

Université de Montréal

**Développement et utilisation de modèles in vitro et de données précliniques pour augmenter la prédictibilité de la perméabilité et du métabolisme intestinal chez l'humain**

par  
Marc-Olivier Boily

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise és Sciences (M.Sc.)  
en Pharmacologie

Novembre, 2015

© Marc-Olivier Boily, 2015



## Résumé

Tout médicament administré par la voie orale doit être absorbé sans être métabolisé par l'intestin et le foie pour atteindre la circulation systémique. Malgré son impact majeur sur l'effet de premier passage de plusieurs médicaments, le métabolisme intestinal est souvent négligé comparativement au métabolisme hépatique. L'objectif de ces travaux de maîtrise est donc d'utiliser, caractériser et développer différents outils *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre et prédire l'impact du métabolisme intestinal sur l'effet de premier passage des médicaments comparé au métabolisme hépatique. Pour se faire, différents substrats d'enzymes du métabolisme ont été incubés dans des microsomes intestinaux et hépatiques et des différences entre la vitesse de métabolisme et les métabolites produits ont été démontrés. Afin de mieux comprendre l'impact de ces différences *in vivo*, des études mécanistiques chez des animaux canulés et traités avec des inhibiteurs enzymatiques ont été conduites avec le substrat métoprolol. Ces études ont démontré l'impact du métabolisme intestinal sur le premier passage du métoprolol. De plus, elles ont révélé l'effet sur la vidange gastrique du 1-aminobenzotriazole, un inhibiteur des cytochromes p450, évitant ainsi une mauvaise utilisation de cet outil dans le futur. Ces travaux de maîtrise ont permis d'améliorer les connaissances des différents outils *in vitro* et *in vivo* pour étudier le métabolisme intestinal tout en permettant de mieux comprendre les différences entre le rôle de l'intestin et du foie sur l'effet de premier passage.

**Mots-clés :** Métabolisme intestinal des médicaments, pharmacocinétiques, métoprolol, effet de premier passage, cytochrome p450, 1-aminobenzotriazole.

## **Abstract**

To reach the systemic circulation, orally administered drugs have to be absorbed and not metabolized by the intestine and the liver. Even though it has a major impact on the first pass effect of many xenobiotics, the intestinal metabolism is often neglect compare to the hepatic metabolism. The objective of this work is to use, characterize and develop multiple *in vitro* and *in vivo* tools to better understand and predict the impact of intestinal metabolism on the first pass effect of xenobiotics compared to the liver. To do so, multiple substrates of metabolic enzymes were incubated in intestinal and hepatic microsomes and differences between the rate of metabolism and the production of metabolites were demonstrated. To better understand the impact of these differences *in vivo*, mechanistic studies were undergone in rats cannulated or treated with enzymatic inhibitors with the substrate metoprolol. These studies demonstrated the impact of intestinal metabolism on the first pass of metoprolol. Moreover, they exposed the effect on gastric emptying of 1-aminobenzotriazole, a cytochrome p450 inhibitor, avoiding its wrong utilisation in future studies. This work helped increase the knowledge about the different *in vitro* and *in vivo* tools to study intestinal metabolism and to better understand the differences between the role of the intestine and the liver on the first pass effect.

**Keywords** : Intestinal metabolism, pharmacokinetics, metoprolol, first pass effect, cytochrome p450, 1-aminobenzotriazole.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction.....	13
1.1 – Mise en contexte.....	13
1.2 – Pharmacocinétique et métabolisme des médicaments.....	13
1.2.1 – Absorption.....	14
1.2.2 – Distribution.....	16
1.2.3 – Métabolisme.....	16
1.2.4 – Excrétion.....	19
1.3 – Physiologie du tube gastro-intestinal.....	20
1.4 – Le métabolisme intestinal des médicaments.....	23
1.4.1 – Enzymes impliquées dans le métabolisme intestinal des médicaments.....	23
1.4.2 – Outils <i>in vitro</i> pour étudier le métabolisme intestinal.....	29
1.4.3 – Outils <i>in vivo</i> pour étudier le métabolisme intestinal.....	30
1.4.4 – Facteurs influençant le métabolisme intestinal.....	33
1.4.5 – Différences entre le métabolisme intestinal et hépatique.....	33
1.5 – Objectifs de recherche.....	34
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	37
2.1 – Animaux.....	37
2.2 – Préparation de microsomes intestinaux.....	37
2.3 – Détermination de la clairance.....	38
2.4 – Expériences pharmacocinétiques.....	39
2.5 – Analyses LC-MS/MS.....	39

