adjusted for dose (Day 1-3). Hence, INR at Day 4 was obtained in 119 patients; in 13 patients no INR values were available between Day 3-6. Results obtained demonstrated that the ratio INR at Day 4/mean dose was higher in subjects receiving low doses of warfarin corresponding to INR at Day 14 than subjects requiring higher doses (0.88 ± 0.55 vs 0.18 ± 0.04 , respectively) (Figure 1C; $p < 0.01$). On average, lower ratios indicative of «resistance» to warfarin effects were associated with higher doses of warfarin (5.4 ± 1.9 mg/d) although wide intersubject variability was observed (Figure 2C). In the other hand, patients very

sensitive to warfarin effects (ratio of INR (D4)/dose ≥ 1) required lower doses (2.0 ± 0.8 mg/d; $p < 0.01$).

Genotypic Approach

Genotype of *CYP2C9* could be determined in 128 patients: disease conditions did not allow for the preparation of high quality DNA in 4 patients. Allele frequencies for *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* were 0.79, 0.13 and 0.07, respectively (Table II). Mean doses of warfarin at Day 14 in patients with various *CYP2C9* genotypes are shown in Figure 3. Overlapping values were observed in warfarin dose requirements between subjects with a *CYP2C9*1*1* (4.2 ± 2.0 mg/d) or a *CYP2C9*1*2* (3.8 ± 2.0 mg/d) genotype. There was a significant gene-dose effect in patients carrying at least one *CYP2C9*3* allele. Indeed, patients with a *CYP2C9*1*3* genotype received lower doses of warfarin (2.6 ± 1.6 mg/d) than patients carrying two wild-type alleles (4.2 ± 2.0 mg/d) ($p < 0.01$). Only two subjects had a *CYP2C9*2*2* genotype who respectively received a mean daily dose of 2.17 mg and 5 mg, and two subjects with a *CYP2C9*2*3* genotype received a daily dose of 0.33 mg and 1.33 mg.

Patients ($n=126$) were also analyzed for *VKORC1* polymorphisms and 26 different genotypes could be detected (Table III). One hundred subjects could be used to determine influence of *VKORC1* SNPs on warfarin doses. Table IV illustrates that patients homozygous for the wild-type allele at position 5808, 3673, 6484, 6853 and 7566 of *VKORC1* required significantly higher mean doses than carriers of two variant alleles at these positions. Heterozygous patients tended to require an intermediate dose. Requirements of warfarin doses were also different among patients carrying the *VKORC1* 9041 G/A genotype ($p < 0.05$): patients with a wild-type G/G genotype required lower doses than patients with an A/A genotype.

The combined effects of *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms on warfarin dose are presented in Figure 4. For *CYP2C9*, patients have been grouped as extensive (carriers of *CYP2C9*1*1* and *CYP2C9*1*2*) or poor metabolizers (carriers of at least one *CYP2C9*3* allele). For *VKORC1*, special attention has been paid to three specific SNPs namely, 3673, 6484 and 9041. *VKORC1* had a clear modulatory effect on various *CYP2C9* metabolizer genotypes. Patients carrying a *CYP2C9*1* allele and homozygous for variant

alleles of *VKORC1* 3673 or 6484 had significantly reduced mean warfarin doses compared to those homozygous for these *VKORC1* wild-type alleles. Among extensive metabolizers of *CYP2C9* (*CYP2C9* *1 group), the subgroup of patients homozygous for the *VKORC1* 9041 wild-type allele required significantly lower doses of warfarin than carriers of one or two *VKORC1* 9041 variant alleles. Furthermore, patients with two wild-type alleles of *VKORC1* 9041 and carriers of one *CYP2C9**3 allele clearly required lower doses of warfarin than patients with two allelic variants for *VKORC1* 9041 ($p < 0.05$).

Combined phenotypic and *CYP2C9* genotypic approaches

We evaluated the combined effects of phenotype measures and genotype determinations on warfarin dose. Mean urinary metabolic ratio of losartan did not differ significantly among patients with various *CYP2C9* genotypes, although the metabolic ratio tended to be higher in carriers of a *CYP2C9**3 allele (Figure 5A). No significant differences in mean daily dose of warfarin were seen between various losartan metabolic ratio groups stratified for either *CYP2C9* or *VKORC1* genotypes.

S:R-warfarin ratio measured at 14 hours differed significantly between *CYP2C9**1*1, *CYP2C9**2 and *CYP2C9**3 genotypes.(Figure 5B) The mean ratio of warfarin enantiomers for patients with a *3 allele was higher compared to carriers of two wild-type alleles ($p < 0.001$) or *CYP2C9**2 allele ($p < 0.05$). Finally, subjects with a *CYP2C9**3 allele exhibited a greater ratio of INR (D4)/mean dose (0.8 ± 0.5) than patients with *CYP2C9**1*1 (0.5 ± 0.4) or *2 (0.5 ± 0.4) subgroups (Figure 5B). This suggests that on average, decreased clearance of warfarin due to lower metabolism is associated with increased effects for the same dose administered.

Regression Analysis

Univariate analysis was performed to identify covariates associated with the inter-individual variability in warfarin dose. Results from univariate study revealed that age, body-surface area, genotypes for *CYP2C9* and *VKORC1* [*CYP2C9**2 ($r^2 = 0.02$), *CYP2C9**3 ($r^2 = 0.09$), *VKORC1* 3673 (G>A) ($r^2 = 0.07$), 6484 (C>T) ($r^2 = 0.07$), 6853 (C>G) ($r^2 = 0.05$), 7566 (C>T) ($r^2 = 0.07$) and 9041 (G>A) ($r^2 = 0.05$)] different ratios of enantiomers such as R/(R+S-warfarin), S/(S+R-warfarin) and S:R-warfarin and various dose adjusted ratios of INR on Day 4 such as INR (D4)/dose, log INR (D4)/dose, INR (D4)/log dose, log INR(D4)/log dose were candidates contributing to variability observed in warfarin dose

requirements ($p < 0.2$). In contrast, indication for anticoagulation therapy ($p = 0.44$), plasma levels of 7-hydroxy-warfarin ($p = 0.39$ to 0.96), plasma levels of S- or R-warfarin alone ($p = 0.23$ to 0.91), ratio of 7-hydroxy-warfarin/R-warfarin ($p > 0.25$), *VKORC1 861 (C>A)* ($p = 0.98$), *5808 (T>G)* ($p = 0.93$) and *6009 (C>T)* ($p = 0.44$) and urinary metabolic ratio of losartan ($p = 0.42$) were not significant potential covariates involved in intersubject variability in warfarin daily doses.

Multiple regression analysis was performed with genetic and non-genetic variables including phenotypic measures. The major covariates contributing significantly to overall variability in warfarin doses were age, body-surface area, *VKORC1 9041 (G>A)* genotype, S:R-warfarin ratio at 14 hours and INR (D4)/dose ($p < 0.05$). Variables associated with lower warfarin doses were increasing age, carrying at least one *VKORC1 3673 A* allele, carrying one variant *CYP2C9* allele, carrying two variant alleles of *CYP2C9* and increasing S:R-warfarin ratio at 14 hours or increasing ratio of INR at Day 4 over dose (Day 1-3). Predictors of higher warfarin dose requirements were increasing body-surface-area, high INR values, *VKORC1 9041 G/A* and *A/A* genotypes. Two final regression equations to estimate warfarin daily dose requirement were derived using either phenotypic approaches: 1) $\text{dose (mg/day)} = 3.394 - 0.046 \cdot \text{age (years)} + 2.473 \cdot \text{BSA (m}^2) - 3.174 \cdot \text{S:R-warfarin ratio at 14 hours} - 0.256 \cdot \text{CYP2C9}^1 \cdot x - 1.575 \cdot \text{CYP2C9}^x \cdot x + 0.523 \cdot \text{VKORC1 9041 G/A} + 1.889 \cdot \text{VKORC1 9041 A/A} - 0.237 \cdot \text{at least one allele VKORC1 3673 A} + 0.196 \cdot \text{INR}$ and 2) $\text{dose (mg/day)} = 4.438 - 0.046 \cdot \text{age (years)} + 1.400 \cdot \text{BSA (m}^2) - 3.223 \cdot \text{INR (D4)/dose} - 0.599 \cdot \text{CYP2C9}^1 \cdot x - 1.443 \cdot \text{CYP2C9}^x \cdot x + 0.282 \cdot \text{VKORC1 9041 G/A} + 1.284 \cdot \text{VKORC1 9041 A/A} - 0.107 \cdot \text{at least one allele VKORC1 3673 A} + 0.279 \cdot \text{INR}$. In multiple regression model, these covariates account for ~51% of the total variance in warfarin response (Figure 6). In the first model developed, the S:R-warfarin ratio at 14 hours accounted for 9.1% of variance in warfarin dose while *VKORC1* polymorphisms at positions 9041 and 3673 explained 21%. Other factors such as age, body-surface-area, *CYP2C9* and INR explained 9.0, 8.6, 2.5 and 1.25%, respectively. In the second model developed, dose adjusted INR on Day 4 explained 31% of variability observed in warfarin doses at Day 14 while genotypic measures (*CYP2C9-VKORC1*) contributed only 6.5%. Contribution of other factors became 9.2% for age and 2.4% for BSA. None of the other factors studied were significantly associated with intersubject variability in warfarin doses.

DISCUSSION

Our study used an innovative approach by combining phenotypic assessments to genotypic determinations of most prevalent *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms. This approach was predicted to represent a preferred strategy to describe the required dose of warfarin in a real clinical setting with heavily medicated patients. The multiple regression analysis equations derived should be the basis for the design of new prospective studies aimed at the prediction of warfarin dose in a similar population of patients.

Studies have demonstrated in healthy volunteers first and then in patients that *CYP2C9* polymorphisms explain part of the inter-subject variability in warfarin clearance. Carriers of *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* variant alleles were shown to exhibit lower clearance of S-warfarin compared to *CYP2C9*1*1* subjects, and consequently, to require lower doses of warfarin. SNPs in *VKORC1* were described and thereafter, strategies that combined determination of both *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes improved significantly the description of warfarin dose requirements in patients. One must realize however that most of these studies had stringent inclusion criteria, not recruiting patients with concomitant drug treatments or limiting the use of drugs interacting with the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. So, in that regard, our study is more widely applicable since no exclusion criteria for concomitant medications were applied; our patients took on average 11 drugs per day.

Our study is also rather unique since we recruited patients at the beginning of their anticoagulation therapy. Moreover, our endpoint measurement was INR observed at a fixed time i.e., 14 days after the start of warfarin treatment. This design differs from that of previous studies that recruited patients receiving constant maintenance warfarin doses for several weeks i.e., when INR was therapeutic (between 2-3). Indeed, we submitted our data to the equation derived from multiple regression analysis (r^2 of 0.60) carried out by Herman et al.²¹ Analysis performed with this model demonstrated that r^2 for our data was only 32%. Similarly, Herman et al. also found an r^2 of 37% when they included patients receiving concomitant treatment with drugs interacting with warfarin metabolism.²² Such observations lead us to propose that conditions imposed from our study design are more appropriate for the establishment of an algorithm to *predict* dose requirements of warfarin in *heavily medicated patients*.

An association between haplotype groups of *VKORC1* and warfarin doses has been reported even though others indicated that this haplotype was no more informative than the use of individual tag SNPs.^{20, 23, 24} In fact, several SNPs used to discriminate between haplotype groups are in strong linkage disequilibrium. Contribution of *VKORC1* SNPs or haplotypes was however greater than that of *CYP2C9* polymorphisms.^{25, 26} In agreement with these studies, we reported that *VKORC1* variations associate with greater inter-individual variation in warfarin doses compared to *CYP2C9* polymorphism.

Three phenotypic strategies were evaluated in our study to determine the metabolic activity of our patients at the beginning of their warfarin therapy. In the first approach, losartan urinary metabolic ratio was used to predict warfarin dose requirements, assuming that this phenotypic measure could estimate warfarin clearance. A high metabolic capacity towards losartan tended to be associated with larger dose requirements for warfarin. Consistent with previous studies, carriers of *CYP2C9**3 alleles also presented with lower metabolic capacity towards losartan.²⁷ However, wide inter-subject variability caused by concomitant drug administration made this approach of low interest. We also realized that a urinary phenotypic approach was very difficult to realize in clinical practice, even in hospitalized patients.

However, a phenotypic approach based on plasma levels of warfarin was much more feasible. Very few samples were missed and less protocol deviations were observed. Plasma levels of R-warfarin, S-warfarin or 7-hydroxy-S-warfarin were not good predictors of warfarin dose requirements. On the other hand, S:R-warfarin ratio at 3, 14 or 24 hours correlated well, as univariate parameters, with *CYP2C9* genotype and warfarin dose requirements. Highest correlation was observed with data obtained at 14 hours following the first dose of warfarin. Ma et al. evaluated the use of S-warfarin AUC, clearance and S:R-warfarin ratio as measures of *CYP2C9* activity.²⁸ They found that a derived two-point equation of S-warfarin concentrations determined at 24 and 48 hours was the most predictive parameter of S-warfarin AUC, a surrogate of *CYP2C9* activity. In contrast, the S:R-warfarin ratio was not predictive of S-warfarin AUC. In agreement with our results, several studies demonstrated that the S:R-warfarin ratio was lower among patients carrying two wild-type allele than those with allelic variants.^{22, 29, 30} Finally, the third approach used a dose adjusted INR determined at Day 4 to predict dose of warfarin corresponding to INR at Day 14. Such an approach would be appealing for its use in «real clinical setting».

Results from our study represent the basis for the development of new prospective studies to predict warfarin dose requirements. Such information shall be key in guiding clinicians toward individualizing drug treatments in the near future. In that sense, warfarin may represent one of the first drugs to be used as a proof of concept for personalized medicine.

CONCLUSION

Our study used an innovative strategy combining genotyping and phenotypic approaches to explain dose requirements of warfarin in heavily medicated patients. We have demonstrated that determination of S:R-warfarin ratio from a single blood sample taken fourteen hours after the first dose of warfarin or dose adjusted INR at Day 4 combined with genotype determination of *VKORC1* G9041A and G3673A, *CYP2C9**2 and *CYP2C9**3 as well as assessment of covariates such as body-surface area and age are key determinants of warfarin dose requirements in our population. Prospective studies using our derived multiple regression models should allow prediction of warfarin dose requirements in a real-world clinical setting.

METHODS

Patients

One hundred and forty three (143) patients in whom anticoagulant therapy with warfarin had to be initiated were recruited at the Montreal Heart Institute, the Quebec Heart Institute (Hôpital Laval), the Maisonneuve-Rosemont Hospital and Haut-Richelieu Hospital; 132 patients completed the study. All patients gave written informed consent. The study protocol was approved by ethic committees of participating hospitals.

Eligibility criteria

Hospitalized patients in whom warfarin therapy had to be initiated for a period of at least 14 days were deemed eligible for the study. No patients were excluded because of concomitant treatment including drugs known to interfere with warfarin pharmacokinetics. However, treatment with these drugs had to remain stable between Day 1 and Day 14. All patients were treated for cardiovascular diseases requiring a target INR value between 2

to 3.5. Patients had to receive their first dose of warfarin between 5 and 8 PM and had to be 18 years old and over.

Study design

This was a prospective cohort study. Clinical monitoring consisted of standard monitoring according to the anticoagulant therapy protocols of the participating hospitals. At entry in the study, a detailed medication history was obtained by a pharmacist to identify all concomitant medications, natural products taken and lifestyle elements that may affect warfarin metabolism and/or effects. Then, two 5 ml blood samples were drawn using Vacutainers® (Becton Dickenson) containing EDTA. These tubes were used for genotype determinations.

Prior to the first dose of warfarin, a single oral dose of 12.5 mg losartan was administered with 200 ml of water. Patients were instructed to empty their bladder and to keep a mid-flow sample. Then, total urine was collected over the next 6 hours. The first dose of warfarin was administered at least 6 hours after the dose of losartan and between 5 and 8 PM. Blood samples (7 ml) for the determination of R- and S-warfarin, and the 7-hydroxy-S-warfarin metabolite were obtained in EDTA containing Vacutainers® (Becton Dickenson) at 3, 14 and 24 hours after administration of warfarin.

During the hospitalization period and up to 14 days after initiation of warfarin therapy, changes in patients' medication, general condition or lifestyle were monitored. Since warfarin effects on INR are apparent only 48h to 72h after intake, dose corresponding to INR at Day 4 and 14 were calculated as the mean daily dose from Day 1-3 and Day 10-12, respectively. Three dose groups were created for analysis of data: low (<2.5mg/day), medium (2.5 to 6.5 mg/day) and high doses (>6.5 mg/day) of warfarin.

Determination of urinary concentrations of losartan and its metabolite

CYP2C9 phenotype of each patient was estimated by measuring the urinary metabolic ratio of losartan to its metabolite (EXP3174) from a total urine sample collected from 0 to 6 hours after the administration of losartan. Levels of losartan and its metabolite were determined by HPLC using a slightly modified assay.³¹

Stereoselective determination of warfarin and 7-hydroxy-warfarin in plasma.

Plasma levels of warfarin enantiomers and of 7-hydroxy-S-warfarin were determined from blood samples obtained at 3, 14 and 24 hours after the first dose of warfarin. An API4000 (Applied Biosystems) tandem mass spectrometer with an Agilent 1100 series HPLC was used for the analysis.

Limit of quantification for these products ranged from 6 to 15 ng/ml.

Determination of *CYP2C9* genotypes

CYP2C9 genotyping was performed by gene chip analysis (BioFilm) using the Autogenomics Infinity system for the following variants: *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2* (rs1799853), *CYP2C9*3* (rs1057910), *CYP2C9*4*, *CYP2C9*5* (rs28371686), *CYP2C9*6* (rs9332131) and *CYP2C9*11*.

Determination of *VKORC1* genotypes

VKORC1 assay was also performed using the Autogenomics Infinity system. Nine allelic variants of *VKORC1* were determined; 861 (rs17880887), 3673 (rs9923231), 5808 (rs2884737), 6009 (rs17708472), 6484 (rs9934438), 6853 (rs8050894), 7566 (rs2359612), 8773 (rs7200749) and 9041 (rs7294). In the present study, the position of SNPs was numbered according to *VKOR* reference sequence (GenBank accession number AY587020).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation or as percentage for continuous or categorical variables, respectively. The selection process was performed by using univariate analysis of each variable. Categorical variables were analyzed using a one-way ANOVA while continuous variables were analyzed based on the Pearson correlation coefficient. Variables whose univariate test had a p-value < 0.20 were candidates for the multivariate model building. At this stage, selection of the variables was performed using two statistical approaches. First, the stepwise and backward selections of variables were used in the multivariate regression model. An alternative procedure to select variables was to use the best subset selection containing three to nine variables. Akaike's and Sawa's Bayesian information criteria were computed to

validate the model selected. For the final model, a robust regression analysis was performed using MM estimation technique. The estimate parameters were similar to ones obtained from the ordinary least squares estimates. Once the model was built, continuous variables were checked for the assumption of linearity. Visual representation (Q-Q plot) of studentized residuals as well as Shapiro-Wilk test for normality were performed to assess the goodness-of-fit of the model. Data were analysed using the statistical package SAS version 9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

ACKNOWLEDGEMENTS

Veronique Michaud is the recipient of a studentship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). The laboratory of Dr Jacques Turgeon is funded by the CIHR, the Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors also like to acknowledge the contribution of Lyne Charbonneau, Constance Bossy, Nathalie Deslauriers, Antonietta Rosati, Mylène Guérin and Nathalie Morin.

REFERENCE LIST

1. Nazario, R., DeLorenzo, L. J., Maguire, G. P., Dobkin, J. & Reichel, J. Treatment of venous thromboembolism. *Heart Dis* 2, 438-45 (2000).
2. Abdelhafiz, A. H. A review of anticoagulation with warfarin in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Clin Ther* 23, 1628-36 (2001).
3. Aithal, G. P., Day, C. P., Kesteven, P. J. & Daly, A. K. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 353, 717-9 (1999).
4. Taube, J., Halsall, D. & Baglin, T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 96, 1816-9 (2000).
5. Takahashi, H. & Echizen, H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 40, 587-603 (2001).
6. Fasco, M. J. & Principe, L. M. R- and S-Warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reductase activities in the rat. *J Biol Chem* 257, 4894-901 (1982).
7. Wingard, L. B., Jr., O'Reilly, R. A. & Levy, G. Pharmacokinetics of warfarin enantiomers: a search for intrasubject correlations. *Clin Pharmacol Ther* 23, 212-7 (1978).
8. Chan, E. et al. Disposition of warfarin enantiomers and metabolites in patients during multiple dosing with rac-warfarin. *Br J Clin Pharmacol* 37, 563-9 (1994).
9. James, A. H., Britt, R. P., Raskino, C. L. & Thompson, S. G. Factors affecting the maintenance dose of warfarin. *J Clin Pathol* 45, 704-6 (1992).
10. Voora, D., McLeod, H. L., Eby, C. & Gage, B. F. Use of pharmacogenetics to guide warfarin therapy. *Drugs Today (Barc)* 40, 247-57 (2004).
11. Wienkers, L. C. et al. Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19. *Drug Metab Dispos* 24, 610-4 (1996).
12. Yamazaki, H. & Shimada, T. Human liver cytochrome P450 enzymes involved in the 7-hydroxylation of R- and S-warfarin enantiomers. *Biochem Pharmacol* 54, 1195-203 (1997).
13. Kaminsky, L. S. & Zhang, Z. Y. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* 73, 67-74 (1997).

14. Sullivan-Klose, T. H. et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 6, 341-9 (1996).
15. Ieiri, I. et al. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Ther Drug Monit* 22, 237-44 (2000).
16. Dickmann, L. J. et al. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol* 60, 382-7 (2001).
17. Kidd, R. S. et al. Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics* 11, 803-8 (2001).
18. Tai, G. et al. In-vitro and in-vivo effects of the CYP2C9*11 polymorphism on warfarin metabolism and dose. *Pharmacogenet Genomics* 15, 475-81 (2005).
19. Lee, C. R., Goldstein, J. A. & Pieper, J. A. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 12, 251-63 (2002).
20. Rieder, M. J. et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 352, 2285-93 (2005).
21. Herman, D., Peternel, P., Stegnar, M., Breskvar, K. & Dolzan, V. The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement. *Thromb Haemost* 95, 782-7 (2006).
22. Herman, D. et al. Influence of CYP2C9 polymorphisms, demographic factors and concomitant drug therapy on warfarin metabolism and maintenance dose. *Pharmacogenomics J* 5, 193-202 (2005).
23. Takahashi, H. et al. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. *Pharmacogenet Genomics* 16, 101-10 (2006).
24. D'Andrea, G. et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 105, 645-9 (2005).

25. Bodin, L. et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 106, 135-40 (2005).
26. Veenstra, D. L. et al. Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics* 15, 687-91 (2005).
27. Sekino, K. et al. Effect of the single CYP2C9*3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 59, 589-92 (2003).
28. Ma, J. D. et al. Limited sampling strategy of S-warfarin concentrations, but not warfarin S/R ratios, accurately predicts S-warfarin AUC during baseline and inhibition in CYP2C9 extensive metabolizers. *J Clin Pharmacol* 44, 570-6 (2004).
29. Kamali, F. et al. Contribution of age, body size, and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 75, 204-12 (2004).
30. Scordo, M. G. et al. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther* 72, 702-10 (2002).
31. Soldner, A., Spahn-Langguth, H. & Mutschler, E. HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT1 antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of humans and rats. *J Pharm Biomed Anal* 16, 863-73 (1998).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Relationship between urinary metabolic ratio of losartan and warfarin dose. A) Losartan urinary metabolic ratios are reported according to warfarin dosing groups. B) Warfarin dose is reported according to low, intermediate and extensive metabolizer phenotypes. Box and whisker plots are illustrated: the horizontal line indicates the median.