2.6 – Analyse des données .....	40
Chapitre 3 : Résultats .....	43
4.1 – Différences quantitatives et qualitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique dans les microsomes .....	43
3.2 – Utilisation et caractérisation de modèles <i>in vivo</i> chez le rat pour comprendre les différences entre le métabolisme intestinal et hépatique en utilisant le substrat métoprolol	46
3.2.1 – Pharmacocinétique et métabolisme de métoprolol chez le rat.....	46
3.2.2 – Étude du métabolisme de metoprolol dans des rats canulés dans la veine jugulaire et la veine porte.....	46
3.2.3 – Utilisation des interactions médicamenteuses pour distinguer entre le métabolisme intestinal et hépatique du métoprolol.....	47
Chapitre 4 : Article.....	53
Chapitre 5 : Discussion .....	81
5.1 – Rappel des objectifs de recherche.....	81
5.2 – Différences quantitatives et qualitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique dans les microsomes .....	82
5.3 – Utilisation et caractérisation de modèles <i>in vivo</i> chez le rat pour comprendre les différences entre le métabolisme intestinal et hépatique en utilisant le substrat métoprolol	84
5.3.1 – Pharmacocinétique et métabolisme de métoprolol chez le rat.....	85
5.3.2 – Étude du métabolisme de metoprolol dans des rats canulés dans la veine jugulaire et la veine porte.....	85
5.3.3 – Utilisation des interactions médicamenteuses pour distinguer entre le métabolisme intestinal et hépatique du métoprolol.....	88
Chapitre 6 : Conclusion .....	93
Bibliographie.....	i

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> – Exemples de médicaments métabolisés par les CYP.....	18
<b>Tableau 2</b> – Différents substrats du métabolisme chez le rat .....	27
<b>Tableau 3</b> – Conditions d’incubation pour le Km et Vmax.....	38
<b>Tableau 4</b> – Conditions LC-MS/MS utilisées.....	41
<b>Tableau 5</b> – Différences quantitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique .....	44
<b>Tableau 6</b> – Paramètres pharmacocinétiques du métoprolol administré i.v. et p.o .....	48

## Article

<b>Table 1.</b> Dosing regimen of ABT across different studies .....	74
<b>Table 2.</b> ABT pretreatment conditions prior to metoprolol dosing.....	75
<b>Table 3.</b> Effect of ABT on the PK parameters of metoprolol and its metabolites in rats .....	76
<b>Table 4.</b> Effect of ABT on stomach content and intestinal transit in rats dosed with a charcoal meal.....	77

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> – Notion de biodisponibilité. ....	15
<b>Figure 2</b> – Cycle catalytique du cytochrome P450. ....	17
<b>Figure 3</b> – Structure macroscopique de l'intestin grêle. ....	21
<b>Figure 4</b> – Types cellulaires composant les villosités et les cryptes intestinales. ....	23
<b>Figure 5</b> – Expression des cytochromes p450 dans l'intestin grêle et le foie chez l'humain ...	24
<b>Figure 6</b> – Voies métaboliques du Midazolam chez l'humain et le rat. ....	25
<b>Figure 7</b> – Voies métaboliques du métoprolol chez le rat. ....	28
<b>Figure 8</b> – Différences qualitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique de midazolam (A.) et métoprolol (B.) ....	45
<b>Figure 9</b> – Profil pharmacocinétique oral de métoprolol chez le rat. ....	49
<b>Figure 10</b> – Concentrations plasmatiques de métoprolol et ses métabolites dans la veine porte et jugulaire. ....	50
<b>Figure 11</b> – Effet du jus de pamplemousse sur le métabolisme intestinal et hépatique de métoprolol. ....	51
<b>Figure 12</b> – Profil pharmacocinétique de métoprolol dans des rats témoins et traités avec du jus de pamplemousse. ....	52

## Article

<b>Fig. 1.</b> Metabolic pathway of metoprolol in rats. ODM is o-desmethyl-metoprolol, OHM $\alpha$ -hydroxy-metoprolol and MA metoprolol-acid. ....	78
<b>Fig. 2.</b> Plasmatic concentration of metoprolol (A), o-desmethyl-metoprolol (B), metoprolol-acid (C) and $\alpha$ -hydroxy-metoprolol (D) following the administration of 10mg/kg of metoprolol in untreated rats and in 50mg/kg ABT i.v. 1 h or ABT p.o. 16 h pretreated rats. ....	79
<b>Fig. 3.</b> Intrinsic clearance of metoprolol in hepatic (A) and intestinal (B) microsomes of untreated rats or ABT i.v. 1h and ABT p.o. 16 h pretreated rats. ....	80

## Liste des sigles et abréviations

**% F** : Biodisponibilité

**ABT** : 1-aminobenzotriazole

**ACN** : Acétonitrile

**CAR** : Constitutive Androstane Receptor

**CL** : Clairance

**CL<sub>H</sub>** : Clairance hépatique

**CL<sub>int</sub>** : Clairance intrinsèque

**CL<sub>R</sub>** : Clairance rénale

**CL<sub>T</sub>** : Clairance plasmatique totale

**C<sub>max</sub>** : Concentration maximale

**CYP** : Cytochrome p450

**DTT** : Dithiothreitol

**EDTA** : Ehylenediaminetetraacetic acid

**F<sub>a</sub>** : Fraction absorbé

**F<sub>g</sub>** : Fraction non métabolisé par l'intestin

**F<sub>h</sub>** : Fraction non métabolisé par le foie.

**GFJ** : Jus de pamplemousse

**i.d.** : Administration dans le duodénum

**i.p.** : Administration dans la veine porte

**i.v.** : Administration intraveineuse

**K<sub>el</sub>** : Pente d'élimination

**K<sub>m</sub>** : Concentration à la moitié de la vitesse maximale.

**LC-MS/MS** : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

**MeOH** : Méthanol

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**PBS** : Solution saline de tampon phosphate

**p.o.** : Administration orale

**PXR** : Pregnane X Receptor

**Q<sub>H</sub>** : Débit hépatique

**Q<sub>v.p.</sub>** : Débit dans la veine porte

**S/P** : Ratio du sang au plasma

**SSC** : Surface sous la courbe

**T<sub>1/2</sub>** : Temps de demi-vie

**T<sub>max</sub>** : Temps à concentration maximale

**UGT** : UDP-Glucuronyltransférase

**V<sub>d</sub>** : Volume de distribution

**v.j.** : Veine jugulaire

**V<sub>max</sub>** : Vitesse maximale.

**v.p.** : Veine porte

*La connaissance s'acquiert par l'expérience,  
Tout le reste n'est que de l'information*  
Albert Einstein



## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier le Dr. Vincent Pichette pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet de maîtrise. Merci de m'avoir fait confiance. Merci aussi aux membres du laboratoire, dont plus particulièrement François Leblond, pour leur aide et leurs conseils tout au long de mon projet. Merci surtout pour nos belles discussions qui ont rendues ces deux années beaucoup plus agréables.

J'aimerais aussi remercier la compagnie pharmaceutique Vertex d'avoir permis d'établir cette collaboration. Plus particulièrement Nathalie Chauret, Jean-François Lévesque et Julie Laterreur pour leur implication, leur soutien et leur intérêt dans ce projet. Merci aussi à tous les membres du département de pharmacocinétique et métabolisme ainsi qu'au personnel de l'animalerie pour toute leur aide.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille qui m'a toujours appuyée dans mes études et surtout Fannie de partager ma vie et de m'aider à surmonter les défis de la vie.

Sans vous, rien de tout ça n'aurait été possible. Merci !



# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 – Mise en contexte

La prise de médicaments par voie orale est de loin la route d'administration la plus favorable et la plus utilisée. Plus de 60 % des médicaments sont commercialisés en tant que traitements oraux (1). Dans ces circonstances, il est important que les propriétés pharmacocinétiques d'un médicament soient optimales pour qu'il atteigne la circulation systémique. Ainsi, pour surmonter les barrières à l'absorption, les médicaments sont optimisés en phase de développement pour avoir une bonne solubilité, une bonne perméabilité intestinale et un faible premier passage hépatique (2). Étant donné que l'expression intestinale des enzymes du métabolisme des médicaments représente seulement 1 % de celle du foie (3), le métabolisme intestinal est rarement considéré comme un acteur majeur dans la pharmacocinétique des médicaments. Ainsi, peu d'outils sont disponibles pour l'étudier (2). Pourtant, il a été démontré que l'intestin joue un rôle significatif et parfois même plus important que le foie dans le métabolisme de plusieurs médicaments tels que le midazolam (4, 5), le tacrolimus (6), la félodipine (7) et le raloxifène (8). Dans cette optique, il est important de mieux comprendre l'impact du métabolisme intestinal sur la pharmacocinétique des médicaments en comparaison avec le foie. Il est aussi essentiel d'avoir de bons outils pour étudier le métabolisme intestinal des médicaments. L'objectif de ces travaux est donc d'utiliser, caractériser et développer différents outils *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre et prédire l'impact du métabolisme intestinal sur la pharmacocinétique des médicaments.