Figure 2: Relationship between S:R-warfarin ratio at 14h and warfarin dose. A) S:R-warfarin ratios are reported according to warfarin dosing groups. B) Warfarin dose is reported according to low, intermediate and extensive metabolizer phenotypes. Box and whisker plots are illustrated: the horizontal line indicates the median.

Figure 3: Relationship between the INR (Day 4) over mean dose of warfarin (Day 1-3) ratio and warfarin dose. A) INR (Day 4)/ mean dose of warfarin (Day 1-3) ratios are reported according to warfarin dosing groups. B) Warfarin dose is reported according to low, intermediate and intensive metabolizer phenotypes. Box and whisker plots are illustrated: the horizontal line indicates the median.

Figure 4: Warfarin dose requirements according to CYP2C9 genotypes. Box and whisker plot of warfarin doses. The horizontal line indicates the median.

Figure 5: Relationship between *VKORC1* at positions A) 3673, B) 6484, C) 9041 and *CYP2C9* genetic polymorphisms with warfarin dose requirements. Box and whisker plot of mean warfarin doses. The horizontal line indicates the median.

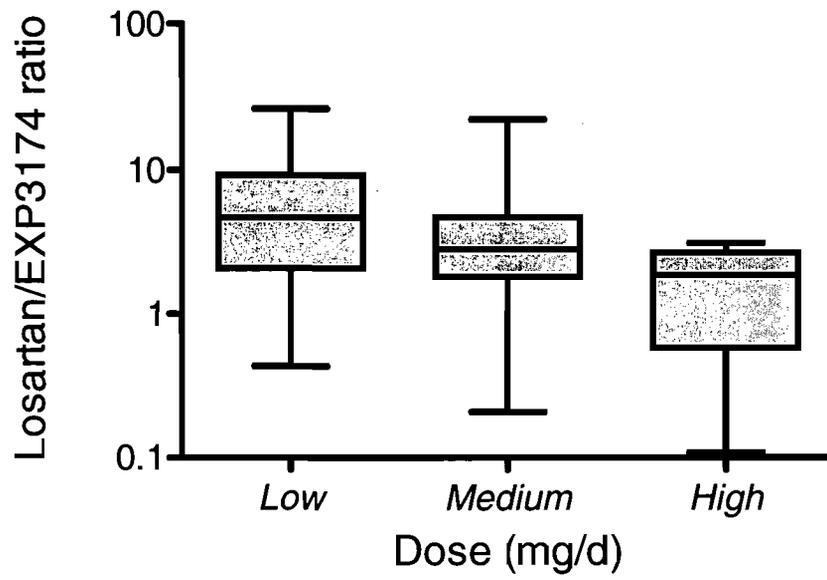
Figure 6: A) Relationship between losartan urinary metabolic ratio and *CYP2C9*. Box and whisker plot of urinary metabolic ratio of losartan. The horizontal line indicates the median. B) Relationship between S:R-warfarin ratio and *CYP2C9*. Box and whisker plot of S:R-warfarin ratio (14h). The horizontal line indicates the median. C) Relationship between INR (Day 4)/ mean dose of warfarin (Day 1-3) ratio

and *CYP2C9*. Box and whisker plot of INR (Day 4)/ mean dose of warfarin (Day 1-3) ratio. The horizontal line indicates the median.

Figure 7: Multiple linear regression model for the prediction of warfarin dose. A) Multivariate model based on S:R-warfarin ratio as a phenotypic measure and B) Multivariate model based on the INR (Day 4)/ mean dose of warfarin (Day 1-3) ratio as a phenotypic measure.

FIGURE 1

A)



B)

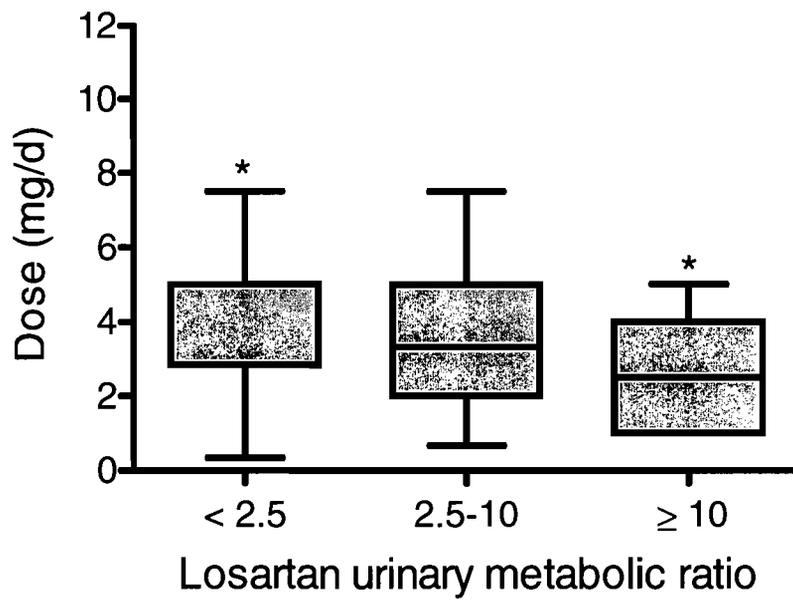
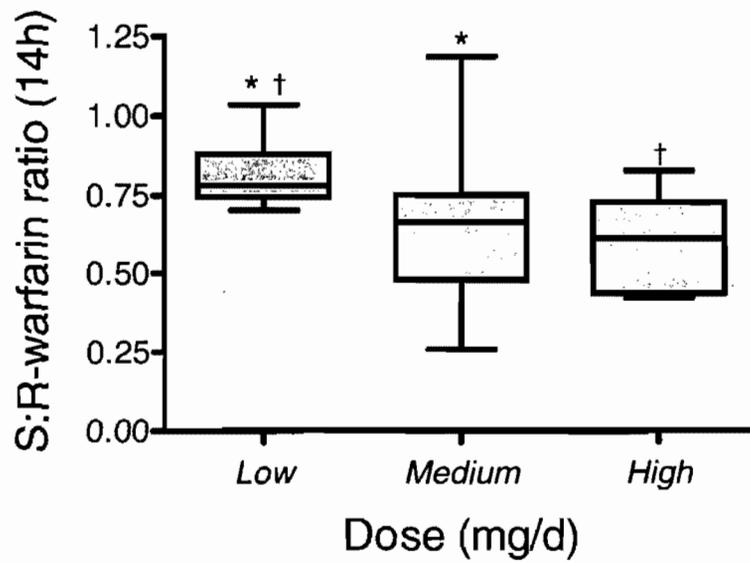
* $p < 0.05$

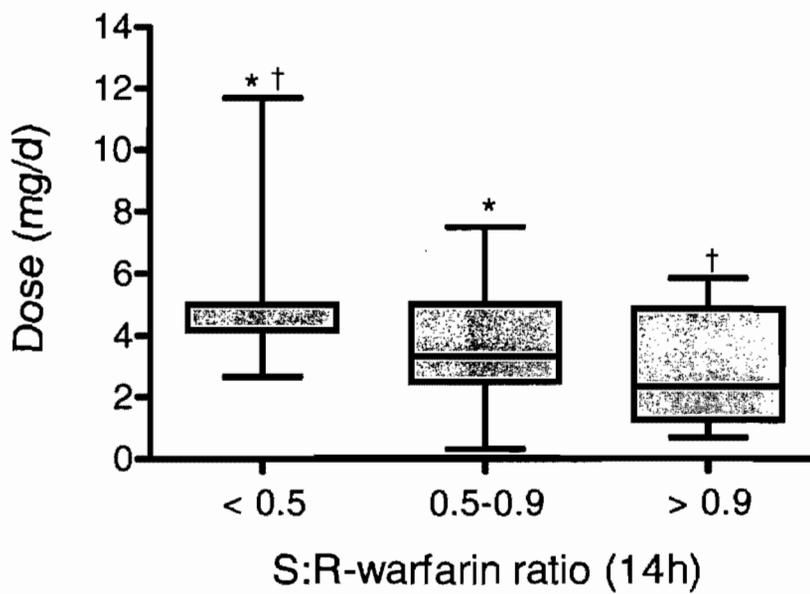
FIGURE 2

A)



* $p < 0.01$ and † $p < 0.05$

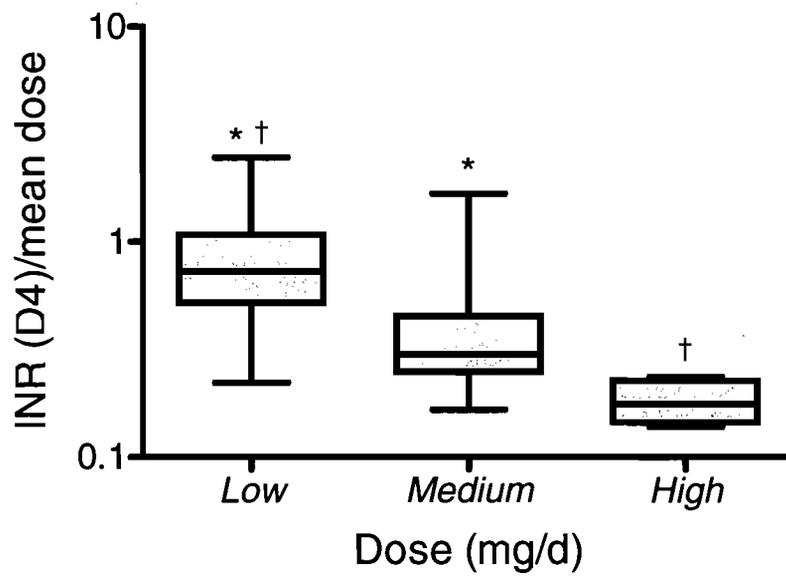
B)



* † $p < 0.05$

FIGURE 3

A)

* † $p < 0.01$

B)

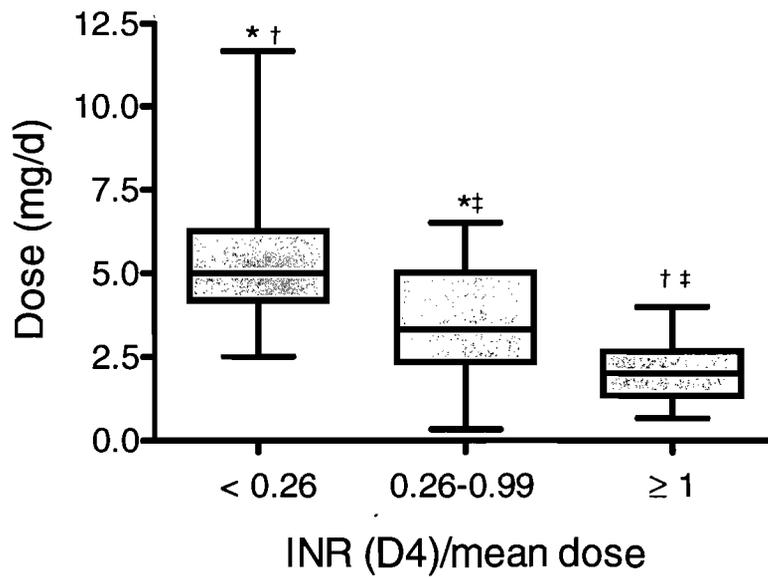
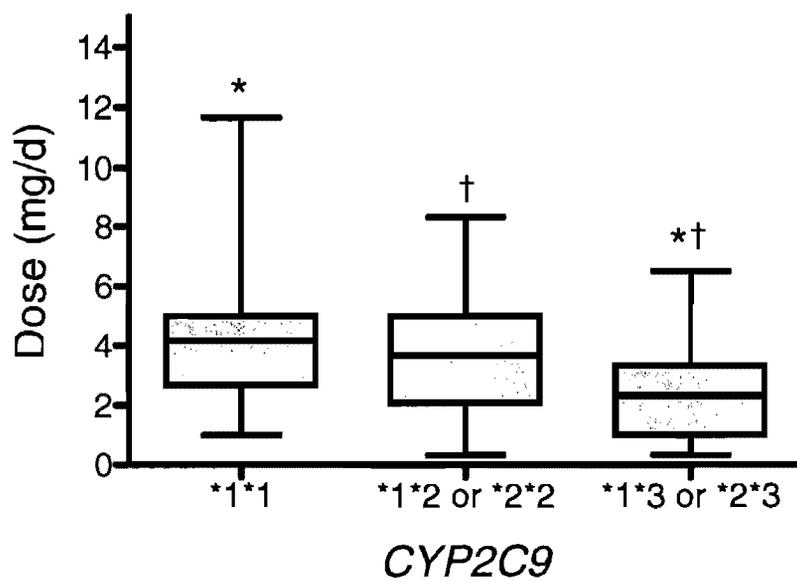
* † † $p < 0.01$

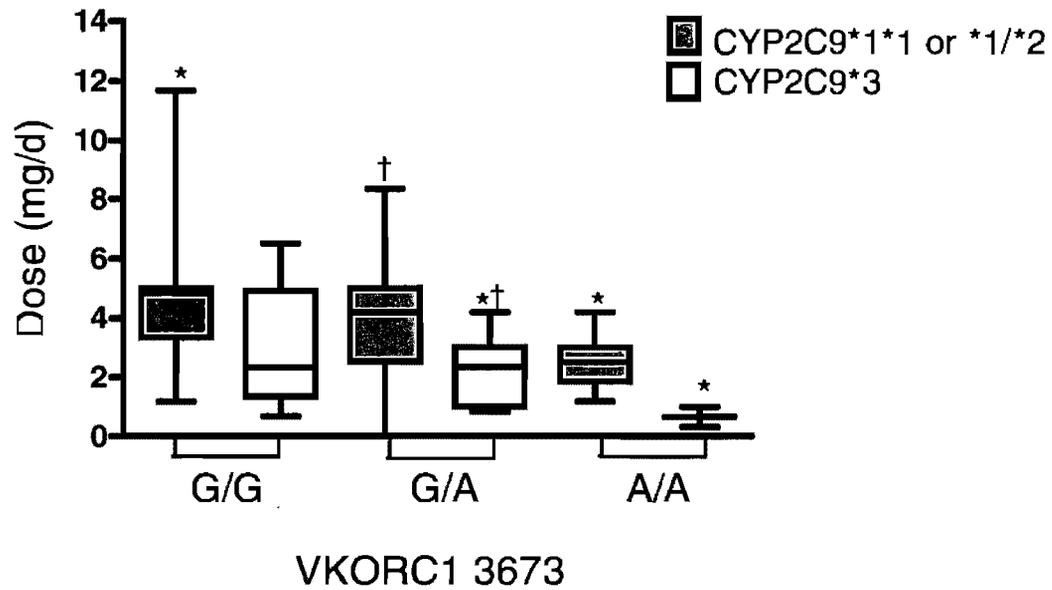
FIGURE 4



* $p < 0.001$ and † $p < 0.05$

FIGURE 5

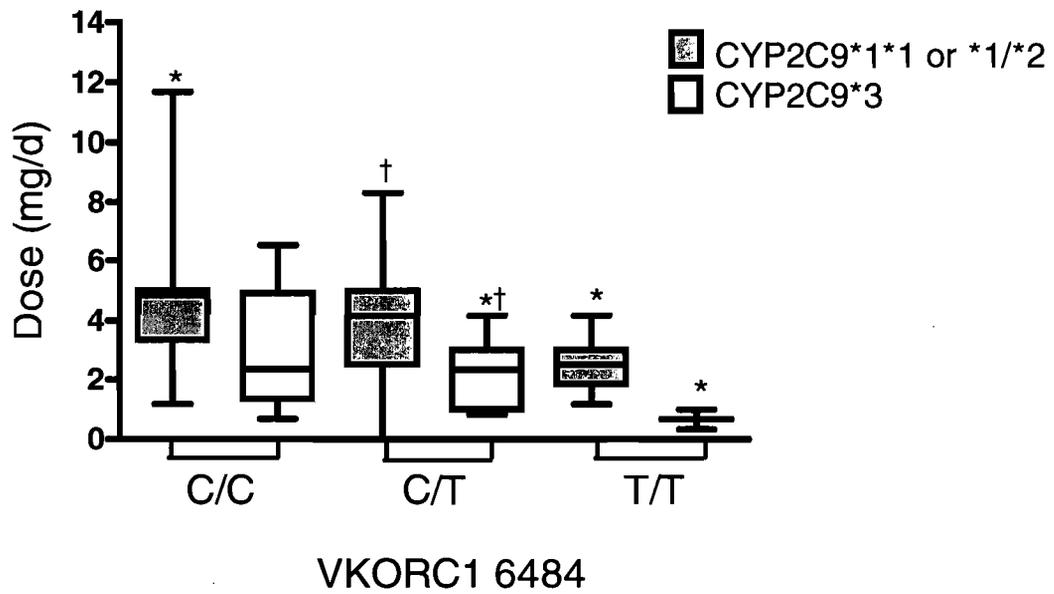
A)



* Dose of warfarin required in patients with a VKORC1 3673 G/G genotype combined to a CYP2C9*1 allele is significantly different ($p < 0.05$) from other groups indicated with a star (*).

† indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) between CYP2C9*1 and CYP2C9*3 groups among subjects with a VKORC1 3673 G/A genotype.

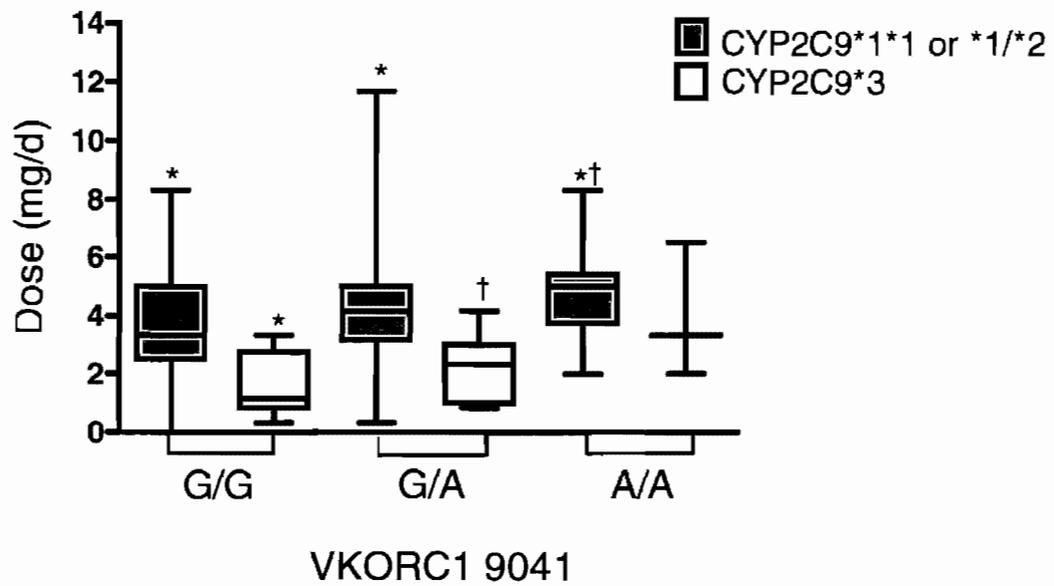
B)



* Dose of warfarin required in patients with a VKORC1 6484 C/C genotype combined to a CYP2C9*1 allele is significantly different ($p < 0.05$) from other groups indicated with a star (*).

† indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) between CYP2C9*1 and CYP2C9*3 groups among subjects with a VKORC1 6484 C/T genotype.

c)

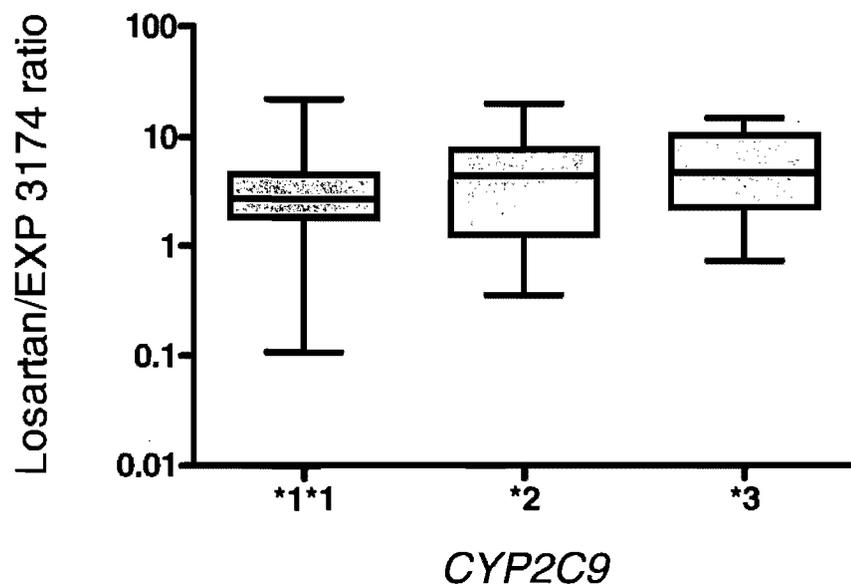


* Dose of warfarin required in patients with a VKORC1 9041 G/G genotype combined to a CYP2C9*3 allele is significantly different ($p < 0.05$) from other groups indicated with a star (*).

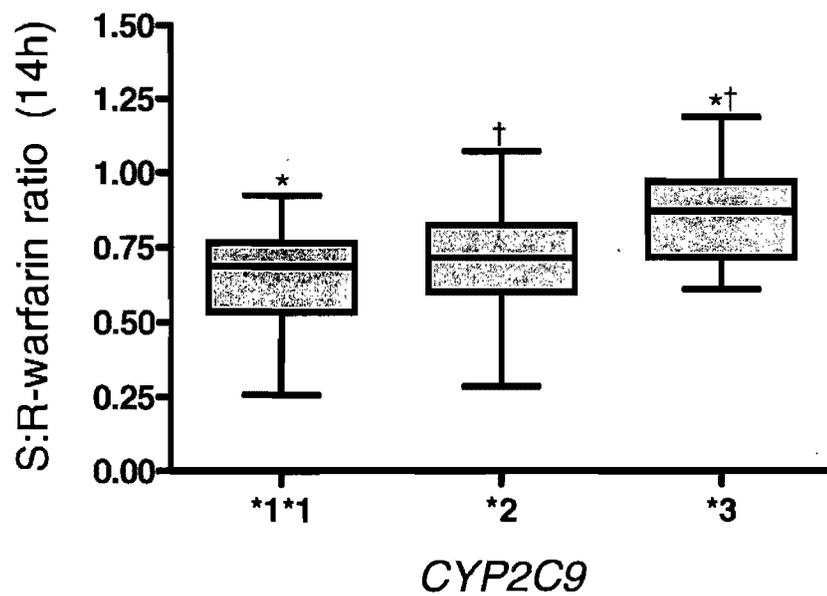
† indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) between patients with VKORC1 9041 G/A genotype combined to a CYP2C9*3 allele and patients with a VKORC1 9041 A/A genotype combined to a CYP2C9*1 allele.