## 1.2 – Pharmacocinétique et métabolisme des médicaments

Afin d'être efficace, tout médicament doit atteindre son site d'action. La science qui étudie le comportement d'une molécule dans l'organisme s'appelle la pharmacocinétique. On la résume souvent par le terme ADME pour Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion. Dans cette section, il sera question des notions de base de pharmacocinétique.

### 1.2.1 – Absorption

L'absorption est le passage d'un médicament de son site d'administration à la circulation systémique. La notion d'absorption ne s'applique pas à la voie intraveineuse puisque le médicament est administré directement dans le sang. Par contre, pour les médicaments oraux, il s'agit d'une étape très importante qui dépendra principalement de trois facteurs : la solubilisation du composé dans le tube gastro-intestinal, sa perméabilité membranaire et son niveau de métabolisme de premier passage (9).

Afin de pouvoir être absorbé, un médicament doit à tout prix être solubilisé dans le fluide intestinal. La dissolution d'un médicament dépend principalement de sa formulation, de sa solubilité intrinsèque et, pour les acides et les bases, du pH intestinal (10). Pour savoir si la solubilité d'un composé sera limitante à son absorption, il est possible d'évaluer *in vitro* la solubilité d'un composé dans des liquides gastriques ou intestinaux simulés (11). On considèrera la solubilité comme n'étant pas limitante quand la dose administrée chez l'humain est soluble dans 250 mL (12).

Une fois solubilisé, le composé devra diffuser au travers de la membrane intestinale pour atteindre le système porte. On appelle la capacité d'un médicament à diffuser au travers des membranes la perméabilité. La plupart du temps, les médicaments traversent par diffusion passive ou alors avec l'aide d'un transporteur intestinal. L'absorption d'un composé avec une bonne perméabilité peut aussi être diminuée par des transporteurs d'efflux qui repompent le médicament dans la lumière intestinale. Pour savoir si la perméabilité d'un médicament est limitante à son absorption, il est possible d'utiliser différents modèles cellulaires comme les cellules Caco-2 pour estimer sa perméabilité cellulaire et son affinité pour les différents transporteurs (10).

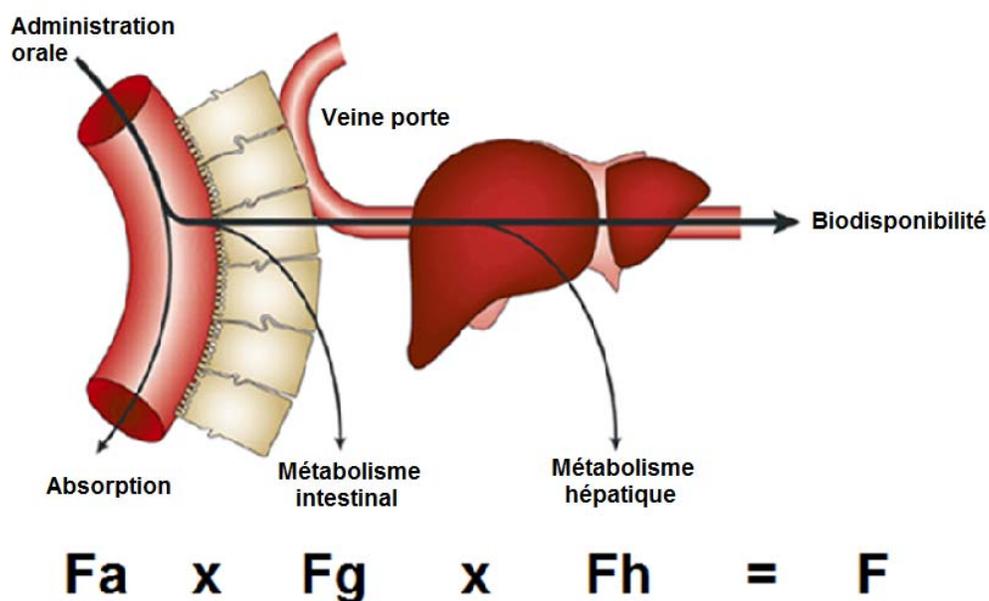
Pour se rendre à la circulation systémique, le médicament ne doit pas être dégradé par les enzymes du métabolisme présentes dans l'intestin et le foie. Puisque les molécules absorbées par la voie orale n'ont pas d'autres choix que de traverser l'intestin et le foie, elles sont fortement exposées aux enzymes du métabolisme. On appelle le métabolisme qui survient dans la phase d'absorption le métabolisme de premier passage (10). Le métabolisme des médicaments sera décrit plus en détail dans les sections subséquentes.

On appelle la proportion de médicament qui atteint la circulation systémique la biodisponibilité (% F). Elle est toujours rapportée à une administration i.v. On la calcule avec l'équation suivante :

$$\% F = \frac{SSC_{p.o.}}{SSC_{i.v.}} \times \frac{Dose_{i.v.}}{Dose_{p.o.}}$$

Où SSC est la surface sous la courbe des concentrations plasmatiques. Cependant, pour que la %F calculé soit valide, il faut que les valeurs de SSC p.o. et i.v. soient dans le même ordre de grandeur.

De plus, on peut séparer la biodisponibilité en trois parties distinctes : la fraction absorbée ( $F_a$ ), la fraction non métabolisée par l'intestin ( $F_g$ ) et la fraction non métabolisée par le foie ( $F_h$ ) (Voir **Figure 1**). Ainsi,  $F_a$  dépend de la solubilité et de la perméabilité du médicament et  $F_g$  et  $F_h$  du niveau de métabolisme intestinal et hépatique respectivement (13).



**Figure 1 – Notion de biodisponibilité.** Tirée et adaptée de (14)

Deux autres paramètres importants de l'absorption sont la concentration maximale ( $C_{max}$ ) et le temps au  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ). Ces deux paramètres seront affectés par des changements

d'absorption. Ainsi, si la vitesse d'absorption est diminuée, le Tmax sera augmenté et le Cmax diminué et vice-versa (10).

### 1.2.2 – Distribution

La distribution d'un médicament correspond au passage d'un composé de la circulation systémique aux tissus. Elle dépend de la liaison aux protéines plasmatiques et du caractère hydrophile et lipophile d'un composé. On représente l'étendue de distribution d'un composé par le volume de distribution ( $V_d$ ) qui se calcule avec l'équation suivante :

$$V_d = \frac{Dose}{C_0}$$

Où  $C_0$  est la concentration initiale suite à une administration intraveineuse (10).

La liaison aux protéines plasmatiques affecte grandement la distribution d'un médicament. En effet, seulement la fraction libre du médicament peut traverser les capillaires sanguins pour atteindre les tissus. Ainsi, c'est la concentration libre qui sera responsable de l'action thérapeutique. Le même raisonnement s'applique à l'élimination puisque seulement la fraction libre pourra atteindre le foie et les reins pour être éliminée. Pour ces raisons, il est très important de prendre en compte la liaison aux protéines plasmatiques lorsqu'on étudie un médicament (10).