FIGURE 6

A)

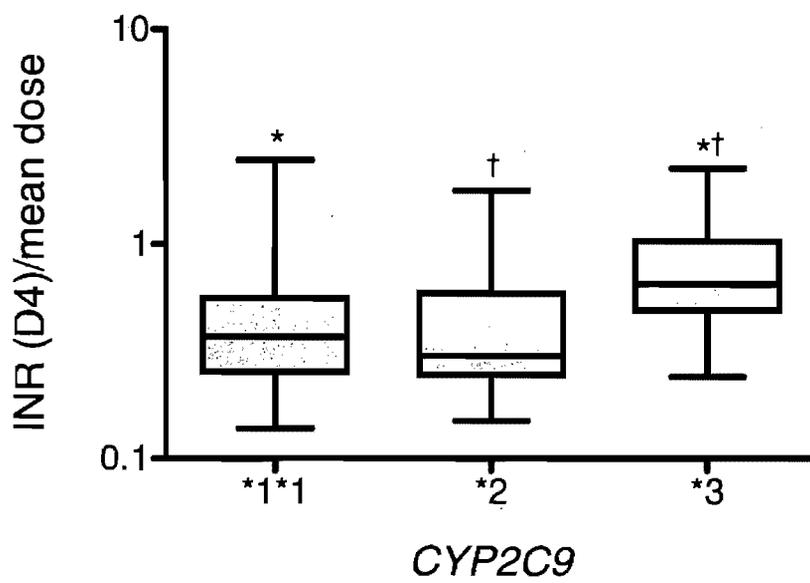


B)



* $p < 0.001$ and † $p < 0.05$

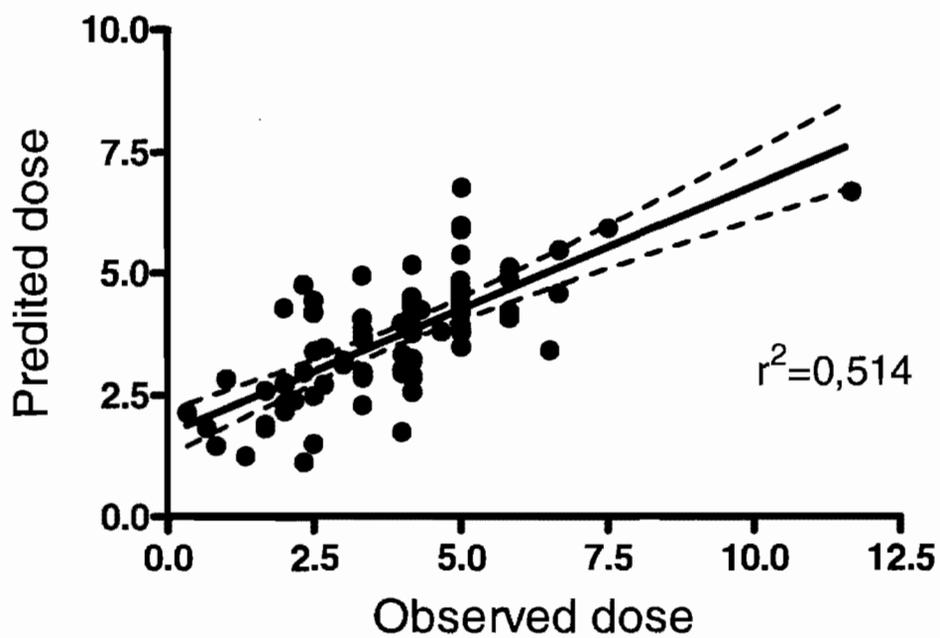
c)



*† $p < 0.05$

FIGURE 7

A)



B)

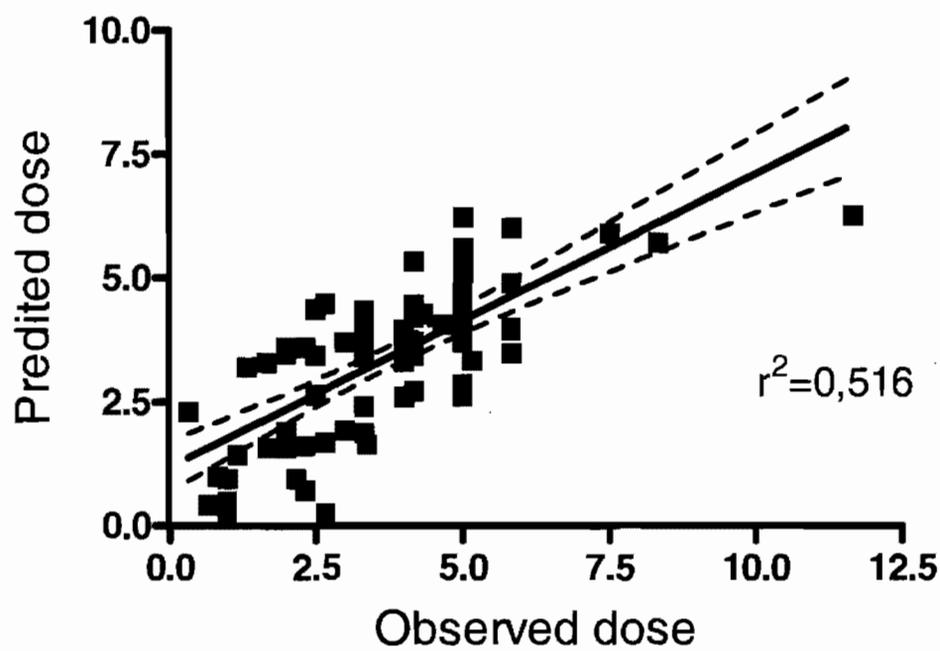


TABLE I

Characteristics of patients included in our study.

<i>Demographic data</i>	<i>Cohort n=132</i>
Gender (male:female)	75:57
Age (years)	61.8 ±13.0*
Weight (kg)	78.2 ±20.1*
Height (m)	1.66 ±0.09*
INR at Day 14	
% of patients in therapeutic INR range	53.8%
Mean INR	2.65 ±1.09*
Ethnicity	
Caucasian	131
Black	0
Asian	0
Other	1
Indication for warfarin therapy	
Atrial fibrillation	67
Mechanical heart valve	44
Deep venous thrombosis	3
Stroke/ Transient ischemic attack	6
Heart failure/Cardiomyopathy	4
Pulmonary embolism	3
Other	6
Concomitant drugs per day	11.1 ±4.2*

*Mean ±SD

TABLE IIA) Allele frequencies for *CYP2C9*

SNP	Allele %
<i>CYP2C9*1</i>	79.3
<i>CYP2C9*2</i>	13.3
<i>CYP2C9*3</i>	7.4
<i>CYP2C9*4</i>	0
<i>CYP2C9*5</i>	0
<i>CYP2C9*6</i>	0
<i>CYP2C9*11</i>	0

B) Genotype frequencies for *CYP2C9*

Genotype	<i>CYP2C9*1*1</i>	<i>CYP2C9*1*2</i>	<i>CYP2C9*1*3</i>	<i>CYP2C9*M*M</i>
%	61.7	21.9	13.3	3.1

TABLE IIIA) Allele frequencies for *VKORC1*

SNP	Wild-type allele %	Variant allele %
<i>861 (C>A)</i>	67.1	32.9
<i>3673 (G>A)</i>	61.5	38.5
<i>5808 (T>G)</i>	77.0	23.0
<i>6009 (C>T)</i>	75.4	24.6
<i>6484 (C>T)</i>	61.5	38.5
<i>6853(C>G)</i>	60.3	39.7
<i>7566 (C>T)</i>	61.9	38.1
<i>8773 (C>T)</i>	99.6	0.4
<i>9041 (G>A)</i>	64.7	35.3

(TABLE III)B) Genotype frequencies for *VKORC1*

SNP	W-W %	W-M %	M-M %
<i>861 (C>A)</i>	47.6	38.9	13.5
<i>3673 (G>A)</i>	34.9	53.2	11.9
<i>5808 (T>G)</i>	59.5	34.9	5.6
<i>6009 (C>T)</i>	57.1	36.5	6.3
<i>6484 (C>T)</i>	34.9	53.2	11.9
<i>6853(C>G)</i>	32.5	55.6	11.9
<i>7566 (C>T)</i>	35.4	52.4	11.9
<i>8773 (C>T)</i>	99.2	0.8	0
<i>9041 (G>A)</i>	42.1	45.2	12.7

TABLE IV

Association between genetic polymorphisms of *VKORC1* and warfarin dose requirements.

<i>VKORC1</i> SNPs	2 WILD-TYPE ALLELES	1 VARIANT ALLELE	2 VARIANT ALLELES
861 (C>A)	3.6 ±1.9	4.1 ±1.6	3.8 ±2.4
3673 (G>A)	4.5 ±2.3 [†]	3.7 ±1.0 *	2.3 ±1.1
5808 (T>G)	4.0 ±2.2 *	3.9 ±1.0 *	2.0 ±0.9
6009 (C>T)	3.6 ±1.7	4.3 ±1.2	3.3 ±1.4
6484 (C>T)	4.5 ±2.3 [†]	3.7 ±1.1*	2.3 ±1.0
6853(C>G)	4.4 ±2.3 [†]	3.8 ±1.1 *	2.3 ±1.1
7566 (C>T)	4.5 ±2.2 [†]	3.7 ±1.1 *	2.3 ±1.1
8773 (C>T)	3.8 ±2.0	5.8	
9041 (G>A)	3.4 ±1.8 [†]	3.9 ±0.9	4.7 ±1.8 [†]

*significantly different ($p < 0.05$) from the group with 2 variant alleles.

[†] significantly different ($p < 0.001$) from the group with 2 variant alleles.

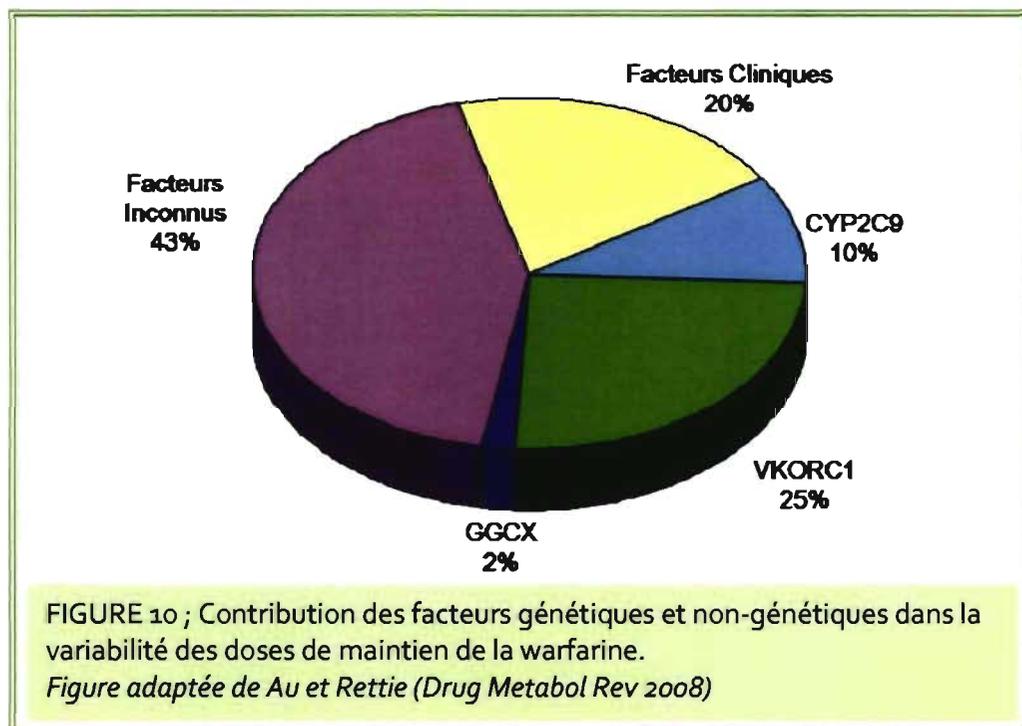
TABLE V

P-values and multiple r^2 values for SNPs associated with *CYP2C9* and *VKORC1*.

Variables	RSQ	p-value
<i>CYP2C9</i>		
<i>CYP2C9*2</i>	0.02	0.20
<i>CYP2C9*3</i>	0.09	0.001
<i>VKORC1</i>		
861 (C>A)	0.001	0.97
3673 (G>A)	0.07	0.03
5808 (T>G)	0.001	0.93
6009 (C>T)	0.017	0.46
6484 (C>T)	0.07	0.03
6853 (C>G)	0.05	0.10
7566 (C>T)	0.07	0.03
9041 (G>A)	0.05	0.09

vi) DISCUSSION

La pharmacogénétique liée à la réponse à la warfarine est caractérisée par une pharmacogénétique dite polygénique. De fait, il y aurait environ 30 gènes qui interviendraient dans tout le processus pharmacologique de la warfarine (incluant le métabolisme, le transport et les effets pharmacologiques).⁵²⁹ Tel que montré par différentes études, les différences pharmacogénétiques dans la réponse à la warfarine constituent un groupe de facteurs importants à considérer pour la prédiction de la dose à la warfarine. La figure 10 représente les contributions relatives de divers facteurs tant génétiques que non-génétiques impliqués dans la



variabilité de la réponse à la warfarine chez des patients caucasiens. Ainsi, l'âge, le sexe, l'index de masse corporel et les interactions expliqueraient ~20% de la variabilité.⁵³⁰ Tandis que les génotypes *VKORC1*, *CYP2C9* et *GGCX* expliqueraient ~25%, 10% et 2%, respectivement, de la variabilité dans la dose de warfarine.^{506, 518, 520} Malgré le nombre impressionnant d'analyses dans ce domaine, il n'en demeure pas moins que plus de 40% des causes de la variabilité demeurent inconnues.

De nombreux groupes de recherche et cela, à travers le monde, ont développé et proposé des algorithmes incluant la pharmacogénétique en plus des facteurs cliniques afin de prédire la dose de warfarine. Par exemple, le groupe de

Schalekamp ont trouvé que l'âge, les génotypes de CYP2C9 et de VKORC1 expliquaient 13%, 5% et 21%, respectivement, de la variabilité dans la dose moyenne quotidienne chez des patients stabilisés sous acenocoumarol et ne prenant aucun médicament pouvant interagir avec leur anticoagulant.⁵¹³ La combinaison des différentes variables a permis de dériver un modèle de régression décrivant 39% de la variabilité dans la dose d'anticoagulant.⁵¹³ La contribution des covariables étudiées par Schalekamp *et al.* est comparable à celle obtenue dans notre modèle utilisant le ratio de warfarine plasmatique comme mesure phénotypique. L'algorithme développé par le groupe d'Aquilante bien qu'il soit beaucoup plus complet et complexe (comprenant ; les génotypes de VKORC1 et de CYP2C9, le poids, l'âge, le tabagisme, la présence d'inducteurs et d'inhibiteurs de CYP2C9, l'apport en vitamine K et une mutation sur le facteur VII de coagulation) explique 51% de la variabilité de la dose de warfarine.⁵³¹ Cette étude malgré qu'elle ait émis différents critères d'exclusion quant à la médication, présentait une cohorte de patients avec des interactions médicamenteuses potentielles. Il n'y avait aucune pondération, c'est-à-dire que le modèle évalue la présence ou l'absence (soit 0 ou 1) d'interactions potentielles pour une liste restreinte de médicaments prédéterminés ce qui est moins précis que le recours à un phénotype.⁵³¹

Notre étude montre que la contribution du génotype du CYP2C9 comme facteur de variabilité dans la dose de warfarine apparaît moindre que celle du génotype de VKORC1. Cette observation est également en accord avec plusieurs études qui ont démontré que l'impact du CYP2C9 dans la réponse aux anticoagulants est plus faible comparativement à celle de VKORC1.^{506, 508, 512, 514, 532}

Sconce *et al.* ont développé un algorithme basé sur ~300 patients caucasiens qui recevaient une dose stable de warfarine et qui présentaient un INR stable et thérapeutique.⁵³³ Ces auteurs ont montré que l'incorporation des covariables telles que l'âge, la taille, le CYP2C9 (*CYP2C9*2* et **3*) et le génotype *VKORC1* pour le SNP -1639 (ou 3673) permettaient d'obtenir le meilleur estimateur de la dose de warfarine, soit 54% de la variabilité de la dose est expliquée par leur modèle.⁵³³ Tout comme pour l'étude de Bodin, il a été observé que les variants de *VKORC1* aux positions -1639 (3673) et 1173 (6484) étaient très étroitement liés.^{512, 533} Bodin *et al.* ont montré que le génotype de *VKORC1* expliquait 37% de la variabilité de la dose d'acenocoumarol chez des volontaires sains.⁵¹² Ils ont aussi étudié l'effet des différents haplotypes de *VKORC1* et ont observé que la variabilité pouvait être expliquée directement par les polymorphismes *VKORC1* -1639 (3673) ou 1173

(6484).⁵¹² Ceci est en accord avec les données obtenues avec l'étude de Sconce *et al.*, de même qu'avec notre étude. De fait, lors de nos analyses univariées et multivariées, il a été observé que ces deux SNPs étaient équivalents.

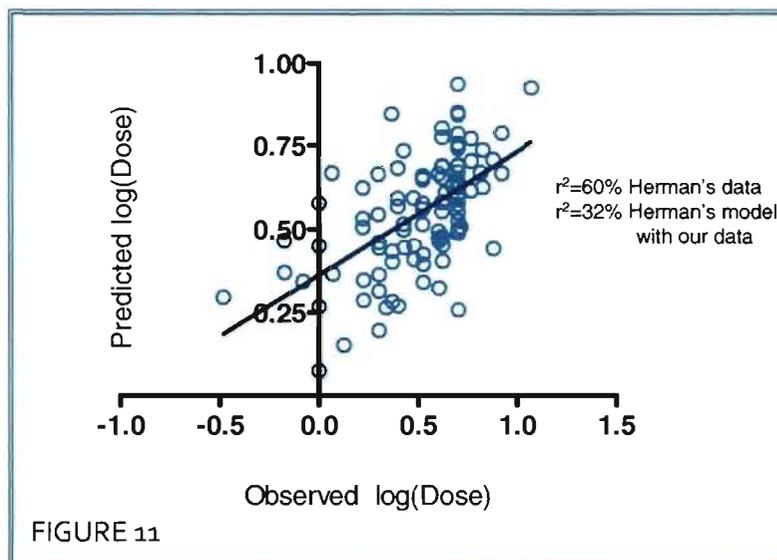
Le tableau I présente un résumé (bien que non-exhaustif) de plusieurs modèles proposés pour déterminer la contribution de différents facteurs dans la variabilité de la réponse à la warfarine et conséquemment, proposer un modèle visant à mieux prédire la dose à administrer. En accord avec ces différentes études, certaines covariables sont également retrouvées dans nos modèles telles que l'âge, le BSA et les génotypes pour CYP2C9 et VKORC1. De plus, ce qui distingue notre étude de celles présentées dans ce tableau, est que nous avons inclus tous les médicaments co-prescrits avec la warfarine alors que les études jusqu'ici publiées, excluent ou limitent la médication co-administrée chez leurs patients. Ceci peut expliquer en partie la raison pour laquelle dans notre étude, le génotype pour CYP2C9 explique un si faible pourcentage de variabilité dans la réponse à la warfarine. En fait, chez les individus avec un génotype «génétiquement normal» (*CYP2C9*1*1*) différents facteurs peuvent affecter l'activité de l'enzyme comme la présence d'interactions médicamenteuses. Ainsi, les résultats d'études qui avaient comme critères d'exclusion la coadministration de médicaments diminuaient par le fait même la variabilité et surestimaient le rôle du génotype *CYP2C9*. De plus, l'ajout d'une mesure phénotypique prend aussi en compte l'effet du génotype.

TABLEAU I. Résumé de diverses études et les principales covariables incluses dans leur algorithme pharmacogénétique proposé pour estimer la dose de warfarine.

ÉTUDES	COVARIABLES					R ² %
	AGE	SEXE/ POIDS/ TAILLE/ BSA	CYP2C9	VKORC1	Rx	
<i>Sconce et al. Blood 2005</i>	✓	Taille	✓	✓ (3673)	Non	54
<i>Wadelius et al. Pharmacogenom J 2005</i>	✓	Poids	✓	✓	Limité	56
<i>D'Andrea et al. Blood 2005</i>	✓	Sexe	✓	✓ (1173,9041)	Rx	35
<i>Voorra et al. Thromb Haemost 2005</i>	✓	BSA, Sexe	✓	-	Limité	42
<i>Herman et al.^a Pharmacogenom J 2005</i>	✓	Poids	✓	-	Limité	37
<i>Herman et al.^b Thromb Haemost 2006</i>	✓	BSA	✓	✓ (9041,6484)	Non	60
<i>Takahashi et al. PharmacogGenom 2006</i>	✓	Poids	✓	✓	Limité	57
<i>Schalekamp et al. CPT 2006</i>	✓	-	✓	✓ (6484)	Non	39
<i>Aquilante et al.^a CPT 2006</i>	✓	-	✓	✓ (3673)	Limité	51
<i>Carlquist et al. JthrombThrombolysis 2006</i>	✓	Sexe, Poids	✓	✓ (1173)	?	45
<i>Miao et al. EurJClinPharmacol 2007</i>	✓	Poids	✓	✓ (3673)	Non	63
<i>Kimura et al. Thrombosis Res 2007</i>	✓	Sexe, Poids	✓	✓ (1173,9041)	?	33
<i>Michaud et al. CPT 2008</i>	✓	BSA	✓	✓ (3673,9041)	✓	54

De plus, on peut remarquer que notre étude se compare à d'autres études si l'on compare les coefficients de corrélation. Toutefois, il est intéressant de constater que si l'on applique les données de notre étude dans le modèle d'Herman *et al.* qui est le meilleur modèle présenté selon le coefficient de corrélation rapporté, la prédiction du modèle chute drastiquement. En effet, la corrélation qui est de 60% dans le

modèle publié par Herman diminue à 32% lorsque l'on tente de l'appliquer aux données des patients de notre étude tel que montré par la figure suivante (Figure 11). Ceci est un bel



exemple des limites des modèles à des populations qui sont plus ou moins représentatives de la clinique réelle.

Le choix des temps de prélèvements plasmatiques pour la warfarine au jour 0 (jour de l'initiation du traitement) est basé, entre autres, sur une étude qui a déterminé la clairance à la warfarine et de ses énantiomères à l'aide d'un AUC complet ou d'un point, soit un seul prélèvement à 6, 15 et 20 heures post-dose.⁵³⁴ Leurs résultats suggèrent qu'un échantillon plasmatique prélevé à 12 ± 2 heures post-dose est un bon estimateur (à $\pm 1-6\%$) de la concentration moyenne obtenue avec le calcul de l'AUC complet.⁵³⁴ D'ailleurs, plusieurs temps de prélèvements ont été évalués (3, 14 et 24 heures) lors de nos analyses et le ratio des concentrations plasmatiques prélevées à 14 heures semblait aussi représenter le temps de prélèvement optimal. Le modèle proposé par l'étude de Loebstein et collaborateurs rapporte que les concentrations plasmatiques de warfarine expliquent 26% de la variabilité de la dose alors que dans notre modèle le phénotype de S-/R-warfarine contribue pour 9.1 % de la variabilité dans la dose de warfarine.⁴⁶⁹

Il y a de nombreuses études qui tentent d'élucider la contribution des variables pharmacogénétiques dans la variabilité de la dose à la warfarine avec l'objectif de

mieux cibler la dose de warfarine lors de l'initiation du traitement. Il faut noter que la majorité des études, à l'exception de Wadelius *et al.* et de notre étude, ont utilisé une cohorte de patients prenant des doses de maintien stables et ayant un INR dans l'intervalle thérapeutique. Des études prospectives sont nécessaires afin d'évaluer l'impact et les retombées cliniques de tests pharmacogénétiques sur les «outcomes» cliniques comme les saignements, les hémorragies et les thromboembolies secondaires à une sur- ou sous-anticoagulation. Depuis août 2007, la FDA a émis un communiqué lequel recommande ou du moins encourage fortement les praticiens à effectuer des tests pharmacogénétiques pour les patients chez qui une thérapie à la warfarine est amorcée. L'algorithme proposé par la FDA repose sur les facteurs suivants ; les SNPs *CYP2C9* (*2, *3), *VKORC1* (-1639/3673), l'âge, le BSA, l'ethnie, le tabagisme, l'amiodarone, l'INR cible et l'indication pour l'anticoagulothérapie. Ce modèle explique 53% de la dose à la warfarine, ce qui représente en général un bon modèle comparable aux données connues et publiées. Malheureusement, l'algorithme proposé par la FDA a été réalisé à partir d'études qui pour la plupart excluaient les patients prenant des médicaments connus pour affecter le métabolisme de la warfarine ou sinon acceptaient et stratifiaient pour un nombre très limité de médicaments (souvent pour l'amiodarone, la carbamazépine et la simvastatine). Par conséquent, on peut présumer de la faiblesse de leur modèle auprès d'une clientèle recevant souvent plusieurs médicaments.

En 2008, une étude a évalué le potentiel d'interaction entre la warfarine et les médicaments co-prescrits.⁵³⁵ Snaith *et al.* ont déterminé dans la population écossaise qu'environ 68% des patients prenant de la warfarine recevaient également au moins un médicament avec un potentiel d'interaction avec celle-ci, et 24% des patients présentaient des interactions possibles avec la warfarine avec 3 médicaments et plus.⁵³⁵ Parmi les prescriptions avec un potentiel d'interactions médicamenteuses, 28% de ces prescriptions étaient pour une utilisation à court terme alors que 59% faisaient référence à des prescriptions dites régulières (à répétition). Wittkowsky *et al.* ont rapporté à partir d'un échantillon de patients américains traités avec la warfarine que 81,6% de ceux-ci recevaient aussi au moins un médicament qui potentiellement pouvait causer une interaction avec l'anticoagulant.⁵³⁶ Un autre point à souligner est que les interactions médicamenteuses et les saignements liés à l'anticoagulothérapie surviennent davantage chez les personnes âgées et les patients recevant une polypharmacie.⁵³⁷ Étant donné que les patients prenant de la warfarine sont généralement âgés de

plus de 60 ans et qu'ils reçoivent en concomitance souvent plusieurs médicaments, il y a donc un intérêt majeur à considérer le profil pharmacologique des patients dans les modèles de prédiction des doses de warfarine. Une étude rapporte que 12% des femmes âgées de 65 ans et plus prennent en moyenne plus de neuf médicaments.⁵³⁸ Notre étude se démarque sur ce point puisque qu'aucun patient n'a été exclu en raison de sa co-comédication. L'avantage de la mesure phénotypique est qu'elle permet d'obtenir un reflet global de la capacité à éliminer la warfarine sans avoir à inclure et à élaborer une longue liste de tous les médicaments et facteurs potentiels pouvant affecter le métabolisme et leur attribuer à chacun un certain poids.

En conclusion, nous avons développé un algorithme dont la portée s'étend aux patients polymédicamentés qui trop souvent sont exclus des études. Il faut souligner que les algorithmes tentant de prédire la variabilité dans la réponse (la dose) de warfarine sont entre autres élaborés pour les patients qui en clinique posent souvent problèmes. Notre étude a montré que l'addition d'une mesure phénotypique améliore significativement notre modèle. Il faut toutefois mentionner que des études prospectives évaluant la validité clinique de notre algorithme ainsi que les retombées cliniques sont requises avant d'émettre toute recommandation ou d'encourager son application en clinique.

SECTION 3; CONCLUSION

3. CONCLUSION GÉNÉRALE

Les causes potentielles de variabilité dans la réponse aux médicaments incluent les facteurs extrinsèques comme la prise concomitante de médicaments ainsi que les facteurs intrinsèques comme le sexe, l'âge, l'ethnie et les différences génétiques des enzymes responsables du métabolisme ou du transport des médicaments. Les travaux réalisés au cours de mon doctorat ont permis une intégration de ces différents concepts dans une perspective mécanistique afin de mieux comprendre la variabilité dans la réponse aux médicaments. Ceci fut accompli à l'aide d'études de nature fondamentale et clinique afin d'évaluer concrètement chez le patient, la variabilité réelle dans un but de fournir des outils pour améliorer les soins aux patients.

Le premier volet de mes travaux de recherche présentés dans cette thèse portait sur la caractérisation du métabolisme par les CYP3As de la dompéridone en utilisant le midazolam comme substrat de référence. Malgré que les CYP3A4 et CYP3A5 présentent un chevauchement important dans les substrats qu'ils métabolisent, ces deux isoenzymes ont montré des cinétiques de formation particulière et/ou préférentielle avec la dompéridone et le midazolam. Effectivement, nos résultats ont montré que la clairance intrinsèque de la dompéridone par le rCYP3A4 est supérieure (10-fois) à celle du rCYP3A5. À l'inverse, les valeurs de clairance intrinsèque des métabolites 1- et 4-hydroxymidazolam par le rCYP3A5 sont légèrement plus élevées que celle du rCYP3A4. De plus, des cinétiques non-conventionnelles dites atypiques ont été observées. Nous avons également observé que l'ajout de cytochrome b5 dans le milieu d'incubation améliorerait l'activité catalytique des deux isoformes CYP3As et cela, pour les deux substrats évalués (dompéridone et midazolam). Ces travaux de recherche sont en accord avec la littérature qui supporte le rôle effecteur du cytochrome b5. De plus, nos résultats ont montré que l'ampleur de l'effet du cytochrome b5 varie selon l'isoenzyme et les substrats en présence, mais qu'il peut aussi affecter différemment le niveau d'inhibition par le kétoconazole. De fait, le kétoconazole a inhibé plus fortement le CYP3A4 comparativement au CYP3A5 et ceci, en présence de la dompéridone ou du midazolam. Afin d'améliorer l'extrapolation *in vivo* à partir des études *in vitro*, nos données suggèrent que la détermination précise du profil cinétique des substrats devrait être effectuée. De plus, puisque le cytochrome b5 est co-exprimé au niveau hépatique, il nous apparaît indiquer que les études *in vitro* de métabolisme utilisant

des isoenzymes recombinantes s'assurent de l'ajout du cytochrome b5 afin de présenter un reflet plus exacte des conditions observées avec des microsomes hépatiques.

Dans un deuxième temps, mes travaux de recherche consistaient à évaluer le potentiel inhibiteur de la clarithromycine, un antibiotique macrolide largement prescrit et dont le potentiel d'interactions médicamenteuses *in vivo* est important. L'intérêt de cette étude a été éveillé dû aux discordances entre les données *in vitro* et *in vivo* concernant l'inhibition par la clarithromycine. Nos résultats ont montré que la clarithromycine est un faible inhibiteur compétitif tel qu'observé avec les études d'inhibition avec les microsomes de foie humain en présence de dompéridone ou de midazolam. De plus, l'inhibition par la clarithromycine envers les enzymes recombinantes CYP3A4 et CYP3A5 était sensible à l'ajout de cytochrome b5. Particulièrement, l'inhibition de la formation du métabolite hydroxylé de la dompéridone et du 1-hydroxymidazolam par la clarithromycine fut pratiquement nulle suivant l'ajout de cytochrome b5. Ceci appuie encore une fois, le concept du rôle effecteur du cytochrome b5 et suggère que les CYP3A4 et CYP3A5 soient des protéines allostériques. Nos données ont aussi rapporté que l'utilisation de la formulation intraveineuse de clarithromycine pour réaliser des études de métabolisme *in vitro* inhibait plus fortement le métabolisme de la dompéridone et du midazolam. Suite à cette observation, l'excipient majoritaire, l'acide lactobionique, contenu dans cette formulation a été évalué. Cet agent chélateur de fer a effectivement montré un pouvoir inhibiteur envers la biotransformation de la dompéridone et du midazolam. Ceci suggère donc que la formulation utilisée lors des études aura des répercussions importantes sur l'interprétation des résultats et l'extrapolation des données doit être faite en conséquence.

La formation de complexes métaboliques intermédiaires a été indirectement montrée par spectrophotométrie en utilisant la technique basée sur la liaison au monoxyde de carbone. De fait, nous avons mesuré la forme non-complexée puisque seul le CYP450 non-complexé peut se lier au monoxyde de carbone. Nos résultats ont montré une diminution du CYP450 non-complexé en présence de clarithromycine en fonction du temps (0-30 et 60 minutes). Également, les résultats obtenus suite aux différents temps de pré-incubation suggèrent que les systèmes enzymatiques *in vitro* utilisant des microsomes ou enzymes recombinantes ne sont pas adéquats pour évaluer la formation de complexes métaboliques puisque que ce système ne conserve pas une activité stable sur une période de temps prolongé.

Lors de mes travaux de doctorat, nous avons élaboré une nouvelle approche afin de déterminer plus précisément la formation de complexes métaboliques intermédiaires dans le temps qui est basé sur l'utilisation d'hépatocytes en culture. Une inhibition majeure a été observée suite à la pré-exposition d'au moins 24 heures à la clarithromycine (à des concentrations de 10 et 100 μM). À des concentrations plus faibles (1 μM), l'inhibition est retardée et devient davantage plus grande après trois jours de pré-expositions. Ces résultats suggèrent qu'un temps d'exposition plus long est requis à de faibles concentrations de clarithromycine pour obtenir une inhibition marquée ce qui est en accord avec la formation de complexes métaboliques qui nécessitent une accumulation qui est temps et concentration-dépendante. Il serait intéressant d'évaluer ultérieurement des temps de pré-exposition au-delà de trois jours et de déterminer le temps post-exposition nécessaire pour récupérer l'activité basale. Par conséquent, nous pourrions déterminer le moment où le risque d'interactions médicamenteuses pour chacun des médicaments formant des complexes métaboliques intermédiaires est maximal et le temps requis après l'arrêt de ce médicament où l'interaction sera minimale.

Lors de mes études, le métabolisme extra-hépatique a aussi été exploré en utilisant le cœur comme organe modèle. Le but de ce projet était d'évaluer si les CYP450s présents dans cet organe, le cœur, pouvaient contribuer au métabolisme des médicaments. Ainsi, cette activité métabolique localisée au cœur pourrait contribuer à la variabilité dans l'effet pharmacologique des médicaments ou encore à la prédisposition aux effets secondaires. Dans un premier temps, nous avons déterminé la présence de messagers (ARN) associés à différentes isoenzymes des CYP450s dans du tissu cardiaque de sujets normaux et de cœurs provenant de patients avec insuffisance cardiaque. Les résultats de cette étude sont extrêmement intéressants étant donné la taille de nos échantillons. La présence d'ARNm des isoenzymes évaluées (CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1, CYP2J2 et CYP4A11) a été détectée tant chez les sujets normaux que les sujets avec insuffisance cardiaque et tant dans le ventricule gauche que le ventricule droit. Une variabilité importante dans l'expression (présence-absence) et dans l'ampleur de l'expression a été observée. Nos résultats confirment que le CYP2J2 est l'isoforme majeure exprimée dans le cœur suivi des CYP2E1, CYP1A1, CYP4A11 et CYP2C8. Le CYP2B6 est celui qui a présenté les plus faibles niveaux d'expression. Bien que l'expression du CYP2C9 soit en moyenne supérieure à celle du CYP2B6, l'ARNm du CYP2C9 a cependant été détecté dans un nombre limité d'échantillons. Nos résultats suggèrent que l'expression de plusieurs isoenzymes tend à être plus faible

dans les cœurs des patients avec insuffisance cardiaque comparativement aux sujets en bonne santé. Il serait intéressant de réaliser une sous-analyse afin d'évaluer si cette modulation diffère selon l'étiologie de l'insuffisance cardiaque, soit ischémique versus non-ischémique. Par la suite, l'objectif du projet était d'évaluer si la présence d'ARNm détectée dans le tissu cardiaque était associée à une protéine capable de métabolisme. Afin d'évaluer l'activité catalytique des CYP450s cardiaques, l'élaboration d'une méthode pour la préparation de microsomes de cœur était nécessaire. La technique pour la préparation de microsomes de cœur a nécessité plusieurs tentatives. Malgré les diverses techniques explorées, une activité métabolique a été observée dans seulement trois échantillons de cœur. De plus, il faut noter que nous avons tenté de répéter cette méthodologie mais les résultats ont été décevants ce qui s'explique fort probablement par une variation sur la qualité de l'échantillon de cœur utilisé. Il faut préciser qu'un seul groupe de recherche (Thum et Borlak) ont réussi à obtenir des microsomes de cœur doués d'activité métabolique. On peut questionner sur la contamination possible des CYP450s par d'autres enzymes hydroxylases lors des étapes d'ultracentrifugation puisque le CYP450 n'a pas été dosé par spectrophotométrie. Il est aussi possible que leurs échantillons de cœur étaient de meilleure qualité. Nos résultats ont toutefois montré que la formation du métabolite de vérapamil était abolie en présence d'anticorps CYP2C8 et CYP2C9. Ceci suggère fortement que les CYP2C8 dont particulièrement le CYP2C8 soit impliqué dans le métabolisme intra-tissulaire cardiaque du vérapamil. Bien que la technique soit très difficile à appliquer et à répéter, la portée des résultats obtenus malgré que le «n» de notre étude soit faible est majeure puisqu'ils ont été confirmés par des études d'immuno-inhibition. Les analyses futures devraient être effectuées avec des échantillons de cœurs frais et non-perfuser selon la technique conventionnelle afin de réduire au maximum le temps avant la congélation et de minimiser la dégradation possible des CYP450s. Également, des études d'immunohistochimie pourraient être réalisées afin de déterminer précisément la localisation des CYP450s dans le cardiomyocyte et voir si elle diffère de l'hépatocyte. Ce projet a des retombés excessivement intéressantes puisqu'il permet de proposer un nouveau concept basé sur l'importance de chacun des organes comme une entité distincte pouvant expliquer et contribuer individuellement à la variabilité dans la réponse à un médicament et à la prédisposition à des effets indésirables.

Enfin, le dernier projet de ma thèse porte sur une étude clinique visant à évaluer la contribution des facteurs génétiques et non-génétiques dans la variabilité

dans la réponse à la warfarine (l'anticoagulant oral qui est encore aujourd'hui le plus prescrit). L'intérêt pour la warfarine est expliqué par le fait que ce médicament est caractérisé par des doses très variables entre les patients, que l'initiation du traitement est encore empirique et que les risques de sur- et sous-anticoagulation ont des répercussions cliniques majeures (hémorragies versus formation de caillot). Plusieurs études ont évalué la contribution de facteurs génétiques tels que le CYP2C9 et VKORC1 dans la réponse à la warfarine. Toutefois, la plupart des études ont exclu les patients avec une médication concomitante pouvant influencer la réponse à la warfarine et conséquemment, les divers modèles de régression proposés ne sont donc pas applicables à la majorité de la population recevant de la warfarine puisque ces patients reçoivent souvent une polypharmacie. Ainsi, notre étude a évalué chez des patients qui débutaient un traitement à la warfarine si une mesure phénotypique présentait une meilleure valeur prédictive comparativement au génotype chez des patients avec une polypharmacie. Nos résultats ont montré qu'un phénotype combiné à des génotypes de CYP2C9 et de VKORC1 permettait d'obtenir les meilleurs modèles. Et que l'utilisation de génotypes seuls avait une portée limitée (faible valeur prédictive) en présence d'une population de patients prenant plusieurs médicaments. Nous avons aussi observé qu'un phénotype basé sur le ratio métabolique urinaire de losartan est difficile à appliquer et cela, même en milieu hospitalier et que les meilleurs résultats ont été obtenus à l'aide d'une mesure phénotypique basée sur le ratio plasmatique des énantiomères de la warfarine ou d'une valeur d'INR au jour 4. Notre étude propose donc un modèle pouvant s'appliquer à l'ensemble des patients sans aucun critère de discrimination quant à la médication. La prochaine étape serait d'évaluer notre modèle dans une étude prospective afin de déterminer si effectivement il permet d'améliorer les «outcomes» cliniques (par exemple ; réduction du temps pour atteindre un INR thérapeutique, diminution de saignements et d'hémorragies, diminution d'échecs thérapeutiques).

Différentes techniques et approches ont été explorées à travers les divers projets qui ont constitué principalement mon doctorat. Les travaux de recherche réalisés au cours de mes études doctorales s'inscrivent dans un esprit scientifique et clinique afin de mieux comprendre la variabilité dans la réponse aux médicaments, d'étudier et de proposer des mécanismes possibles pouvant expliquer ce phénomène et de fournir des outils afin de répondre à cette problématique.

Ma contribution scientifique s'étend et se poursuivra au-delà de mes études doctorales. D'une part, j'ai aussi élaboré et rédigé divers protocoles de recherche clinique qui seront entrepris et réalisés par d'autres étudiants dans le laboratoire. Certains de ces projets sont la continuité clinique du volet fondamental auquel j'ai contribué et pour lequel j'ai écrit le volet clinique. Au cours de mon doctorat, j'ai participé à titre d'auteur principal à la rédaction de plusieurs protocoles qui sont présentés à l'appendice I. D'autre part, j'ai participé à la rédaction de divers articles à visée professionnelle concernant particulièrement les CYP450s, les interactions médicamenteuses et la pharmacogénétique. La liste des articles tant scientifiques que professionnels sont énumérés à l'appendice II.

Les résultats présentés dans cette thèse sont le reflet des projets majeurs auxquels j'ai travaillé.

RÉFÉRENCES

1. Shelley JH, Baur MP. Paul Martini: the first clinical pharmacologist? *Lancet*. 1999;353(9167):1870-1873.
2. Gold H, Cattell M, Greiner T, Hanlon LW, Kwit NT, Modell W, Cotlove E, Benton J, Otto HL. Clinical pharmacology of digoxin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1953;109(1):45-57.
3. Atkinson AJ, Abernethy DR, Daniels CE, Dedrick RL, Markey SP. *Principles of Clinical Pharmacology*. Second ed. Oxford: Elsevier, Academic Press; 2007.
4. Atkinson AJ, Jr., Nordstrom K. The challenge of in-hospital medication use: an opportunity for clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60(4):363-367.
5. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *Jama*. 1998;279(15):1200-1205.
6. Tozer TN, Rowland M. *Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics; The quantitative basis of drug therapy.*: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
7. Koch-Weser J. Drug therapy. Serum drug concentrations as therapeutic guides. *N Engl J Med*. 1972;287(5):227-231.
8. Rowland M, Tozer TN. *Clinical Pharmacokinetics; Concepts and Applications*. Third ed: Lippincott Williams & Wilkins; 1995.
9. Lewis DF, Watson E, Lake BG. Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat Res*. 1998;410(3):245-270.
10. Sullivan RJ, Hagen EH, Hammerstein P. Revealing the paradox of drug reward in human evolution. *Proc Biol Sci*. 2008;275(1640):1231-1241.
11. Wynne-Edwards KE. Evolutionary biology of plant defenses against herbivory and their predictive implications for endocrine disruptor susceptibility in vertebrates. *Environ Health Perspect*. 2001;109(5):443-448.
12. Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O, Imaoka S, Funae Y, Kurosawa N, Horiuchi T, Yoshida Y. Sterol 14-demethylase P450 (P45014DM*) is one of the most ancient and conserved P450 species. *J Biochem*. 1996;119(5):926-933.
13. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys*. 1999;369(1):1-10.
14. Caldwell J. Drug metabolism and pharmacogenetics: the British contribution to fields of international significance. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S89-99.
15. Prasad C, Galbraith PA. Sir Archibald Garrod and alkaptonuria -'story of metabolic genetics'. *Clin Genet*. 2005;68(3):199-203.
16. Estabrook RW. A passion for P450s (rememberances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos*. 2003;31(12):1461-1473.
17. Williams RT. The metabolism of sulphonamides: 3. The detection of 3-hydroxysulphanilamide in the urine of hospital patients treated with sulphanilamide. *Biochem J*. 1947;41(1):1-8.
18. Williams RT. Some recent studies on species variations in drug metabolism. *Chem Biol Interact*. 1971;3(4):311-312.

19. Smith AE, Williams PC. Urinary elimination of synthetic oestrogens and stilboestrol glucuronide in animals. *Biochem J.* 1948;42(2):253-257.
20. Axelrod J, Reichenthal J, Brodie BB. Mechanism of the potentiating action of beta-diethylaminoethyl diphenylpropylacetate. *J Pharmacol Exp Ther.* 1954;112(1):49-54.
21. Cooper JR, Axelrod J, Brodie BB. Inhibitory effects of beta-diethylaminoethyl diphenylpropylacetate on a variety of drug metabolic pathways in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 1954;112(1):55-63.
22. Mueller GC, Miller JA. The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver; the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for triphosphopyridine nucleotide. *J Biol Chem.* 1949;180(3):1125-1136.
23. Mueller GC, Miller JA. The metabolism of methylated aminoazo dyes. II. Oxidative demethylation by rat liver homogenates. *J Biol Chem.* 1953;202(2):579-587.
24. Axelrod J. The enzymatic deamination of amphetamine (benzedrine). *J Biol Chem.* 1955;214(2):753-763.
25. Ryan KJ, Engel LL. The interconversion of estrone and estradiol by human tissue slices. *Endocrinology.* 1953;52(3):287-291.
26. Ryan KJ, Engel LL. The interconversion of estrone and estradiol-17beta by rat liver slices. *Endocrinology.* 1953;52(3):277-286.
27. Ryan KJ, Engel LL. Hydroxylation of steroids at carbon 21. *J Biol Chem.* 1957;225(1):103-114.
28. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1958;75(2):376-386.
29. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem.* 1962;237:1375-1376.
30. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. I. Evidence For Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem.* 1964;239:2370-2378.
31. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment Of Liver Microsomes. Ii. Solubilization, Purification, And Properties. *J Biol Chem.* 1964;239:2379-2385.
32. Hashimoto Y, Yamano T, Mason HS. An electron spin resonance study of microsomal electron transport. *J Biol Chem.* 1962;237:3843-3844.
33. Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O. The Light Reversible Carbon Monoxide Inhibition Of The Steroid C21-Hydroxylase System Of The Adrenal Cortex. *Biochem Z.* 1963;338:741-755.
34. Cooper DY, Estabrook RW, Rosenthal O. The stoichiometry of C21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. *J Biol Chem.* 1963;238:1320-1323.
35. Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O. Photochemical Action Spectrum Of The Terminal Oxidase Of Mixed Function Oxidase Systems. *Science.* 1965;147:400-402.
36. Conney AH, Miller EC, Miller JA. The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 1956;16(5):450-459.
37. Conney AH. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol Rev.* 1967;19(3):317-366.