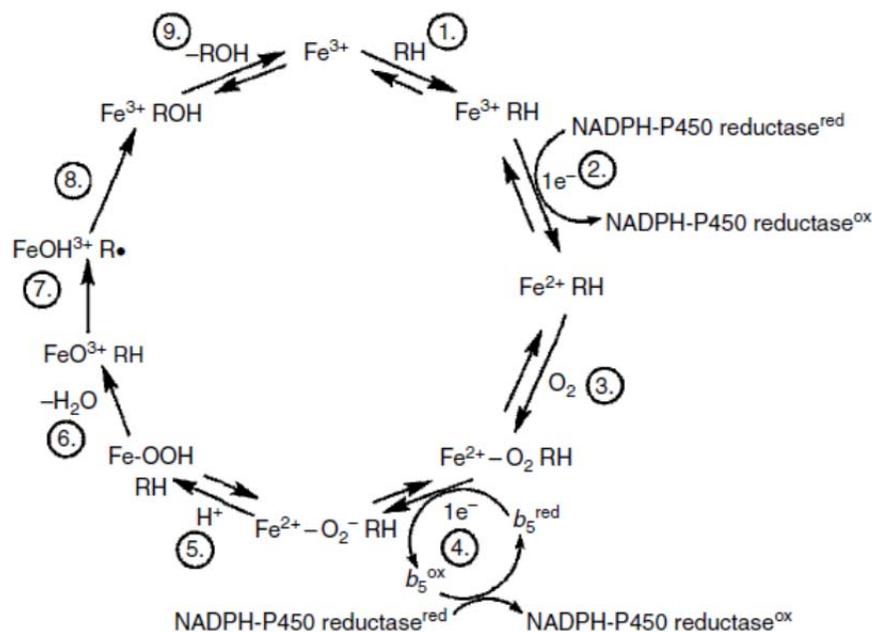
### 1.2.3 – Métabolisme

Le métabolisme a comme premier objectif d'augmenter la polarité des médicaments pour qu'ils soient plus facilement éliminés de l'organisme dans la bile et l'urine (10). On appelle la molécule modifiée par le métabolisme un métabolite. Généralement, le métabolisme aura pour effet d'inactiver le médicament. Par contre, il peut arriver que l'activité soit augmentée ou que le métabolite produit soit toxique (15). Le métabolisme a principalement lieu dans le foie, mais plusieurs autres organes expriment également des enzymes du métabolisme comme l'intestin, les reins et les poumons (16). De plus, l'intestin peut avoir un rôle particulièrement important étant donné que les médicaments administrés oralement n'auront pas d'autres choix que de traverser les cellules intestinales (17).

On sépare généralement le métabolisme en deux catégories : les réactions de Phase I et les réactions de Phase II. Les phases I sont les réactions qui modifient la structure de la molécule alors que les Phases II sont l'addition d'un groupement polaire. Une réaction de Phase II peut avoir besoin d'une phase I pour avoir lieu, mais peut aussi survenir directement sur la molécule mère (10, 15).

### 1.2.3.1 – Métabolisme de phase I

Les enzymes de phase I peuvent catalyser différentes réactions enzymatiques comme l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse et l'hydratation (15). Plusieurs familles d'enzymes peuvent effectuer ces réactions, mais le métabolisme des médicaments est généralement associé à la famille du cytochrome P450 (CYP). Les CYP sont des enzymes localisés sur la membrane du réticulum endoplasmique (15). Par contre, on en retrouve aussi dans les mitochondries (18). Ils sont composés d'un groupement hème qui contient un atome de fer. C'est ce groupement qui est responsable de lier l'oxygène et de le transférer à la molécule via une série de réactions (voir **Figure 2**). Ces réactions nécessitent la présence de NADPH qui, via la NADPH-cytochrome p450 réductase, fourni les électrons nécessaires à la réduction du  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (10).



**Figure 2 – Cycle catalytique du cytochrome P450.** Tirée de (10).

À ce jour, 74 différentes isoformes du CYP ont été décrites (19). Chez l'humain, le métabolisme des médicaments est catalysé principalement par le CYP3A4/5, 2D6, 2C9, 2C19, 2E1 et 1A1/2 par ordre d'importance (20) (Voir **Tableau 1** pour des exemples de médicaments métabolisés par les CYP).

<b>Isoformes</b>	<b>Médicaments</b>
CYP1A2	Caféine, acétaminophène, théophylline
CYP2C19	Oméprazole, phénytoïne
CYP2C9	Ibuprofène, tolbutamide, warfarine
CYP2D6	Codéine, débrisoquine, métoprolol
CYP2E1	Alcool, acétaminophène
CYP3A4, 5, 7	Cyclosporine, nifédipine, indinavir, simvastatin

**Tableau 1 – Exemples de médicaments métabolisés par les CYP.** Source : (19).

### 1.2.3.2 – Métabolisme de phase II

Le métabolisme de phase II est l'addition d'un groupement polaire à la molécule dans le but d'augmenter son caractère hydrophile. Les réactions de phase II les plus fréquentes sont la glucuronidation, la sulfatation, l'ajout de glutathionne, l'acétylation, et l'ajout d'acide aminé. Il faut noter que toutes nécessitent l'action d'une enzyme spécifique et la présence d'un cofacteur. Sauf la glucuronidation qui se produit dans le réticulum endoplasmique, la majorité des réactions de phase II se produisent dans le cytosol (10).

La glucuronidation est sans aucun doute la réaction de phase II la plus fréquente. Elle consiste à ajouter une molécule d'acide glucuronique sur un oxygène, un azote ou un soufre. Elle est catalysée par l'UDP-Glucuronyltransférase (UGT) et nécessite la présence d'UDP-glucuronique acide. Il existe 18 isoformes des UGT qu'on classifie en deux sous-familles : UGT1 et UGT2. La famille entière des UGT1 est dérivée d'un seul gène composé de 17 exons dont une région constante de 4 exons est commune à tous les UGT1. Ainsi, un polymorphisme dans la région constante aura un impact sur toutes les isoformes de la famille UGT1. Les isoformes de la famille UGT2 sont, quant à elles, toutes exprimées à partir de gènes distincts (21).