38. Sladek NE, Mannering GJ. Evidence for a new P-450 hemoprotein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1966;22(5):668-674.
39. Ryan DE, Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Ther.* 1990;45(2):153-239.
40. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, et al. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *Dna.* 1987;6(1):1-11.
41. Nebert DW, Nelson DR. P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods Enzymol.* 1991;206:3-11.
42. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 2004;14(1):1-18.
43. Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol.* 2006;124(1):128-145.
44. Cribb AE, Peyrou M, Muruganandan S, Schneider L. The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab Rev.* 2005;37(3):405-442.
45. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev.* 2006;38(1-2):171-196.
46. Sue Masters B, Marohnic CC. Cytochromes P450--a family of proteins and scientists-understanding their relationships. *Drug Metab Rev.* 2006;38(1-2):209-225.
47. Oinonen T, Lindros KO. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J.* 1998;329 (Pt 1):17-35.
48. Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;369(1):89-104.
49. Avila L, Huang HW, Damaso CO, Lu S, Moenne-Loccoz P, Rivera M. Coupled oxidation vs heme oxygenation: insights from axial ligand mutants of mitochondrial cytochrome b5. *J Am Chem Soc.* 2003;125(14):4103-4110.
50. Testa B, Kramer SD. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chem Biodivers.* 2007;4(3):257-405.
51. Ortiz de Montellano PR. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry.* . Third ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2005.
52. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol.* 2001;14(6):611-650.
53. Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* 1991;4(4):391-407.
54. Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 2004;95(1):1-6.
55. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(6):559-603.
56. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet.* 2002;360(9340):1155-1162.

57. Omiecinski CJ, Redlich CA, Costa P. Induction and developmental expression of cytochrome P450IA1 messenger RNA in rat and human tissues: detection by the polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1990;50(14):4315-4321.
58. Kitada M, Kamataki T. Cytochrome P450 in human fetal liver: significance and fetal-specific expression. *Drug Metab Rev.* 1994;26(1-2):305-323.
59. Kim JH, Sherman ME, Curriero FC, Guengerich FP, Strickland PT, Sutter TR. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199(3):210-219.
60. Shimada T, Yun CH, Yamazaki H, Gautier JC, Beaune PH, Guengerich FP. Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol Pharmacol.* 1992;41(5):856-864.
61. Fujino T, Gottlieb K, Manchester DK, Park SS, West D, Gurtoo HL, Tarone RE, Gelboin HV. Monoclonal antibody phenotyping of interindividual differences in cytochrome P-450-dependent reactions of single and twin human placenta. *Cancer Res.* 1984;44(9):3916-3923.
62. Robie-Suh K, Robinson R, Gelboin HV, Guengerich FP. Aryl hydrocarbon hydroxylase is inhibited by antibody to rat liver cytochrome P-450. *Science.* 1980;208(4447):1031-1033.
63. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Wakamiya N, Ueng YF, Guengerich FP, Inui Y. Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(5):515-522.
64. Nebert DW, Gelboin HV. Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme. *J Biol Chem.* 1968;243(23):6242-6249.
65. Nebert DW, Gelboin HV. Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. II. Cellular responses during enzyme induction. *J Biol Chem.* 1968;243(23):6250-6261.
66. Guo Z, Gillam EM, Ohmori S, Tukey RH, Guengerich FP. Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys.* 1994;312(2):436-446.
67. Bauer E, Guo Z, Ueng YF, Bell LC, Zeldin D, Guengerich FP. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* 1995;8(1):136-142.
68. Shou M, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,h]anthracene by cDNA-expressed human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys.* 1996;328(1):201-207.
69. Shou M, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,l]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis.* 1996;17(11):2429-2433.
70. Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint Aubert B, Bories P, Michel H, Maurel P. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology.* 1990;99(3):737-747.
71. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 1997;29(1-2):413-580.

72. Vistisen K, Poulsen HE, Loft S. Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis*. 1992;13(9):1561-1568.
73. Shimada T, Yamazaki H, Foroozesh M, Hopkins NE, Alworth WL, Guengerich FP. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem Res Toxicol*. 1998;11(9):1048-1056.
74. Racha JK, Rettie AE, Kunze KL. Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 1A2 by furafylline: detection of a 1:1 adduct to protein and evidence for the formation of a novel imidazomethide intermediate. *Biochemistry*. 1998;37(20):7407-7419.
75. Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF. Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(20):7696-7700.
76. Daly AK. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17(1):27-41.
77. Zhang ZY, Kaminsky LS. Characterization of human cytochromes P450 involved in theophylline 8-hydroxylation. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(2):205-211.
78. Patten CJ, Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Yang CS. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem Res Toxicol*. 1993;6(4):511-518.
79. Buters JT, Sakai S, Richter T, Pineau T, Alexander DL, Savas U, Doehmer J, Ward JM, Jefcoate CR, Gonzalez FJ. Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):1977-1982.
80. Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT. Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms. *Endocrinology*. 2003;144(8):3382-3398.
81. Li DN, Seidel A, Pritchard MP, Wolf CR, Friedberg T. Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics*. 2000;10(4):343-353.
82. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997;275(5297):218-220.
83. Godoy W, Albano RM, Moraes EG, Pinho PR, Nunes RA, Saito EH, Higa C, Filho IM, Krueel CD, Schirmer CC, Gurski R, Lang MA, Pinto LF. CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogenesis*. 2002;23(4):611-616.
84. Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003;43:149-173.

85. Gu J, Su T, Chen Y, Zhang QY, Ding X. Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: potential roles in developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;165(2):158-162.
86. Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos*. 1996;24(11):1212-1217.
87. Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(3):1608-1614.
88. Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y. Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;277(2):1010-1015.
89. Hecht SS, Hochalter JB, Villalta PW, Murphy SE. 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: formation of a lung carcinogen precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(23):12493-12497.
90. Zanger UM, Klein K, Saussele T, Bliedernicht J, Hofmann MH, Schwab M. Polymorphic CYP2B6: molecular mechanisms and emerging clinical significance. *Pharmacogenomics*. 2007;8(7):743-759.
91. Hanna IH, Reed JR, Guengerich FP, Hollenberg PF. Expression of human cytochrome P450 2B6 in *Escherichia coli*: characterization of catalytic activity and expression levels in human liver. *Arch Biochem Biophys*. 2000;376(1):206-216.
92. Turpeinen M, Raunio H, Pelkonen O. The functional role of CYP2B6 in human drug metabolism: substrates and inhibitors in vitro, in vivo and in silico. *Curr Drug Metab*. 2006;7(7):705-714.
93. Coles R, Kharasch ED. Stereoselective metabolism of bupropion by cytochrome P4502B6 (CYP2B6) and human liver microsomes. *Pharm Res*. 2008;25(6):1405-1411.
94. Kharasch ED, Mitchell D, Coles R, Blanco R. Rapid clinical induction of hepatic cytochrome P4502B6 activity by ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(5):1663-1669.
95. Dixit V, Hariparsad N, Li F, Desai P, Thummel KE, Unadkat JD. Cytochrome P450 enzymes and transporters induced by anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors in human hepatocytes: implications for predicting clinical drug interactions. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(10):1853-1859.
96. Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, Raucy JL, Goldstein JA. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry*. 1991;30(13):3247-3255.
97. Wang P, Mason PS, Guengerich FP. Purification of human liver cytochrome P-450 and comparison to the enzyme isolated from rat liver. *Arch Biochem Biophys*. 1980;199(1):206-219.
98. Shimada T, Misono KS, Guengerich FP. Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. Purification and characterization of two similar forms involved in the reaction. *J Biol Chem*. 1986;261(2):909-921.

99. Wang PP, Beaune P, Kaminsky LS, Dannan GA, Kadlubar FF, Larrey D, Guengerich FP. Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes. *Biochemistry*. 1983;22(23):5375-5383.
100. Imaoka S, Yamada T, Hiroi T, Hayashi K, Sakaki T, Yabusaki Y, Funae Y. Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(8):1041-1050.
101. Klose TS, Blaisdell JA, Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol*. 1999;13(6):289-295.
102. Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N, Maurel P. Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(3):242-251.
103. Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, Flockhart DA. Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(3):849-857.
104. Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW. Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res*. 1994;54(21):5543-5546.
105. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev*. 2002;34(1-2):83-448.
106. Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ. Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(12):1352-1356.
107. Ozaki H, Ishikawa CT, Ishii T, Toyoda A, Murano T, Miyashita Y, Shirai K. Clearance rates of cerivastatin metabolites in a patient with cerivastatin-induced rhabdomyolysis. *J Clin Pharm Ther*. 2005;30(2):189-192.
108. Ishikawa C, Ozaki H, Nakajima T, Ishii T, Kanai S, Anjo S, Shirai K, Inoue I. A frameshift variant of CYP2C8 was identified in a patient who suffered from rhabdomyolysis after administration of cerivastatin. *J Hum Genet*. 2004;49(10):582-585.
109. Knodell RG, Hall SD, Wilkinson GR, Guengerich FP. Hepatic metabolism of tolbutamide: characterization of the form of cytochrome P-450 involved in methyl hydroxylation and relationship to in vivo disposition. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;241(3):1112-1119.
110. Sekino K, Kubota T, Okada Y, Yamada Y, Yamamoto K, Horiuchi R, Kimura K, Iga T. Effect of the single CYP2C9*3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;59(8-9):589-592.
111. Shon JH, Yoon YR, Kim KA, Lim YC, Lee KJ, Park JY, Cha IJ, Flockhart DA, Shin JG. Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genetic polymorphisms on the disposition of and blood glucose lowering response to tolbutamide in humans. *Pharmacogenetics*. 2002;12(2):111-119.
112. Lee CR, Pieper JA, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Losartan and E3174 pharmacokinetics in cytochrome P450 2C9*1/*1, *1/*2, and *1/*3 individuals. *Pharmacotherapy*. 2003;23(6):720-725.

113. Lee CR, Pieper JA, Frye RF, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Tolbutamide, flurbiprofen, and losartan as probes of CYP2C9 activity in humans. *J Clin Pharmacol*. 2003;43(1):84-91.
114. Caraco Y, Muszkat M, Wood AJ. Phenytoin metabolic ratio: a putative marker of CYP2C9 activity in vivo. *Pharmacogenetics*. 2001;11(7):587-596.
115. Kaminsky LS, de Morais SM, Faletto MB, Dunbar DA, Goldstein JA. Correlation of human cytochrome P4502C substrate specificities with primary structure: warfarin as a probe. *Mol Pharmacol*. 1993;43(2):234-239.
116. He M, Korzekwa KR, Jones JP, Rettie AE, Trager WF. Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9. *Arch Biochem Biophys*. 1999;372(1):16-28.
117. Mancy A, Broto P, Dijols S, Dansette PM, Mansuy D. The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: an approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling. *Biochemistry*. 1995;34(33):10365-10375.
118. Mancy A, Dijols S, Poli S, Guengerich P, Mansuy D. Interaction of sulfaphenazole derivatives with human liver cytochromes P450 2C: molecular origin of the specific inhibitory effects of sulfaphenazole on CYP 2C9 and consequences for the substrate binding site topology of CYP 2C9. *Biochemistry*. 1996;35(50):16205-16212.
119. Ando Y, Fuse E, Figg WD. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clin Cancer Res*. 2002;8(6):1964-1973.
120. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004;369(1):23-37.
121. Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab*. 2002;3(6):561-597.
122. Sidorik L, Kyyamova R, Bobyk V, Kapustian L, Rozhko O, Vigontina O, Ryabenko D, Danko I, Maksymchuk O, Kovalenko VN, Filonenko VV, Chaschin NA. Molecular chaperone, HSP60, and cytochrome P450 2E1 co-expression in dilated cardiomyopathy. *Cell Biol Int*. 2005;29(1):51-55.
123. Peter R, Bocker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang CS. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem Res Toxicol*. 1990;3(6):566-573.
124. Yamazaki H, Guo Z, Guengerich FP. Selectivity of cytochrome P4502E1 in chlorzoxazone 6-hydroxylation. *Drug Metab Dispos*. 1995;23(3):438-440.
125. O'Shea D, Davis SN, Kim RB, Wilkinson GR. Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity. *Clin Pharmacol Ther*. 1994;56(4):359-367.
126. Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol*. 1991;4(2):168-179.
127. Spracklin DK, Hankins DC, Fisher JM, Thummel KE, Kharasch ED. Cytochrome P450 2E1 is the principal catalyst of human oxidative halothane metabolism in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281(1):400-411.
128. Kharasch ED, Hankins DC, Cox K. Clinical isoflurane metabolism by cytochrome P450 2E1. *Anesthesiology*. 1999;90(3):766-771.
129. Daly AK. Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J Mol Med*. 1995;73(11):539-553.

130. Stephens EA, Taylor JA, Kaplan N, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell DA. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics*. 1994;4(4):185-192.
131. Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T, Funae Y. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300(1):298-304.
132. Matsumoto S, Hirama T, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y. Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(11):1240-1245.
133. Ziegler DM. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab Rev*. 1988;19(1):1-32.
134. Elshourbagy NA, Guzelian PS. Separation, purification, and characterization of a novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone-16 alpha-carbonitrile. *J Biol Chem*. 1980;255(4):1279-1285.
135. Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem*. 1986;261(11):5051-5060.
136. Beaune PH, Umbenhauer DR, Bork RW, Lloyd RS, Guengerich FP. Isolation and sequence determination of a cDNA clone related to human cytochrome P-450 nifedipine oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(21):8064-8068.
137. Kivisto KT, Bookjans G, Fromm MF, Griese EU, Munzel P, Kroemer HK. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. *Br J Clin Pharmacol*. 1996;42(3):387-389.
138. Guengerich FP. Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene. *Chem Res Toxicol*. 1990;3(4):363-371.
139. de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;253(1):387-394.
140. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*. 2006;34(5):880-886.
141. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, Thummel KE. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(3):1552-1562.
142. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;270(1):414-423.
143. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*. 2003;38(4):978-988.
144. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K,

- Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001;27(4):383-391.
145. Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, Lamba V, Parviz F, Duncan SA, Inoue Y, Gonzalez FJ, Schuetz EG, Kim RB. The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med.* 2003;9(2):220-224.
146. Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *Faseb J.* 2002;16(13):1799-1801.
147. Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, Ward A, Angove HC, Day PJ, Vonrhein C, Tickle IJ, Jhoti H. Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science.* 2004;305(5684):683-686.
148. Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38091-38094.
149. Harlow GR, Halpert JR. Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):6636-6641.
150. Kenworthy KE, Clarke SE, Andrews J, Houston JB. Multisite kinetic models for CYP3A4: simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(12):1644-1651.
151. Ekins S, Bravi G, Wikel JH, Wrighton SA. Three-dimensional-quantitative structure activity relationship analysis of cytochrome P-450 3A4 substrates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;291(1):424-433.
152. Domanski TL, He YA, Khan KK, Roussel F, Wang Q, Halpert JR. Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effect on substrate oxidation and cooperativity. *Biochemistry.* 2001;40(34):10150-10160.
153. Ekroos M, Sjogren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(37):13682-13687.
154. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(10):1108-1114.
155. Yamakoshi Y, Kishimoto T, Sugimura K, Kawashima H. Human prostate CYP3A5: identification of a unique 5'-untranslated sequence and characterization of purified recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;260(3):676-681.
156. Hukkanen J, Vaisanen T, Lassila A, Piipari R, Anttila S, Pelkonen O, Raunio H, Hakkola J. Regulation of CYP3A5 by glucocorticoids and cigarette smoke in human lung-derived cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(2):745-752.
157. Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics.* 1994;4(5):247-259.
158. Anttila S, Hukkanen J, Hakkola J, Stjernvall T, Beaune P, Edwards RJ, Boobis AR, Pelkonen O, Raunio H. Expression and localization of CYP3A4

- and CYP3A5 in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16(3):242-249.
159. Lown KS, Kolars JC, Thummel KE, Barnett JL, Kunze KL, Wrighton SA, Watkins PB. Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test. *Drug Metab Dispos.* 1994;22(6):947-955.
 160. Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Pelkonen O, Anttila S, Piipari R, Boobis A, Edwards RJ. Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue. *Exp Toxicol Pathol.* 1999;51(4-5):412-417.
 161. Wrighton SA, Ring BJ, Watkins PB, VandenBranden M. Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P-450III family. *Mol Pharmacol.* 1989;36(1):97-105.
 162. Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Saarikoski S, Vahakangas K, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Pasanen M. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only a limited number of fetal livers. *Biol Neonate.* 2001;80(3):193-201.
 163. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(8):883-891.
 164. Liu YT, Hao HP, Liu CX, Wang GJ, Xie HG. Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 2007;39(4):699-721.
 165. de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet.* 1999;37(6):485-505.
 166. Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Takashima S, Imaoka S, Funae Y, Yabusaki Y, Kamataki T, Kobayashi S. A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy. *Life Sci.* 1997;61(26):2567-2574.
 167. Sarkar MA, Vadlamuri V, Ghosh S, Glover DD. Expression and cyclic variability of CYP3A4 and CYP3A7 isoforms in human endometrium and cervix during the menstrual cycle. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(1):1-6.
 168. Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Pelkonen O, Saarikoski S, Cresteil T, Pasanen M. Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy. *Biochem Pharmacol.* 1996;52(2):379-383.
 169. Schuetz JD, Kauma S, Guzelian PS. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest.* 1993;92(2):1018-1024.
 170. Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(9):1643-1653.
 171. Gillam EM, Wunsch RM, Ueng YF, Shimada T, Reilly PE, Kamataki T, Guengerich FP. Expression of cytochrome P450 3A7 in *Escherichia coli*: effects of 5' modification and catalytic characterization of recombinant enzyme expressed in bicistronic format with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys.* 1997;346(1):81-90.

172. Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol*. 2001;59(2):386-392.
173. Clayman CB, Arnold J, Hockwald RS, Yount EH, Jr., Edgcomb JH, Alving AS. Toxicity of primaquine in Caucasians. *J Am Med Assoc*. 1952;149(17):1563-1568.
174. Kalow W, Staron N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol*. 1957;35(12):1305-1320.
175. Lehmann H, Ryan E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*. 1956;271(6934):124.
176. Bonicke R, Reif W. [Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hydrazide in human and animal organism.]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1953;220(4):321-323.
177. Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, Schmidt LH. Metabolism of isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am Rev Tuberc*. 1954;70(2):266-273.
178. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc*. 1957;165(7):835-837.
179. Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheiner J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics J*. 2008;8(1):4-15.
180. Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet*. 2004;5(9):669-676.
181. Hart SN, Zhong XB. P450 oxidoreductase: genetic polymorphisms and implications for drug metabolism and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(4):439-452.
182. Alving AS, Carson PE, Flanagan CL, Ickes CE. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*. 1956;124(3220):484-485.
183. Evans DA. Genetic variations in the acetylation of isoniazid and other drugs. *Ann N Y Acad Sci*. 1968;151(2):723-733.
184. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet*. 1977;2(8038):584-586.
185. Ward SA, Goto F, Nakamura K, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA. S-mephenytoin 4-hydroxylase is inherited as an autosomal-recessive trait in Japanese families. *Clin Pharmacol Ther*. 1987;42(1):96-99.
186. Ninomiya H, Mamiya K, Matsuo S, Ieiri I, Higuchi S, Tashiro N. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum phenytoin concentration with central nervous system intoxication. *Ther Drug Monit*. 2000;22(2):230-232.
187. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999;286(5439):487-491.
188. Katz DA. Overview of pharmacogenetics. *Curr Protoc Hum Genet*. 2006;Chapter 9:Unit 9 19.
189. McLeod HL, Evans WE. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:101-121.
190. Kirchheiner J, Seeringer A. Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770(3):489-494.

191. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med.* 2006;57:119-137.
192. Need AC, Motulsky AG, Goldstein DB. Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat Genet.* 2005;37(7):671-681.
193. Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(12):947-960.
194. Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *Jama.* 2001;286(18):2270-2279.
195. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature.* 1988;331(6155):442-446.
196. Evans DA, Mahgoub A, Sloan TP, Idle JR, Smith RL. A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. *J Med Genet.* 1980;17(2):102-105.
197. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigentic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007;116(3):496-526.
198. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997;60(2):284-295.
199. Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics.* 1998;8(6):529-541.
200. Daly AK. Pharmacogenetics of the cytochromes P450. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(16):1733-1744.
201. Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuvén T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics.* 2001;11(7):573-585.
202. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(1):6-13.
203. Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics.* 2002;3(2):229-243.
204. Sistonen J, Sajantila A, Lao O, Corander J, Barbujani G, Fuselli S. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(2):93-101.
205. Kupfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: a new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984;26(6):753-759.
206. Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(12):913-958.
207. Xie HG, Kim RB, Wood AJ, Stein CM. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:815-850.

208. Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2006;44(7):297-302.
209. Furuta T, Shirai N, Watanabe F, Honda S, Takeuchi K, Iida T, Sato Y, Kajimura M, Futami H, Takayanagi S, Yamada M, Ohashi K, Ishizaki T, Hanai H. Effect of cytochrome P450C19 genotypic differences on cure rates for gastroesophageal reflux disease by lansoprazole. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(4):453-460.
210. Kawamura M, Ohara S, Koike T, Iijima K, Suzuki H, Kayaba S, Noguchi K, Abe S, Noguchi M, Shimosegawa T. Cytochrome P450 2C19 polymorphism influences the preventive effect of lansoprazole on the recurrence of erosive reflux esophagitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(2):222-226.
211. Kawamura M, Ohara S, Koike T, Iijima K, Suzuki J, Kayaba S, Noguchi K, Hamada S, Noguchi M, Shimosegawa T. The effects of lansoprazole on erosive reflux oesophagitis are influenced by CYP2C19 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17(7):965-973.
212. Thijssen HH, Ritzen B. Acenocoumarol pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(1):61-68.
213. Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(10):1257-1270.
214. Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(1):1-16.
215. Kirchheiner J, Stormer E, Meisel C, Steinbach N, Roots I, Brockmoller J. Influence of CYP2C9 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of celecoxib and its metabolites. *Pharmacogenetics.* 2003;13(8):473-480.
216. Bahadur N, Leathart JB, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, Houdt JV, Hendrickx J, Mannens G, Bohets H, Williams FM, Armstrong M, Crespi CL, Daly AK. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(11):1579-1589.
217. Weise A, Lambertz U, Thome N, Bartz U, Krefft M, Mockenhaupt F, Bienzle U, Schondorf T, Forst T, Pfutzner A. A fast and reliable single-run method for genotyping of the human cytochrome P450 2C8 gene for different ethnic groups. *Clin Lab.* 2006;52(11-12):599-603.
218. Weise A, Grundler S, Zaumsegel D, Klotzek M, Grondahl B, Forst T, Pfutzner A. Development and evaluation of a rapid and reliable method for cytochrome P450 2C8 genotyping. *Clin Lab.* 2004;50(3-4):141-148.
219. Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Agundez JA. Interethnic and intraethnic variability of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in healthy individuals. *Mol Diagn Ther.* 2006;10(1):29-40.
220. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, Goldstein JA. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics.* 2001;11(7):597-607.
221. Soyama A, Saito Y, Hanioka N, Murayama N, Nakajima O, Katori N, Ishida S, Sai K, Ozawa S, Sawada JI. Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(12):1427-1430.