### **1.2.3.3 – Inhibition et induction des enzymes métaboliques**

Les enzymes du métabolisme sont impliquées dans une grande proportion des interactions médicamenteuses. Ces interactions peuvent survenir quand un premier médicament inhibe ou induit les enzymes métaboliques ce qui aura pour effet d'augmenter ou de diminuer les concentrations plasmatiques d'un second médicament. On appelle le médicament qui est la cause de l'interaction l'agresseur et celui qui subit l'interaction la victime (10, 15).

L'inhibition des enzymes métaboliques peut être réversible ou irréversible. Dans le cas d'une inhibition réversible, il y a compétition pour le site actif d'une enzyme métabolique par l'agresseur ce qui a pour effet de diminuer le métabolisme de la victime. Dans ce cas, l'inhibition va s'atténuer si les concentrations plasmatiques de l'agresseur diminuent. Dans le cas d'une inhibition irréversible, l'agresseur se lie de manière irréversible à l'enzyme ce qui a pour effet de l'inactiver complètement. Dans ce type d'inhibition, il faut attendre que la protéine soit synthétisée de nouveau pour que l'inhibition cesse (10, 15).

L'induction des enzymes métaboliques est causée par l'activation de récepteurs nucléaires par un agresseur. Une fois activés, ces récepteurs, tels que le Pregnane X Receptor (PXR) ou le Constitutive Androstane Receptor (CAR), vont activer le gène rapporteur de certaines enzymes métaboliques ce qui aura pour effet d'augmenter la quantité de protéines et ainsi le métabolisme de la victime (15). Par exemple, la rifampicine est un activateur du PXR qui a pour effet d'induire le CYP3A4 (22, 23) ce qui peut rendre inactif plusieurs médicaments comme le midazolam, la simvastatin, le verapamil et plusieurs bloqueurs des canaux calciques (24).

### **1.2.4 – Excrétion**

L'excrétion est la phase qui consiste à éliminer le médicament et ses métabolites de l'organisme. L'excrétion se fait principalement dans le foie et dans les reins. Dans le foie, la molécule mère et ses métabolites peuvent être excrétés dans la bile à l'aide de transporteurs similaires à ceux retrouvés dans l'intestin et les reins. Dans certains cas, il peut y avoir une réabsorption du médicament par l'intestin : on parlera de cycle entéro-hépatique. S'il n'y a pas de réabsorption, le médicament ou ses métabolites seront excrétés dans les fèces.

Trois mécanismes principaux sont responsables de l'excrétion rénale des médicaments : la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire. La filtration glomérulaire se produit dans le glomérule et permet la filtration de toutes les molécules avec un poids moléculaire inférieur à 20 000 daltons. Ainsi, pratiquement tous les médicaments non liés aux protéines plasmatiques seront filtrés dans le glomérule. Il peut aussi y avoir transport de médicament du sang vers la lumière tubulaire à l'aide de transporteur. C'est ce qu'on appelle la sécrétion tubulaire. Enfin, les médicaments présents dans le tubule peuvent être réabsorbés dans la circulation. La réabsorption tubulaire peut avoir lieu par diffusion passive ou à l'aide de transporteurs. C'est la sommation de ces trois mécanismes qui détermine la fraction de médicament qui sera éliminée dans l'urine (19).

Le paramètre pharmacocinétique qui représente l'élimination est la clairance (CL). La clairance correspond au volume de plasma qui est complètement épuré du médicament en fonction du temps. On peut déterminer la clairance plasmatique totale ( $CL_T$ ) d'un médicament après une administration intraveineuse avec l'équation suivante :

$$CL_T = \frac{Dose}{SSC} = CL_H + CL_R + CL_{autres}$$

Où  $CL_H$  est la clairance hépatique par métabolisme,  $CL_R$  la clairance rénale et  $CL_{autres}$  la clairance par les autres mécanismes d'élimination non standards (19).