222. Tyndale RF, Pianezza ML, Sellers EM. A common genetic defect in nicotine metabolism decreases risk for dependence and lowers cigarette consumption. *Nicotine Tob Res.* 1999;1 Suppl 2:S63-67; discussion S69-70.
223. Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature.* 1998;393(6687):750.
224. Kamataki T, Nunoya K, Sakai Y, Kushida H, Fujita K. Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer. *Mutat Res.* 1999;428(1-2):125-130.
225. Miyamoto M, Umetsu Y, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, Nemoto N, Sato K, Ariyoshi N, Kamataki T. CYP2A6 gene deletion reduces susceptibility to lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261(3):658-660.
226. Raunio H, Rautio A, Gullsten H, Pelkonen O. Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol.* 2001;52(4):357-363.
227. London SJ, Idle JR, Daly AK, Coetzee GA. Genetic variation of CYP2A6, smoking, and risk of cancer. *Lancet.* 1999;353(9156):898-899.
228. Schulz TG, Ruhnau P, Hallier E. Lack of correlation between CYP2A6 genotype and smoking habits. *Adv Exp Med Biol.* 2001;500:213-215.
229. Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics.* 2001;11(5):399-415.
230. Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Homozygous CYP2B6 *6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(4):1322-1326.
231. Rotger M, Colombo S, Furrer H, Bleiber G, Buclin T, Lee BL, Keiser O, Biollaz J, Decosterd L, Telenti A. Influence of CYP2B6 polymorphism on plasma and intracellular concentrations and toxicity of efavirenz and nevirapine in HIV-infected patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(1):1-5.
232. Crettol S, Deglon JJ, Besson J, Croquette-Krokar M, Gothuey I, Hammig R, Monnat M, Huttemann H, Baumann P, Eap CB. Methadone enantiomer plasma levels, CYP2B6, CYP2C19, and CYP2C9 genotypes, and response to treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(6):593-604.
233. Eap CB, Crettol S, Rougier JS, Schlapfer J, Sintra Grilo L, Deglon JJ, Besson J, Croquette-Krokar M, Carrupt PA, Abriel H. Stereoselective block of hERG channel by (S)-methadone and QT interval prolongation in CYP2B6 slow metabolizers. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(5):719-728.
234. Lee SJ, Goldstein JA. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmacogenomics.* 2005;6(4):357-371.
235. Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(1):82-91.
236. Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro RM, Garcia-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, Agundez JA. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71(3):196-204.

237. Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, Weinryb I, Guida M, Hopkins PJ, Warner N, Hall J. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;66(3):288-294.
238. Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, Huang JD. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(3):268-273.
239. Lee SJ, Usmani KA, Chanas B, Ghanayem B, Xi T, Hodgson E, Mohrenweiser HW, Goldstein JA. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics.* 2003;13(8):461-472.
240. Quaranta S, Chevalier D, Allorge D, Lo-Guidice JM, Migot-Nabias F, Kenani A, Imbenotte M, Broly F, Lacarelle B, Lhermitte M. Ethnic differences in the distribution of CYP3A5 gene polymorphisms. *Xenobiotica.* 2006;36(12):1191-1200.
241. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics.* 2004;5(3):243-272.
242. Kim KA, Park PW, Lee OJ, Kang DK, Park JY. Effect of polymorphic CYP3A5 genotype on the single-dose simvastatin pharmacokinetics in healthy subjects. *J Clin Pharmacol.* 2007;47(1):87-93.
243. Goto M, Masuda S, Kiuchi T, Ogura Y, Oike F, Okuda M, Tanaka K, Inui K. CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics.* 2004;14(7):471-478.
244. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics.* 2004;14(3):147-154.
245. Min DI, Ellingrod VL, Marsh S, McLeod H. CYP3A5 polymorphism and the ethnic differences in cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit.* 2004;26(5):524-528.
246. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, Pitkala K, Tilvis R, Fromm MF, Schwab M, Eichelbaum M, Strandberg T. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2004;14(8):523-525.
247. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics.* 2001;11(9):773-779.
248. Wojnowski L, Turner PC, Pedersen B, Hustert E, Brockmoller J, Mendy M, Whittle HC, Kirk G, Wild CP. Increased levels of aflatoxin-albumin adducts are associated with CYP3A5 polymorphisms in The Gambia, West Africa. *Pharmacogenetics.* 2004;14(10):691-700.
249. Roy JN, Lajoie J, Zijenah LS, Barama A, Poirier C, Ward BJ, Roger M. CYP3A5 genetic polymorphisms in different ethnic populations. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(7):884-887.
250. de Silva JA. Analytical strategies for therapeutic monitoring of drugs in biological fluids. *J Chromatogr.* 1985;340:3-30.

251. Crespi CL. Xenobiotic-metabolizing Human Cells as Tools for Pharmacological and Toxicological Research. *Advances in drug research*. 1995;26:179-235.
252. Shou M, Lin Y, Lu P, Tang C, Mei Q, Cui D, Tang W, Ngui JS, Lin CC, Singh R, Wong BK, Yergey JA, Lin JH, Pearson PG, Baillie TA, Rodrigues AD, Rushmore TH. Enzyme kinetics of cytochrome P450-mediated reactions. *Curr Drug Metab*. 2001;2(1):17-36.
253. Huang MT, Chang RL, Fortner JG, Conney AH. Studies on the mechanism of activation of microsomal benzo[a]pyrene hydroxylation by flavonoids. *J Biol Chem*. 1981;256(13):6829-6836.
254. Schwab GE, Raucy JL, Johnson EF. Modulation of rabbit and human hepatic cytochrome P-450-catalyzed steroid hydroxylations by alpha-naphthoflavone. *Mol Pharmacol*. 1988;33(5):493-499.
255. Shou M, Dai R, Cui D, Korzekwa KR, Baillie TA, Rushmore TH. A kinetic model for the metabolic interaction of two substrates at the active site of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem*. 2001;276(3):2256-2262.
256. Galetin A, Clarke SE, Houston JB. Quinidine and haloperidol as modifiers of CYP3A4 activity: multisite kinetic model approach. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(12):1512-1522.
257. He YA, Roussel F, Halpert JR. Analysis of homotropic and heterotropic cooperativity of diazepam oxidation by CYP3A4 using site-directed mutagenesis and kinetic modeling. *Arch Biochem Biophys*. 2003;409(1):92-101.
258. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:1-17.
259. Maenpaa J, Hall SD, Ring BJ, Strom SC, Wrighton SA. Human cytochrome P450 3A (CYP3A) mediated midazolam metabolism: the effect of assay conditions and regioselective stimulation by alpha-naphthoflavone, terfenadine and testosterone. *Pharmacogenetics*. 1998;8(2):137-155.
260. Schrag ML, Wienkers LC. Topological alteration of the CYP3A4 active site by the divalent cation Mg(2+). *Drug Metab Dispos*. 2000;28(10):1198-1201.
261. Schenkman JB, Jansson I. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther*. 2003;97(2):139-152.
262. Hlavica P. On the function of cytochrome b5 in the cytochrome P-450-dependent oxygenase system. *Arch Biochem Biophys*. 1984;228(2):600-608.
263. Imai Y, Sato R. The roles of cytochrome b5 in a reconstituted N-demethylase system containing cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;75(2):420-426.
264. Loughran PA, Roman LJ, Miller RT, Masters BS. The kinetic and spectral characterization of the E. coli-expressed mammalian CYP4A7: cytochrome b5 effects vary with substrate. *Arch Biochem Biophys*. 2001;385(2):311-321.
265. Lipscomb JD, Sligar SG, Namtvedt MJ, Gunsalus IC. Autooxidation and hydroxylation reactions of oxygenated cytochrome P-450cam. *J Biol Chem*. 1976;251(4):1116-1124.
266. Yamaori S, Yamazaki H, Suzuki A, Yamada A, Tani H, Kamidate T, Fujita K, Kamataki T. Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(12):2333-2340.
267. Yamazaki H, Ueng YF, Shimada T, Guengerich FP. Roles of divalent metal ions in oxidations catalyzed by recombinant cytochrome P450 3A4 and

- replacement of NADPH--cytochrome P450 reductase with other flavoproteins, ferredoxin, and oxygen surrogates. *Biochemistry*. 1995;34(26):8380-8389.
268. Gillam EM, Guo Z, Ueng YF, Yamazaki H, Cock I, Reilly PE, Hooper WD, Guengerich FP. Expression of cytochrome P450 3A5 in *Escherichia coli*: effects of 5' modification, purification, spectral characterization, reconstitution conditions, and catalytic activities. *Arch Biochem Biophys*. 1995;317(2):374-384.
269. Yamazaki H, Johnson WW, Ueng YF, Shimada T, Guengerich FP. Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome b5. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27438-27444.
270. Schenkman JB, Voznesensky AI, Jansson I. Influence of ionic strength on the P450 monooxygenase reaction and role of cytochrome b5 in the process. *Arch Biochem Biophys*. 1994;314(1):234-241.
271. Jansson I, Schenkman JB. Substrate influence on interaction between cytochrome P450 and cytochrome b5 in microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1996;325(2):265-269.
272. Kumar S, Davydov DR, Halpert JR. Role of cytochrome B5 in modulating peroxide-supported cyp3a4 activity: evidence for a conformational transition and cytochrome P450 heterogeneity. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(8):1131-1136.
273. Yamada M, Ohta Y, Bachmanova GI, Nishimoto Y, Archakov AI, Kawato S. Dynamic interactions of rabbit liver cytochromes P450IA2 and P450IIB4 with cytochrome b5 and NADPH-cytochrome P450 reductase in proteoliposomes. *Biochemistry*. 1995;34(32):10113-10119.
274. Houston JB, Kenworthy KE. In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(3):246-254.
275. Tracy TS. Atypical cytochrome p450 kinetics: implications for drug discovery. *Drugs R D*. 2006;7(6):349-363.
276. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol*. 1989;36(1):89-96.
277. Ghosal A, Satoh H, Thomas PE, Bush E, Moore D. Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450. *Drug Metab Dispos*. 1996;24(9):940-947.
278. Shou M, Mei Q, Ettore MW, Jr., Dai R, Baillie TA, Rushmore TH. Sigmoidal kinetic model for two co-operative substrate-binding sites in a cytochrome P450 3A4 active site: an example of the metabolism of diazepam and its derivatives. *Biochem J*. 1999;340 (Pt 3):845-853.
279. Mansuy D, Gans P, Chottard JC, Bartoli JF. Nitrosoalkanes as Fe(II) ligands in the 455-nm-absorbing cytochrome P-450 complexes formed from nitroalkanes in reducing conditions. *Eur J Biochem*. 1977;76(2):607-615.
280. Silverman RB. The potential use of mechanism-based enzyme inactivators in medicine. *J Enzyme Inhib*. 1988;2(2):73-90.
281. Rando RR. Mechanism-based enzyme inactivators. *Pharmacol Rev*. 1984;36(2):111-142.

282. Silverman R. *Mechanism-based enzyme inactivation; Chemistry and Enzymology*. Vol 1: CRC Press: Boca Raton, FL; 1988.
283. Correia MA, Ortiz de Montellano PR. *Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes*. In *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. . Third edition ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2005.
284. Franklin MR. The influence of cytochrome P-450 induction on the metabolic formation of 455-NM complexes from amphetamines. *Drug Metab Dispos*. 1974;2(3):321-326.
285. James RC, Franklin MR. Comparisons of the formation of cytochrome P-450 complexes absorbing at 455 nm in rabbit and rat microsomes. *Biochem Pharmacol*. 1975;24(8):835-838.
286. Buening MK, Franklin MR. The formation of cytochrome P-450-metabolic intermediate complexes in microsomal fractions from extrahepatic tissues of the rabbit. *Drug Metab Dispos*. 1976;4(6):556-561.
287. Kasahara M, Suzuki H, Komiya I. Studies on the cytochrome P450 (CYP)-mediated metabolic properties of miocamycin: evaluation of the possibility of a metabolic intermediate complex formation with CYP, and identification of the human CYP isoforms. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(4):409-417.
288. Pessayre D, Descatoire V, Konstantinova-Mitcheva M, Wandscheer JC, Cobert B, Level R, Benhamou PJ, Jaouen M, Mansuy D. Self-induction by triacetyloleandomycin of its own transformation into a metabolite forming a stable 456 nm-absorbing complex with cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol*. 1981;30(6):553-558.
289. Pessayre D, Descatoire V, Tinel M, Larrey D. Self-induction by oleandomycin of its own transformation into a metabolite forming an inactive complex with reduced cytochrome P-450. Comparison with troleandomycin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982;221(1):215-221.
290. Danan G, Descatoire V, Pessayre D. Self-induction by erythromycin of its own transformation into a metabolite forming an inactive complex with reduced cytochrome P-450. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;218(2):509-514.
291. Correia MA. Cytochrome P450 turnover. *Methods Enzymol*. 1991;206:315-325.
292. Roberts BJ. Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation. *J Biol Chem*. 1997;272(15):9771-9778.
293. Roberts BJ, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE. Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J Biol Chem*. 1995;270(50):29632-29635.
294. Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P, Guzelian PS. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture. *J Biol Chem*. 1986;261(14):6264-6271.
295. Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Induction of rat hepatic N-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem*. 1989;264(6):3568-3572.
296. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev*. 1998;50(3):387-412.
297. Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:389-430.

298. Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, Chan E, Duan W, Huang M, McLeod HL. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(3):279-304.
299. Lin JH, Lu AY. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 1998;35(5):361-390.
300. Bartkowski RR, Goldberg ME, Larijani GE, Boerner T. Inhibition of alfentanil metabolism by erythromycin. *Clin Pharmacol Ther.* 1989;46(1):99-102.
301. Okudaira T, Kotegawa T, Imai H, Tsutsumi K, Nakano S, Ohashi K. Effect of the treatment period with erythromycin on cytochrome P450 3A activity in humans. *J Clin Pharmacol.* 2007;47(7):871-876.
302. Masubuchi Y, Horie T. Toxicological significance of mechanism-based inactivation of cytochrome p450 enzymes by drugs. *Crit Rev Toxicol.* 2007;37(5):389-412.
303. Miura T, Iwasaki M, Komori M, Ohi H, Kitada M, Mitsui H, Kamataki T. Decrease in a constitutive form of cytochrome P-450 by macrolide antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1989;24(4):551-559.
304. Lindstrom TD, Hanssen BR, Wrighton SA. Cytochrome P-450 complex formation by dirithromycin and other macrolides in rat and human livers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(2):265-269.
305. Larrey D, Tinel M, Pessayre D. Formation of inactive cytochrome P-450 Fe(II)-metabolite complexes with several erythromycin derivatives but not with josamycin and midecamycin in rats. *Biochem Pharmacol.* 1983;32(9):1487-1493.
306. Delaforge M, Sartori E, Mansuy D. In vivo and in vitro effects of a new macrolide antibiotic roxithromycin on rat liver cytochrome P-450: comparison with troleandomycin and erythromycin. *Chem Biol Interact.* 1988;68(3-4):179-188.
307. Wang YH, Jones DR, Hall SD. Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(5):664-671.
308. McConn DJ, 2nd, Lin YS, Allen K, Kunze KL, Thummel KE. Differences in the inhibition of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by metabolite-inhibitor complex-forming drugs. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(10):1083-1091.
309. Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, Mayhew BS, Rider S, Hall SD. Diltiazem inhibition of cytochrome P-450 3A activity is due to metabolite intermediate complex formation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290(3):1116-1125.
310. Ma B, Prueksaritanont T, Lin JH. Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(2):125-130.
311. Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Li C, Wang G. Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2007;29(6):687-710.
312. Lave T, Coassolo P, Reigner B. Prediction of hepatic metabolic clearance based on interspecies allometric scaling techniques and in vitro-in vivo correlations. *Clin Pharmacokinet.* 1999;36(3):211-231.
313. Houston JB. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(9):1469-1479.

314. Mayhew BS, Jones DR, Hall SD. An in vitro model for predicting in vivo inhibition of cytochrome P450 3A4 by metabolic intermediate complex formation. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(9):1031-1037.
315. Pinto AG, Wang YH, Chalasani N, Skaar T, Kolwankar D, Gorski JC, Liangpunsakul S, Hamman MA, Arefayene M, Hall SD. Inhibition of human intestinal wall metabolism by macrolide antibiotics: effect of clarithromycin on cytochrome P450 3A4/5 activity and expression. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(3):178-188.
316. Gascon MP, Dayer P. In vitro forecasting of drugs which may interfere with the biotransformation of midazolam. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;41(6):573-578.
317. Olkkola KT, Aranko K, Luurila H, Hiller A, Saarnivaara L, Himberg JJ, Neuvonen PJ. A potentially hazardous interaction between erythromycin and midazolam. *Clin Pharmacol Ther.* 1993;53(3):298-305.
318. Franklin MR. Inhibition of mixed-function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P-450 metabolic-intermediate complexes. *Pharmacology & Therapeutics.* 1977;2:227-245.
319. Ernest CS, 2nd, Hall SD, Jones DR. Mechanism-based inactivation of CYP3A by HIV protease inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(2):583-591.
320. Yamazaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm Res.* 1996;13(4):497-513.
321. Montamat SC, Abernethy DR. N-monodesmethyl diltiazem is the predominant metabolite of diltiazem in the plasma of young and elderly hypertensives. *Br J Clin Pharmacol.* 1987;24(2):185-189.
322. Bensoussan C, Delaforge M, Mansuy D. Particular ability of cytochromes P450 3A to form inhibitory P450-iron-metabolite complexes upon metabolic oxidation of aminodugs. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(5):591-602.
323. Rodrigues AD, Wong SL. Application of human liver microsomes in metabolism-based drug-drug interactions: in vitro-in vivo correlations and the Abbott Laboratories experience. *Adv Pharmacol.* 1997;43:65-101.
324. Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res.* 2001;89(9):753-762.
325. Zordoky BN, El-Kadi AO. Modulation of cardiac and hepatic cytochrome P450 enzymes during heart failure. *Curr Drug Metab.* 2008;9(2):122-128.
326. Elbekai RH, El-Kadi AO. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther.* 2006;112(2):564-587.
327. Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet.* 2000;355(9208):979-983.
328. Delozier TC, Kissling GE, Coulter SJ, Dai D, Foley JF, Bradbury JA, Murphy E, Steenbergen C, Zeldin DC, Goldstein JA. Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(4):682-688.
329. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H, Satoh H, Akatsu T, Iwasaka J, Masuda T, Hiramori K. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond).* 2002;102(4):381-386.
330. Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW. Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(11):5121-5126.

331. Walles M, Thum T, Levsen K, Borlak J. Verapamil: new insight into the molecular mechanism of drug oxidation in the human heart. *J Chromatogr A*. 2002;970(1-2):117-130.
332. Thum T, Borlak J. Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. *Faseb J*. 2002;16(12):1537-1549.
333. Borlak J, Walles M, Levsen K, Thum T. Verapamil: metabolism in cultures of primary human coronary arterial endothelial cells. *Drug Metab Dispos*. 2003;31(7):888-891.
334. Kikuta Y, Sogawa K, Haniu M, Kinoshita M, Kusunose E, Nojima Y, Yamamoto S, Ichihara K, Kusunose M, Fujii-Kuriyama Y. A novel species of cytochrome P-450 (P-450ib) specific for the small intestine of rabbits. cDNA cloning and its expression in COS cells. *J Biol Chem*. 1991;266(27):17821-17825.
335. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem*. 1996;271(7):3460-3468.
336. Ma J, Ramachandran S, Fiedorek FT, Jr., Zeldin DC. Mapping of the CYP2J cytochrome P450 genes to human chromosome 1 and mouse chromosome 4. *Genomics*. 1998;49(1):152-155.
337. Wu S, Chen W, Murphy E, Gabel S, Tomer KB, Foley J, Steenbergen C, Falck JR, Moomaw CR, Zeldin DC. Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12551-12559.
338. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285(5431):1276-1279.
339. Zeldin DC, Foley J, Ma J, Boyle JE, Pascual JM, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S. CYP2J subfamily P450s in the lung: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol*. 1996;50(5):1111-1117.
340. Zeldin DC, Foley J, Boyle JE, Moomaw CR, Tomer KB, Parker C, Steenbergen C, Wu S. Predominant expression of an arachidonate epoxygenase in islets of Langerhans cells in human and rat pancreas. *Endocrinology*. 1997;138(3):1338-1346.
341. Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, Wu S. CYP2J subfamily cytochrome P450s in the gastrointestinal tract: expression, localization, and potential functional significance. *Mol Pharmacol*. 1997;51(6):931-943.
342. Matsumoto S, Hiramata T, Kim HJ, Nagata K, Yamazoe Y. In vitro inhibition of human small intestinal and liver microsomal astemizole O-demethylation: different contribution of CYP2J2 in the small intestine and liver. *Xenobiotica*. 2003;33(6):615-623.
343. Yamazaki H, Okayama A, Imai N, Guengerich FP, Shimizu M. Inter-individual variation of cytochrome P4502J2 expression and catalytic activities in liver microsomes from Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica*. 2006;36(12):1201-1209.
344. Zimmermann M, Duruz H, Guinand O, Broccard O, Levy P, Lacatis D, Bloch A. Torsades de Pointes after treatment with terfenadine and ketoconazole. *Eur Heart J*. 1992;13(7):1002-1003.

345. Herings RM, Stricker BH, Leufkens HG, Bakker A, Sturmans F, Urquhart J. Public health problems and the rapid estimation of the size of the population at risk. Torsades de pointes and the use of terfenadine and astemizole in The Netherlands. *Pharm World Sci.* 1993;15(5):212-218.
346. Tran HT. Torsades de pointes induced by nonantiarrhythmic drugs. *Conn Med.* 1994;58(5):291-295.
347. Hey JA, del Prado M, Kreutner W, Egan RW. Cardiotoxic and drug interaction profile of the second generation antihistamines ebastine and terfenadine in an experimental animal model of torsade de pointes. *Arzneimittelforschung.* 1996;46(2):159-163.
348. Hanrahan JP, Choo PW, Carlson W, Greineder D, Faich GA, Platt R. Terfenadine-associated ventricular arrhythmias and QTc interval prolongation. A retrospective cohort comparison with other antihistamines among members of a health maintenance organization. *Ann Epidemiol.* 1995;5(3):201-209.
349. Quilley J, Fulton D, McGiff JC. Hyperpolarizing factors. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(10):1059-1070.
350. Weintraub NL, Fang X, Kaduce TL, VanRollins M, Chatterjee P, Spector AA. Potentiation of endothelium-dependent relaxation by epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res.* 1997;81(2):258-267.
351. Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol.* 1994;481 (Pt 2):407-414.
352. Miura H, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res.* 1998;83(5):501-507.
353. Bauersachs J, Hecker M, Busse R. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *Br J Pharmacol.* 1994;113(4):1548-1553.
354. Fulton D, Mahboubi K, McGiff JC, Quilley J. Cytochrome P450-dependent effects of bradykinin in the rat heart. *Br J Pharmacol.* 1995;114(1):99-102.
355. Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. In vivo location and mechanism of EDHF-mediated vasodilation in canine coronary microcirculation. *Am J Physiol.* 1999;277(3 Pt 2):H1252-1259.
356. Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Fleming I, Busse R. A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol.* 1996;497 (Pt 3):699-709.
357. Singer HA, Saye JA, Peach MJ. Effects of cytochrome P-450 inhibitors on endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta. *Blood Vessels.* 1984;21(5):223-230.
358. Pinto A, Abraham NG, Mullane KM. Arachidonic acid-induced endothelial-dependent relaxations of canine coronary arteries: contribution of a cytochrome P-450-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;240(3):856-863.
359. Abraham NG, Pinto A, Mullane KM, Levere RD, Spokas E. Presence of cytochrome P-450-dependent monooxygenase in intimal cells of the hog aorta. *Hypertension.* 1985;7(6 Pt 1):899-904.

360. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Nature of endothelium-derived relaxing factor: are there two relaxing mediators? *Circ Res.* 1987;61(5 Pt 2):II61-67.
361. Johnson AR, Revtyak G, Campbell WB. Arachidonic acid metabolites and endothelial injury: studies with cultures of human endothelial cells. *Fed Proc.* 1985;44(1 Pt 1):19-24.
362. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996;78(3):415-423.
363. Rosolowsky M, Campbell WB. Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1299(2):267-277.
364. Gauthier KM, Yang W, Gross GJ, Campbell WB. Roles of epoxyeicosatrienoic acids in vascular regulation and cardiac preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50(6):601-608.
365. Spiecker M, Liao JK. Vascular protective effects of cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Arch Biochem Biophys.* 2005;433(2):413-420.
366. Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13(3):273-283.
367. Yang B, Graham L, Dikalov S, Mason RP, Falck JR, Liao JK, Zeldin DC. Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 2001;60(2):310-320.
368. Node K, Ruan XL, Dai J, Yang SX, Graham L, Zeldin DC, Liao JK. Activation of Galpha s mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids. *J Biol Chem.* 2001;276(19):15983-15989.
369. Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation.* 1996;94(12):3341-3347.
370. Bondy SC, Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 1994;48(1):155-159.
371. Coon MJ, Ding XX, Pernecky SJ, Vaz AD. Cytochrome P450: progress and predictions. *Faseb J.* 1992;6(2):669-673.
372. Puntarulo S, Cederbaum AI. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(7-8):1324-1330.
373. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res.* 2001;88(1):44-51.
374. Wu D, Cederbaum AI. Removal of glutathione produces apoptosis and necrosis in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25(4):619-628.
375. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology.* 2002;35(1):62-73.

376. Nieto N, Friedman SL, Greenwel P, Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999;30(4):987-996.
377. Thum T, Borlak J. Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Br J Pharmacol*. 2000;130(8):1745-1752.
378. Kerzee JK, Ramos KS. Constitutive and inducible expression of Cyp1a1 and Cyp1b1 in vascular smooth muscle cells: role of the Ahr bHLH/PAS transcription factor. *Circ Res*. 2001;89(7):573-582.
379. Korashy HM, El-Kadi AO. The role of aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Drug Metab Rev*. 2006;38(3):411-450.
380. Granberg AL, Brunstrom B, Brandt I. Cytochrome P450-dependent binding of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and benzo[a]pyrene (B[a]P) in murine heart, lung, and liver endothelial cells. *Arch Toxicol*. 2000;74(10):593-601.
381. Aboutabl ME, El-Kadi AO. Constitutive expression and inducibility of CYP1A1 in the H9c2 rat cardiomyoblast cells. *Toxicol In Vitro*. 2007;21(8):1686-1691.
382. Satoh M, Matter CM, Ogita H, Takeshita K, Wang CY, Dorn GW, 2nd, Liao JK. Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1 and prevention of congestive heart failure by estrogen. *Circulation*. 2007;115(25):3197-3204.
383. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Rosselli M, Barchiesi F, Krust A, Keller H, Zacharia LC, Imthurn B. Cytochromes 1A1/1B1- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites mediate estradiol-induced antimitogenesis in human cardiac fibroblast. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(1):247-255.
384. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*. 1999;401(6752):493-497.
385. Enayetallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant DF. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(4):447-454.
386. Fisslthaler B, Hinsch N, Chataigneau T, Popp R, Kiss L, Busse R, Fleming I. Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension*. 2000;36(2):270-275.
387. Flaherty JT, Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 1988;5(5-6):409-419.
388. Granville DJ, Tashakkor B, Takeuchi C, Gustafsson AB, Huang C, Sayen MR, Wentworth P, Jr., Yeager M, Gottlieb RA. Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(5):1321-1326.
389. Hunter AL, Bai N, Laher I, Granville DJ. Cytochrome p450 2C inhibition reduces post-ischemic vascular dysfunction. *Vascul Pharmacol*. 2005;43(4):213-219.
390. Khan M, Mohan IK, Kutala VK, Kumbala D, Kuppusamy P. Cardioprotection by sulfaphenazole, a cytochrome p450 inhibitor: mitigation of ischemia-reperfusion injury by scavenging of reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(3):813-821.

391. Thum T, Borlak J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein-induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism? *Circ Res*. 2004;94(1):e1-13.
392. Morel Y, Barouki R. Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J Biol Chem*. 1998;273(41):26969-26976.
393. Medhora M, Daniels J, Munday K, Fisslthaler B, Busse R, Jacobs ER, Harder DR. Epoxygenase-driven angiogenesis in human lung microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(1):H215-224.
394. Michaelis UR, Fisslthaler B, Medhora M, Harder D, Fleming I, Busse R. Cytochrome P450 2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce angiogenesis via cross-talk with the epidermal growth factor receptor (EGFR). *Faseb J*. 2003;17(6):770-772.
395. Fisslthaler B, Michaelis UR, Randriamboavonjy V, Busse R, Fleming I. Cytochrome P450 epoxygenases and vascular tone: novel role for HMG-CoA reductase inhibitors in the regulation of CYP 2C expression. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1619(3):332-339.
396. Yasar U, Bennet AM, Eliasson E, Lundgren S, Wiman B, De Faire U, Rane A. Allelic variants of cytochromes P450 2C modify the risk for acute myocardial infarction. *Pharmacogenetics*. 2003;13(12):715-720.
397. Bieche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P, de Waziers I. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(9):731-742.
398. Seubert J, Yang B, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Gabel S, Gooch R, Foley J, Newman J, Mao L, Rockman HA, Hammock BD, Murphy E, Zeldin DC. Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway. *Circ Res*. 2004;95(5):506-514.
399. Ke Q, Xiao YF, Bradbury JA, Graves JP, Degraff LM, Seubert JM, Zeldin DC. Electrophysiological properties of cardiomyocytes isolated from CYP2J2 transgenic mice. *Mol Pharmacol*. 2007;72(4):1063-1073.
400. Xiao YF, Huang L, Morgan JP. Cytochrome P450: a novel system modulating Ca²⁺ channels and contraction in mammalian heart cells. *J Physiol*. 1998;508 (Pt 3):777-792.
401. Xiao YF, Ke Q, Seubert JM, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Falck JR, Krausz K, Gelboin HV, Morgan JP, Zeldin DC. Enhancement of cardiac L-type Ca²⁺ currents in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of CYP2J2. *Mol Pharmacol*. 2004;66(6):1607-1616.
402. Spiecker M, Darius H, Hankeln T, Soufi M, Sattler AM, Schaefer JR, Node K, Borgel J, Mugge A, Lindpaintner K, Huesing A, Maisch B, Zeldin DC, Liao JK. Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2. *Circulation*. 2004;110(15):2132-2136.
403. Liu PY, Li YH, Chao TH, Wu HL, Lin LJ, Tsai LM, Chen JH. Synergistic effect of cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2*7 polymorphism with smoking on the onset of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):199-206.
404. Lee CR, North KE, Bray MS, Couper DJ, Heiss G, Zeldin DC. CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis

- Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(5):349-358.
405. Marciante KD, Totah RA, Heckbert SR, Smith NL, Lemaitre RN, Lumley T, Rice KM, Hindorff LA, Bis JC, Hartman B, Psaty BM. Common variation in cytochrome P450 epoxygenase genes and the risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(6):535-543.
406. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998;83(2):117-132.
407. Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev*. 2001;81(4):1461-1497.
408. Okita RT, Okita JR. Cytochrome P450 4A fatty acid omega hydroxylases. *Curr Drug Metab*. 2001;2(3):265-281.
409. Ito O, Alonso-Galicia M, Hopp KA, Roman RJ. Localization of cytochrome P-450 4A isoforms along the rat nephron. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 2):F395-404.
410. Graham RA, Goodwin B, Merrihew RV, Krol WL, Lecluyse EL. Cloning, tissue expression, and regulation of beagle dog CYP4A genes. *Toxicol Sci*. 2006;92(2):356-367.
411. McGiff JC, Quilley CP, Carroll MA. The contribution of cytochrome P450-dependent arachidonate metabolites to integrated renal function. *Steroids*. 1993;58(12):573-579.
412. Harder DR, Campbell WB, Roman RJ. Role of cytochrome P-450 enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *J Vasc Res*. 1995;32(2):79-92.
413. Rahman M, Wright JT, Jr., Douglas JG. The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review. *Am J Hypertens*. 1997;10(3):356-365.
414. Chen P, Guo M, Wygle D, Edwards PA, Falck JR, Roman RJ, Scieli AG. Inhibitors of cytochrome P450 4A suppress angiogenic responses. *Am J Pathol*. 2005;166(2):615-624.
415. Lin F, Rios A, Falck JR, Belosludtsev Y, Schwartzman ML. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid is formed in response to EGF and is a mitogen in rat proximal tubule. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 2):F806-816.
416. Muthalif MM, Benter IF, Karzoun N, Fatima S, Harper J, Uddin MR, Malik KU. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid mediates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12701-12706.
417. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):131-185.
418. Jiang M, Mezentsev A, Kemp R, Byun K, Falck JR, Miano JM, Nasjletti A, Abraham NG, Laniado-Schwartzman M. Smooth muscle--specific expression of CYP4A1 induces endothelial sprouting in renal arterial microvessels. *Circ Res*. 2004;94(2):167-174.
419. Ishizuka T, Ito O, Omata K, Ito S. [Role of androgens in the renal production of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in spontaneously hypertensive rats]. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 2004;46(7):685-692.

420. Gainer JV, Bellamine A, Dawson EP, Womble KE, Grant SW, Wang Y, Cupples LA, Guo CY, Demissie S, O'Donnell CJ, Brown NJ, Waterman MR, Capdevila JH. Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension. *Circulation*. 2005;111(1):63-69.
421. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*. 1998;273(9):4883-4891.
422. Walles M, Thum T, Levsen K, Borlak J. Verapamil metabolism in distinct regions of the heart and in cultures of cardiomyocytes of adult rats. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(5):761-768.
423. Zeltser D, Justo D, Halkin A, Prokhorov V, Heller K, Viskin S. Torsade de pointes due to noncardiac drugs: most patients have easily identifiable risk factors. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(4):282-290.
424. Khongphatthanayothin A, Lane J, Thomas D, Yen L, Chang D, Bubolz B. Effects of cisapride on QT interval in children. *J Pediatr*. 1998;133(1):51-56.
425. Hill SL, Evangelista JK, Pizzi AM, Mobassaleh M, Fulton DR, Berul CI. Proarrhythmia associated with cisapride in children. *Pediatrics*. 1998;101(6):1053-1056.
426. Wang SH, Lin CY, Huang TY, Wu WS, Chen CC, Tsai SH. QT interval effects of cisapride in the clinical setting. *Int J Cardiol*. 2001;80(2-3):179-183.
427. Kyrmizakis DE, Chimona TS, Kanoupakis EM, Papadakis CE, Velegrakis GA, Helidonis ES. QT prolongation and torsades de pointes associated with concurrent use of cisapride and erythromycin. *Am J Otolaryngol*. 2002;23(5):303-307.
428. Piquette RK. Torsade de pointes induced by cisapride/clarithromycin interaction. *Ann Pharmacother*. 1999;33(1):22-26.
429. Hoover CA, Carmichael JK, Nolan PE, Jr., Marcus FI. Cardiac Arrest Associated With Combination Cisapride and Itraconazole Therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 1996;1(3):255-258.
430. Michalets EL, Williams CR. Drug interactions with cisapride: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2000;39(1):49-75.
431. Chan-Tompkins NH, Babinchak TJ. Cardiac arrhythmias associated with coadministration of azole compounds and cisapride. *Clin Infect Dis*. 1997;24(6):1285.
432. Djeddi D, Kongolo G, Lefaix C, Mounard J, Leke A. Effect of domperidone on QT interval in neonates. *J Pediatr*. 2008;153(5):663-666.
433. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation*. 2000;102(16):1883-1885.
434. Huizing G, Brouwers J, Westhuis P. Plasma drug concentration and prolactin release after acute and subchronic oral administration of domperidone and metoclopramide. In: Merkus F, ed. *The Serum Concentration of Drugs*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1980:271-277.; 1980.
435. Heykants J, Hendriks R, Meuldermans W, Michiels M, Scheygrond H, Reyntjens H. On the pharmacokinetics of domperidone in animals and man. IV. The pharmacokinetics of intravenous domperidone and its bioavailability

- in man following intramuscular, oral and rectal administration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1981;6(1):61-70.
436. Wu MS, Gao L, Cai XH, Wang GJ. Determination of domperidone in human plasma by LC-MS and its pharmacokinetics in healthy Chinese volunteers. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23(3):285-288.
437. Barone JA. Domperidone: a peripherally acting dopamine2-receptor antagonist. *Ann Pharmacother.* 1999;33(4):429-440.
438. Interaction between ketoconazole and domperidone and the risk of QT prolongation--important safety information. *S Afr Med J.* 2006;96(7):596.
439. Zou A, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti MC. Single HERG delayed rectifier K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol.* 1997;272(3 Pt 2):H1309-1314.
440. Zhang S, Zhou Z, Gong Q, Makielski JC, January CT. Mechanism of block and identification of the verapamil binding domain to HERG potassium channels. *Circ Res.* 1999;84(9):989-998.
441. Couture L, Nash JA, Turgeon J. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacol Rev.* 2006;58(2):244-258.
442. Faassen F, Vogel G, Spanings H, Vromans H. Caco-2 permeability, P-glycoprotein transport ratios and brain penetration of heterocyclic drugs. *Int J Pharm.* 2003;263(1-2):113-122.
443. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 1996;97(11):2517-2524.
444. El Ela AA, Hartter S, Schmitt U, Hiemke C, Spahn-Langguth H, Langguth P. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds--implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56(8):967-975.
445. Parkash R, Wee V, Gardner MJ, Cox JL, Thompson K, Brownell B, Anderson DR. The impact of warfarin use on clinical outcomes in atrial fibrillation: a population-based study. *Can J Cardiol.* 2007;23(6):457-461.
446. Wyse DG. Anticoagulation in atrial fibrillation: a contemporary viewpoint. *Heart Rhythm.* 2007;4(3 Suppl):S34-39.
447. Elias DJ, Topol EJ. Warfarin pharmacogenomics: a big step forward for individualized medicine: enlightened dosing of warfarin. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(5):532-534.
448. Flockhart DA, O'Kane D, Williams MS, Watson MS, Flockhart DA, Gage B, Gandolfi R, King R, Lyon E, Nussbaum R, O'Kane D, Schulman K, Veenstra D, Williams MS, Watson MS. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. *Genet Med.* 2008;10(2):139-150.
449. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on

- Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2006;114(7):e257-354.
450. Dipiro JT, Talbot RL, Yee GC, Wells BG, Posey LM. *PHARMACOTHERAPY: A pathophysiologic approach*. Fifth ed: McGraw-Hill Companies Inc; 2002.
 451. Wittkowsky AK. Effective anticoagulation therapy: defining the gap between clinical studies and clinical practice. *Am J Manag Care*. 2004;10(10 Suppl):S297-306; discussion S312-297.
 452. Hylek EM, D'Antonio J, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S. Translating the results of randomized trials into clinical practice: the challenge of warfarin candidacy among hospitalized elderly patients with atrial fibrillation. *Stroke*. 2006;37(4):1075-1080.
 453. Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C, Henault LE, Regan S. Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation*. 2007;115(21):2689-2696.
 454. Choudhry NK, Soumerai SB, Normand SL, Ross-Degnan D, Laupacis A, Anderson GM. Warfarin prescribing in atrial fibrillation: the impact of physician, patient, and hospital characteristics. *Am J Med*. 2006;119(7):607-615.
 455. Wysowski DK, Nourjah P, Swartz L. Bleeding complications with warfarin use: a prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Arch Intern Med*. 2007;167(13):1414-1419.
 456. Kirkwood TB. Calibration of reference thromboplastins and standardisation of the prothrombin time ratio. *Thromb Haemost*. 1983;49(3):238-244.
 457. Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):204S-233S.
 458. Trenk D, Althen H, Jahnchen E, Meinertz T, Oie S. Factors responsible for interindividual differences in the dose requirement of phenprocoumon. *Eur J Clin Pharmacol*. 1987;33(1):49-54.
 459. Hausteil KO. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral anticoagulants, especially phenprocoumon. *Semin Thromb Hemost*. 1999;25(1):5-11.
 460. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *Jama*. 2002;287(13):1690-1698.
 461. Rettie AE, Tai G. The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Mol Interv*. 2006;6(4):223-227.
 462. Kereveur A, Leclercq M, Trossaert M, Dupeyron JP, Parent F, Horellou MH, Conard J, Bachmann F, Samama MM. Vitamin K metabolism in a patient resistant to vitamin K antagonists. *Haemostasis*. 1997;27(4):168-173.
 463. O'Reilly RA. Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1974;16(2):348-354.

464. Wittkowsky AK. Warfarin and other coumarin derivatives: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug interactions. *Semin Vasc Med.* 2003;3(3):221-230.
465. Chan E, McLachlan AJ, Pegg M, MacKay AD, Cole RB, Rowland M. Disposition of warfarin enantiomers and metabolites in patients during multiple dosing with rac-warfarin. *Br J Clin Pharmacol.* 1994;37(6):563-569.
466. Kaminsky LS, Dunbar DA, Wang PP, Beaune P, Larrey D, Guengerich FP, Schnellmann RG, Sipes IG. Human hepatic cytochrome P-450 composition as probed by in vitro microsomal metabolism of warfarin. *Drug Metab Dispos.* 1984;12(4):470-477.
467. Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze KL, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T, Gelboin HV, Gonzalez FJ, Trager WF. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-450C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(1):54-59.
468. Furuya H, Fernandez-Salguero P, Gregory W, Taber H, Steward A, Gonzalez FJ, Idle JR. Genetic polymorphism of CYP2C9 and its effect on warfarin maintenance dose requirement in patients undergoing anticoagulation therapy. *Pharmacogenetics.* 1995;5(6):389-392.
469. Loebstein R, Yonath H, Peleg D, Almog S, Rotenberg M, Lubetsky A, Roitelman J, Harats D, Halkin H, Ezra D. Interindividual variability in sensitivity to warfarin--Nature or nurture? *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70(2):159-164.
470. Takahashi H, Kashima T, Nomizo Y, Muramoto N, Shimizu T, Nasu K, Kubota T, Kimura S, Echizen H. Metabolism of warfarin enantiomers in Japanese patients with heart disease having different CYP2C9 and CYP2C19 genotypes. *Clin Pharmacol Ther.* 1998;63(5):519-528.
471. Takahashi H, Wilkinson GR, Caraco Y, Muszkat M, Kim RB, Kashima T, Kimura S, Echizen H. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(3):253-263.
472. Linder MW, Looney S, Adams JE, 3rd, Johnson N, Antonino-Green D, Lacefield N, Bukaveckas BL, Valdes R, Jr. Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis.* 2002;14(3):227-232.
473. Steward DJ, Haining RL, Henne KR, Davis G, Rushmore TH, Trager WF, Rettie AE. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics.* 1997;7(5):361-367.
474. Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H. Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics.* 1998;8(5):365-373.
475. Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl ML, Gusella M, Padriani R. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72(6):702-710.
476. Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet Med.* 2005;7(2):97-104.

477. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*. 1999;353(9154):717-719.
478. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, Kim RB, Roden DM, Stein CM. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med*. 2008;358(10):999-1008.
479. Robinson DS, Benjamin DM, McCormack JJ. Interaction of warfarin and non-systemic gastrointestinal drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 1971;12(3):491-495.
480. Jahnchen E, Meinertz T, Gilfrich HJ, Kersting F, Groth U. Enhanced elimination of warfarin during treatment with cholestyramine. *Br J Clin Pharmacol*. 1978;5(5):437-440.
481. O'Reilly RA, Trager WF, Rettie AE, Goulart DA. Interaction of amiodarone with racemic warfarin and its separated enantiomorphs in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1987;42(3):290-294.
482. Heimark LD, Wienkers L, Kunze K, Gibaldi M, Eddy AC, Trager WF, O'Reilly RA, Goulart DA. The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1992;51(4):398-407.
483. Almog S, Shafran N, Halkin H, Weiss P, Farfel Z, Martinowitz U, Bank H. Mechanism of warfarin potentiation by amiodarone: dose- and concentration-dependent inhibition of warfarin elimination. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;28(3):257-261.
484. Naganuma M, Shiga T, Nishikata K, Tsuchiya T, Kasanuki H, Fujii E. Role of desethylamiodarone in the anticoagulant effect of concurrent amiodarone and warfarin therapy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2001;6(4):363-367.
485. O'Reilly RA. The stereoselective interaction of warfarin and metronidazole in man. *N Engl J Med*. 1976;295(7):354-357.
486. Purkins L, Wood N, Kleinermans D, Nichols D. Voriconazole potentiates warfarin-induced prothrombin time prolongation. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;56 Suppl 1:24-29.
487. Kerr HD. Case report: potentiation of warfarin by fluconazole. *Am J Med Sci*. 1993;305(3):164-165.
488. Gericke KR. Possible interaction between warfarin and fluconazole. *Pharmacotherapy*. 1993;13(5):508-509.
489. Trilli LE, Kelley CL, Aspinall SL, Kroner BA. Potential interaction between warfarin and fluvastatin. *Ann Pharmacother*. 1996;30(12):1399-1402.
490. Gaw A, Wosornu D. Simvastatin during warfarin therapy in hyperlipoproteinaemia. *Lancet*. 1992;340(8825):979-980.
491. Israel DS, Stotka J, Rock W, Sintek CD, Kamada AK, Klein C, Swaim WR, Pluhar RE, Toscano JP, Lettieri JT, Heller AH, Polk RE. Effect of ciprofloxacin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. *Clin Infect Dis*. 1996;22(2):251-256.
492. Ahmed A, Stephens JC, Kaus CA, Fay WP. Impact of preemptive warfarin dose reduction on anticoagulation after initiation of trimethoprim-sulfamethoxazole or levofloxacin. *J Thromb Thrombolysis*. 2007.
493. O'Reilly RA, Trager WF, Motley CH, Howald W. Interaction of secobarbital with warfarin pseudoracemates. *Clin Pharmacol Ther*. 1980;28(2):187-195.
494. Orme M, Breckenridge A. Enantiomers of warfarin and phenobarbital. *N Engl J Med*. 1976;295(26):1482-1483.