On peut aussi se référer au temps de demi-vie ( $T_{1/2}$ ) qui est le temps nécessaire pour diminuer les concentrations plasmatiques de moitié. Par contre, ce paramètre inclut aussi la distribution puisqu'il dépend à la fois de la clairance et du volume de distribution. Le  $T_{1/2}$  est calculé par l'équation suivante :

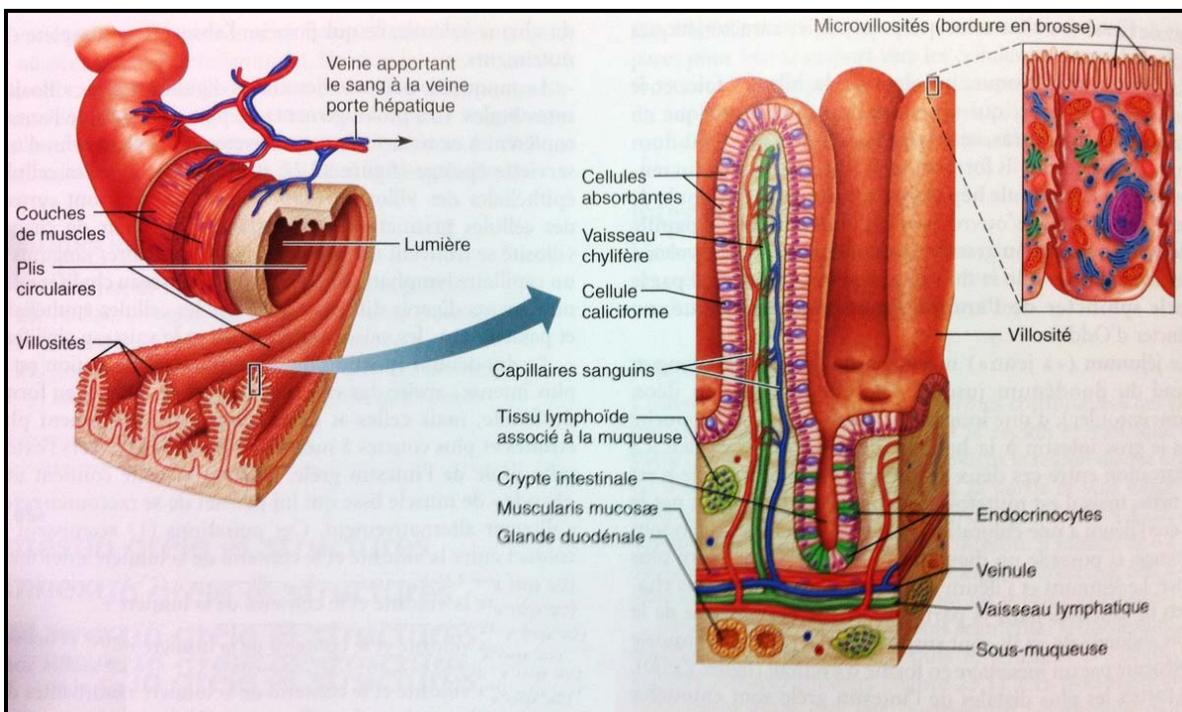
$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k_{el}} = 0.693 \times \frac{V_d}{CL}$$

Où  $k_{el}$  est la pente d'élimination des concentrations plasmatiques (10, 19).

### 1.3 – Physiologie du tube gastro-intestinal

Le tube gastro-intestinal est composé de différents segments ayant chacun des fonctions qui leurs sont propres. Tout d'abord, il y a l'estomac qui est un réservoir temporaire

servant à entamer une digestion chimique et enzymatique de la nourriture dans un milieu acide. Par la suite, il y a l'intestin grêle qui est séparé en trois segments principaux : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La principale fonction de l'intestin grêle est la digestion et l'absorption des aliments. Ainsi, à son arrivée dans le duodénum, le pH acide du contenu intestinal est neutralisé par les sécrétions biliaires et pancréatiques. De plus, les sels biliaires et les gras contenus dans la bile favoriseront l'émulsion et l'absorption des lipides du contenu intestinal tandis que les enzymes pancréatiques ainsi que celles retrouvées à la surface des cellules intestinales favoriseront la digestion du contenu intestinal. L'absorption du contenu intestinal est optimisée dans l'intestin grêle par la présence de plis circulaires, de villosités et de microvillosités qui augmentent grandement la surface d'absorption (Voir **Figure 3**). Finalement, le dernier segment du tube gastro-intestinal est le gros intestin qu'on appelle aussi le colon. Le colon contient énormément de bactéries qui seront responsables de la digestion des résidus alimentaires restants. C'est aussi dans cette région qu'a lieu l'absorption de la plus grande partie de l'