495. Hansen JM, Siersboek-Nielsen K, Skovsted L. Carbamazepine-induced acceleration of diphenylhydantoin and warfarin metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1971;12(3):539-543.
496. Heimark LD, Gibaldi M, Trager WF, O'Reilly RA, Goulart DA. The mechanism of the warfarin-rifampin drug interaction in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1987;42(4):388-394.
497. Grand'Maison A, Charest AF, Geerts WH. Anticoagulant use in patients with chronic renal impairment. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2005;5(5):291-305.
498. Rege B, Krieg R, Gao N, Sarkar MA. Down-regulation of hepatic CYP3A in chronic renal insufficiency. *Pharm Res.* 2003;20(10):1600-1606.
499. Dreisbach AW, Japa S, Gebrekal AB, Mowry SE, Lertora JJ, Kamath BL, Rettie AE. Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(5):475-477.
500. Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP, Pichette V. Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(11):1317-1320.
501. Wallin R, Hutson SM. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med.* 2004;10(7):299-302.
502. Jacobs LG. Warfarin pharmacology, clinical management, and evaluation of hemorrhagic risk for the elderly. *Cardiol Clin.* 2008;26(2):157-167, v.
503. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 2004;427(6974):541-544.
504. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappégard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* 2004;427(6974):537-541.
505. Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EG, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost.* 2005;93(1):23-26.
506. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.* 2005;352(22):2285-2293.
507. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood.* 2005;105(2):645-649.
508. Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N, Wallerman O, Melhus H, Wadelius C, Bentley D, Deloukas P. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(4):262-270.
509. Sconce E, Khan T, Mason J, Noble F, Wynne H, Kamali F. Patients with unstable control have a poorer dietary intake of vitamin K compared to patients with stable control of anticoagulation. *Thromb Haemost.* 2005;93(5):872-875.
510. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, Lu MJ, Hung CR, Wei CY, Chen CH, Wu JY, Chen YT. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet.* 2005;14(13):1745-1751.

511. Mushiroda T, Ohnishi Y, Saito S, Takahashi A, Kikuchi Y, Saito S, Shimomura H, Wanibuchi Y, Suzuki T, Kamatani N, Nakamura Y. Association of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients. *J Hum Genet.* 2006;51(3):249-253.
512. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Lorient MA. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood.* 2005;106(1):135-140.
513. Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JF, Chahid Y, van Geest-Daalderop JH, de Vries-Goldschmeding H, van Wijk EM, Egberts AC, de Boer A. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(1):13-22.
514. Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JF, van Meegen E, van der Meer FJ, van Wijk EM, Egberts AC, de Boer A. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and phenprocoumon anticoagulation status: interaction between both genotypes affects dose requirement. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(2):185-193.
515. Schelleman H, Chen Z, Kealey C, Whitehead AS, Christie J, Price M, Brensinger CM, Newcomb CW, Thorn CF, Samaha FF, Kimmel SE. Warfarin response and vitamin K epoxide reductase complex 1 in African Americans and Caucasians. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(5):742-747.
516. Limdi NA, McGwin G, Goldstein JA, Beasley TM, Arnett DK, Adler BK, Baird MF, Acton RT. Influence of CYP2C9 and VKORC1 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(2):312-321.
517. Reitsma PH, van der Heijden JF, Groot AP, Rosendaal FR, Buller HR. A C1173T dimorphism in the VKORC1 gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk. *PLoS Med.* 2005;2(10):e312.
518. Schwarz UI, Stein CM. Genetic determinants of dose and clinical outcomes in patients receiving oral anticoagulants. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(1):7-12.
519. Cha PC, Mushiroda T, Takahashi A, Saito S, Shimomura H, Suzuki T, Kamatani N, Nakamura Y. High-resolution SNP and haplotype maps of the human gamma-glutamyl carboxylase gene (GGCX) and association study between polymorphisms in GGCX and the warfarin maintenance dose requirement of the Japanese population. *J Hum Genet.* 2007;52(10):856-864.
520. Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Haemost.* 2007;5(11):2227-2234.
521. Franco V, Polanczyk CA, Clausell N, Rohde LE. Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *Am J Med.* 2004;116(10):651-656.
522. Shetty HG, Fennerty AG, Routledge PA. Clinical pharmacokinetic considerations in the control of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacokinet.* 1989;16(4):238-253.
523. Bechtold H, Andrassy K, Jahnchen E, Koderisch J, Koderisch H, Weilemann LS, Sonntag HG, Ritz E. Evidence for impaired hepatic vitamin K1 metabolism in patients treated with N-methyl-thiotetrazole cephalosporins. *Thromb Haemost.* 1984;51(3):358-361.

524. Owens JC, Neely WB, Owen WR. Effect of sodium dextrothyroxine in patients receiving anticoagulants. *N Engl J Med.* 1962;266:76-79.
525. Dale J, Myhre E, Loew D. Bleeding during acetylsalicylic acid and anticoagulant therapy in patients with reduced platelet reactivity after aortic valve replacement. *Am Heart J.* 1980;99(6):746-752.
526. Turpie AG, Gent M, Laupacis A, Latour Y, Gunstensen J, Basile F, Klimek M, Hirsh J. A comparison of aspirin with placebo in patients treated with warfarin after heart-valve replacement. *N Engl J Med.* 1993;329(8):524-529.
527. Schulman S, Henriksson K. Interaction of ibuprofen and warfarin on primary haemostasis. *Br J Rheumatol.* 1989;28(1):46-49.
528. Hylek EM, Heiman H, Skates SJ, Sheehan MA, Singer DE. Acetaminophen and other risk factors for excessive warfarin anticoagulation. *Jama.* 1998;279(9):657-662.
529. Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *Pharmacogenomics J.* 2007;7(2):99-111.
530. Gage B, Eby C, Johnson J, Deych E, Rieder M, Ridker P, Milligan P, Grice G, Lenzini P, Rettie A, Aquilante C, Grosso L, Marsh S, Langaee T, Farnett L, Voora D, Veenstra D, Glynn R, Barrett A, McLeod H. Use of Pharmacogenetic and Clinical Factors to Predict the Therapeutic Dose of Warfarin. *Clin Pharmacol Ther.* 2008.
531. Aquilante CL, Langaee TY, Lopez LM, Yarandi HN, Tromberg JS, Mohuczy D, Gaston KL, Waddell CD, Chirico MJ, Johnson JA. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79(4):291-302.
532. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, Holm L, McGinnis R, Rane A, Deloukas P. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood.* 2008.
533. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood.* 2005;106(7):2329-2333.
534. McAleer SD, Foondun AS, Feely M, Chrystyn H. Steady-state clearance rates of warfarin and its enantiomers in therapeutically dosed patients. *Chirality.* 1997;9(1):13-16.
535. Snaith A, Pugh L, Simpson CR, McLay JS. The Potential for Interaction between Warfarin and Coprescribed Medication : A Retrospective Study in Primary Care. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2008;8(3):207-212.
536. Wittkowsky AK, Boccuzzi SJ, Wogen J, Wygant G, Patel P, Hauch O. Frequency of concurrent use of warfarin with potentially interacting drugs. *Pharmacotherapy.* 2004;24(12):1668-1674.
537. Seymour RM, Routledge PA. Important drug-drug interactions in the elderly. *Drugs Aging.* 1998;12(6):485-494.
538. Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States: the Slone survey. *Jama.* 2002;287(3):337-344.

APPENDICES

APPENDICE I

Liste des protocoles

La liste suivante énumère les protocoles dont j'ai contribué à titre d'auteur principal à la rédaction. Certains projets de recherche sont terminés, en cours et d'autres seront soumis prochainement aux comités d'éthique.

1. Activité du CYP2D6 et variabilité dans l'efficacité analgésique de l'oxycodone chez les sujets volontaires sains. (projet terminé)

Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal

Chercheurs; Jacques Turgeon, B. Pharm, Ph.D.,

Gilles Lavigne, D.M.D., Ph.D., FRCD(c)-Médecine buccale

2. Activité du CYP2D6 et variabilité dans l'efficacité analgésique de l'oxycodone chez les patients. (projet accepté)

Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal et Hôpital Jean-Talon

Chercheurs; Jacques Turgeon, B. Pharm, Ph.D.,

Julio Fernandes, M.D., M.Sc., directeur du laboratoire de
recherche en chirurgie orthopédique

Gilles Lavigne, D.M.D., Ph.D., FRCD(c)-Médecine buccale

3. Survenue de délirium et/ou coma iatrogénique aux soins intensifs : évaluation de facteurs pouvant influencer le devenir et la toxicité du fentanyl et du midazolam. (projet en cours)

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Chercheurs : Yoanna Skrobik, M.D. Intensiviste

Jacques Turgeon, B.Pharm, Ph.D.

4. Effects of clarithromycin on the pharmacokinetic of domperidone. (protocole prêt pour soumission)
5. Effects of clarithromycin on the pharmacokinetics of fexofenadine, a P-gp probe, and of midazolam, a CYP3As probe. (protocole prêt pour soumission)

APPENDICE II

Liste des Publications & Abstracts

PUBLICATIONS

Original Manuscripts

- 1) Michaud V, Turgeon J. Cytochrome P450, drug interactions and the treatment of dementia. *Geriatrics and Aging* 2003; 6(2):22-7.
- 2) Simard C, Michaud V, Gibbs B, Massé R, Lessard E, Turgeon J. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of domperidone. *Xenobiotica* 2004; 34(11/12):1013-23.
- 3) Turgeon J, Pharand C, Michaud V. Understanding clopidogrel efficacy in the presence of cytochrome P450 polymorphism. *Commentary, Canadian Medical Association Journal* 2006; 174(12):1729-30.
- 4) Michaud V, Mouksassi M-S, Labbé L, Bélanger P-M, Lefebvre M, Gilbert M, Grech-Bélanger O, Turgeon J. Inhibitory effects of propafenone on the pharmacokinetics of caffeine in man. *Therapeutics Drug Monitoring* 2006;28(6):779-83..
- 5) Michaud V, Simard C, Turgeon J. An improved HPLC assay with fluorescence detection for the determination of domperidone and three major metabolites for application to in vitro drug metabolism studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Jun 1;852(1-2):611-6.
- 6) Michaud V, Vanier MC, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noël N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, , Goodman K, Renaud Y, Brown A, Phillips M, Ajami A., Turgeon. Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 May;83(5):740-8.

Submitted refereed papers

- 1) Michaud V, Simard C, Turgeon J. Comprehensive Characterization of CYP3A Isozymes Involved in the Metabolism of Domperidone :Comparison with the Probe Drug Substrate Midazolam, role of Cytochrome b5 and inhibition by ketoconazole. *Drug Metabolism and Disposition*. Submitted.
- 2) Michaud V, Turgeon J. Competitive and Mechanism-based Inhibition of CYP3As by Clarithromycin: Comparison between Various Enzymatic Sources Including a New Cell-based Assay Using Freshly Isolated Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. Submitted.
- 3) Michaud V, Frappier M, Turgeon J. Determination of relative levels of human cardiac CYP450 isoforms in patients with heart failure. *European Journal of Heart Failure*. Ready for submission.
- 4) O'Hara G, Philippon F, Gilbert M, Champagne J, Michaud V, Charbonneau L, Pruneau G, Hamelin B.A, Geelen P, and Turgeon J. Combined Administration of

Quinidine and Propafenone for Atrial Fibrillation: The CAQ-PAF Study. Clin Pharmacol Ther. Ready for submission.

In preparation

- 1) Michaud V, Dumas M-C, Turgeon J. Metabolism of verapamil and domperidone by human heart microsomal fractions. In preparation (FASEB Journal).
- 2) Michaud V, Vanier M-C, Renaud Y, Phillips M, Turgeon J. Warfarin dose related to genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in ambulatory patients. (CPT)
- 3) Michaud V, St-Onge M, Sirhan-Daneau A, Turgeon J. Determination of oxycodone, noroxycodone, oxymorphone, and noroxymorphone in urine by HPLC assay. (J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci)
- 4) Bouchard P, Bilodeau S, Alain K, Vadnais B, Franco M, Michaud V, Turgeon J. Evaluation of limited sampling methods for oral busulfan pharmacokinetic monitoring in adult patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. (Blood)
- 5) Bouchard P, Bilodeau S, Alain K, Pronovost B, Michaud V, Vadnais B, Franco M, Turgeon J. Influence of glutathione S-transferase polymorphism on the oral pharmacokinetics of busulfan. (Ther drug Monit)

ABSTRACTS

- 1) Michaud V, Simard C, Turgeon J. L'utilisation de la dompéridone comme substrat marqueur de l'activité des CYP3A4 et CYP3A5. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2002. Médecine Science 2002;18(2):28.
- 2) Michaud V, Simard C, Massé R, Turgeon J. Domperidone as a substrate marker drug for CYP3A4 and CYP3A5. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2003. Clin Pharmacol Ther 2003;73(2):47.
- 3) Michaud V, Simard C, Massé R, Turgeon J. Domperidone as a probe drug for CYP3A4 and CYP3A5. Association of Faculties of Pharmacy of Canada and Canadian College of Clinical Pharmacy 2003.
- 4) Michaud V, Simard C, Massé R, Turgeon J. A search for a substrate marker drug for CYP3A4 and CYP3A5: Domperidone. Canadian Society for Clinical Pharmacology 2003. Can J Clin Pharmacol 2003;10(3):152.
- 5) Michaud V, Morin N, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noel N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Vanier M-C, Turgeon J. Génotype ou Phénotype? Leur rôle dans l'individualisation de traitement pour des agents cardiovasculaires. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2003. Médecine Science 2003;19(2):18.
- 6) Michaud V, Morin N, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noel N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Vanier M-C, Turgeon J. Genotype or Phenotype? Role of these strategies for individualized therapy for cardiovascular drugs patients. Canadian Cardiovascular Society 2003. Can J Cardiol 2003;19(Suppl A):171-2.
- 7) Michaud V, Morin N, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noel N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Vanier M-C, Turgeon J. Comparative genotypic and phenotypic strategies for individualized therapy with warfarin. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2004. Clin Pharmacol Ther 2004; 75(2):P60.
- 8) Michaud V, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noel N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Vanier MC, Turgeon J. Phenotypic strategies, a better approach for individualized warfarin therapy. Association of Faculties of Pharmacy of Canada and Canadian College of Clinical Pharmacy 2004.
- 9) Michaud V, Harvey M, Goodman K, Morin N, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noël N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Rosati A, Vanier MC, Ajami A, Turgeon J. Warfarin as its own phenotypic probe drug: nomogram for dose prediction in patients. International congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics Brisbane 2004.
- 10) Michaud V, Harvey M, Goodman K, Pastinen T, Phillips M S., Morin N, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noël N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Vanier MC, Ajami A, Turgeon J. Polymorphismes du CYP2C9 et de VKOR dans l'établissement d'un nomogramme de traitement pour la warfarine. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2004. Médecine Science 2004.

- 11) Michaud V, Massé R, Turgeon J. CYP2J2 metabolizes domperidone in guinea pig hearts. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2005. Clin Pharmacol Ther 2005; 77(2):P75
- 12) Michaud V, Mouksassi M-S, Labbé L, Bélanger P-M, Lefebvre M, Gilbert M, Grech-Bélanger O, Turgeon J. Effet inhibiteur de la propafénone sur l'élimination de la caféine. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2005. Médecine Science 2005; 21(suppl 2) :33.
- 13) Michaud V, Mouksassi M-S, Labbé L, Bélanger P-M, Lefebvre M, Gilbert M, Grech-Bélanger O, Turgeon J. Effects of propafenone on the pharmacokinetics of caffeine. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2006. Clin Pharmacol Ther 2006; 79(2):21.
- 14) Michaud V, Massé R, Turgeon J. Inhibitory potency of clarithromycin towards CYP3As. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2006. Clin Pharmacol Ther 2006; 79(2):77.
- 15) Michaud V, Turgeon J. Potentiel inhibiteur de la clarithromycine et CYP3As. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2006. Médecine Science 2006; 22(2):139 .
- 16) Michaud V, Harvey M, Goodman K, Morin N, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noël N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Rosati A, Vanier MC, Ajami A, Simard S, Turgeon J. Polymorphisms in VKOR and phenotype of CYP2C9 contribute to inter-individual variability of warfarin. Canadian Cardiovascular Society 2006. Can. J. Cardiol. 2006, 22(Suppl D):223.
- 17) Michaud V, Harvey M, Goodman K, Morin N, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noël N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Rosati A, Vanier MC, Phillips M, Ajami A, Turgeon J. CYP2C9 phenotype and CYP2C9 and VKORC1 genotypes as modulatory factors of warfarin effects in Caucasian patients with multiple drug regimen. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2007. Clin Pharmacol Ther 2007;81(suppl1):S92.
- 18) Michaud V, Vanier M-C, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noel N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Goodman K, Renaud Y, Brown A, Phillips M, Ajami A M, Turgeon J. CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms combined to phenotypic assessments: their role in warfarin dose requirements in a hospitalized, heavily medicated patient population. Human Genome Meeting 2007. P237.
- 19) Michaud V, Vanier M-C, Brouillette D, Roy D, Verret L, Noel N, Taillon I, O'Hara G, Gossard D, Champagne M, Goodman K, Renaud Y, Brown A, Phillips M, Ajami A M, Turgeon J. The role of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms combined to CYP2C9 phenotypic assessments to explain intersubject variability in warfarin dose requirements in a hospitalized, heavily medicated patient population. Canadian Society of Clinical Pharmacology 2007. CSCP oral presentation. P132; 43.
- 20) Michaud V, Pronovost B, Bouchard P, Alain K, Bilodeau S, Bélanger F, Roy CD, Busque L, Vadenais B, Turgeon J. Impact du polymorphisme de la GST-A1 sur le métabolisme du busulfan administré par voie orale lors d'une pré-greffe de

- moelle osseuse. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2007. *Médecine Science* 2007; 23(suppl 2) :12.
- 21) Michaud V, Dumas M-C, Turgeon J. Le cœur, un organe doué d'activité métabolique envers le vérapamil. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2007. *Médecine Science* 2007; 23(suppl 2) :11.
- 22) Hreiche R, Michaud V, Simard C, Turgeon J, Drolet B. L'effet du dofétilide sur la repolarisation cardiaque est modulé par la concentration de glucose et par la diète riche en sucrose. Congrès du Club de Recherche Clinique du Québec 2007. *Médecine Science* 2007; 23(suppl 2) :1.
- 23) Hreiche R, Michaud V, Simard C, Turgeon J, Drolet B. Effects of glucose concentration on repolarization under conditions of drug-induced blockade of I_{Kr} in guinea-pigs fed with a high sucrose diet. Canadian Cardiovascular Congress, Quebec, October 20-24, 2007.
- 24) Michaud V, Pronovost B, Bouchard P, Alain K, Bilodeau S, Bélanger F, Roy CD, Busque L, Vadenais B, Turgeon J. Role of the GST-A1 single nucleotide polymorphisms in the metabolism of busulfan administered orally in patients undergoing bone marrow transplantation. The 8th International ISSX Meeting, Sendai, Japan, October 9-12, 2007. P66.
- 25) Michaud V, Dumas M-C, Hreiche R, Turgeon J. Metabolism of verapamil in the heart. The 8th International ISSX Meeting, Sendai, Japan, October 9-12, 2007. P.
- 26) Michaud V, Dumas M-C, Turgeon J. CYP2C8 is involved in the metabolism of verapamil in human heart microsomes. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics Meeting, Orlando, April 2-5, 2008. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(suppl1):S34 (PI85).
- 27) Michaud V, Turgeon J. Assessment of metabolic-intermediate complex formation by clarithromycin (CLAR) using the CYP3A probe drug domperidone (DOM) and freshly isolated and grown human hepatocytes. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics Meeting, Orlando, April 2-5, 2008. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(suppl1):S34 (PI84).
- 28) Michaud V, Turgeon J. Determination of relative levels of human cardiac CYP450 isoforms in patients with heart failure. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics Meeting, Orlando, April 2-5, 2008. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(suppl1):S33 (PI83).
- 29) Michaud V, St-Onge M, Sirhan-Daneau A, Turgeon J. Improved HPLC assay for quantitative analysis of oxycodone, oxymorphone and noroxycodone in human biological fluids. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics Meeting, Orlando, April 2-5, 2008. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(suppl1):S33 (PI82).
- 30) Bouchard P, Bilodeau S, Alain K, Vadenais B, Franco M, Michaud V, Turgeon J. Evaluation of limited sampling methods for oral busulfan pharmacokinetic monitoring in adult patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics Meeting, Orlando, April 2-5, 2008. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(suppl1):S74 (PI1107).

- 31) Tonietto E, Cuerrier S, Boyer M, Letarte N, Noël C, Michaud V, Turgeon J. Clinical impact of drug interactions with chemotherapy metabolized by CYP3As. American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics Meeting, Orlando, April 2-5, 2008. Clin Pharmacol Ther 2008;83(supp1):PII39
- 32) Michaud V, Dumas M-C, Turgeon J. Domperidone and verapamil are metabolized by human heart microsomal fractions. International congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Quebec, July 2007.

PROFESSIONAL MANUSCRIPTS

- 1) Turgeon J, Michaud V. Le cytochrome P450 et les interactions médicamenteuses. *L'Actualité Médicale* 2002; 23 (23):3 -5.
- 2) Michaud V, Turgeon J. Cytochromes P450 et leur rôle clinique. *Le Médecin du Québec* 2002; 37(8):73-83.
- 3) Turgeon J, Michaud V. Tableaux des principaux substrats d'intérêt pour le traitement de la douleur. Février 2003.
- 4) Michaud V, Turgeon J. Angiotensin convertingenzyme inhibitors (ACEIs) and Angiotensin II AT1 receptor blockers (ARBs), comparative charts. Mars 2003.
- 5) Michaud V, Turgeon J. L'importance clinique des interactions médicamenteuses reliées aux isoenzymes du cytochrome P450: de la fiction à la réalité. *Pharmactuel* 2003;36(2):88-96.
- 6) Michaud V, Hreiche R, Turgeon J. Les CYP450 et la gestion des interactions médicamenteuses dans la pratique quotidienne. *L'Actualité Pharmaceutique* 2006; formation continue :1-8.
- 7) Michaud V, Hreiche R, Turgeon J. Les CYP450 et la gestion des interactions médicamenteuses dans la pratique quotidienne. *L'Actualité Médicale* 2007;7(5) :49-53.
- 8) Hreiche R, Michaud V, Turgeon J. Chapter 5 - The role of ethnicity in managing cardiovascular patients. In; "Cardiovascular genetics and genomics" Edited by Dan M. Roden. Submitted June 2007.
- 9) Turgeon J, Michaud V. *1, 2, 3 Action; 4, 5, 6 Interactions*. *Le patient*. Accepted June 2008.
- 10) Michaud V, Turgeon J. *La médecine personnalisée frappe à votre porte*. *Le patient*. Accepted June 2008.

APPENDICE III

**Déclaration des coauteurs et
Permission de l'éditeur**

ACCORD DES COAUTEURS

ARTICLE 1

An Improved HPLC Assay With Fluorescence Detection For The Determination Of Domperidone And Three Major Metabolites For Application To In Vitro Drug Metabolism Studies.

ACCORD DES COAUTEURS

ARTICLE 2

Comprehensive Characterization of CYP3A Isozymes Involved in the Metabolism of Domperidone : Comparison with the Probe Drug Substrate Midazolam, role of Cytochrome b5 and inhibition by ketoconazole.

ACCORD DES COAUTEURS

ARTICLE 3

Competitive and Mechanism-based Inhibition of CYP3As by Clarithromycin: Comparison between Various Enzymatic Sources Including a New Cell-based Assay Using Freshly Isolated Human Hepatocytes.

ACCORD DES COAUTEURS

ARTICLE 4

**Determination of relative levels of human cardiac CYP450 isoforms
in patients with heart failure.**

ACCORD DES COAUTEURS

ARTICLE 5

**Metabolism of domperidone and verapamil by human heart
microsomal fractions.**

ACCORD DES COAUTEURS

ARTICLE 6

Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

ARTICLE 1

An Improved HPLC Assay With Fluorescence Detection For The Determination Of Domperidone And Three Major Metabolites For Application To In Vitro Drug Metabolism Studies.

PERMISSION DE L'ÉDITEUR

ARTICLE 6

Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients.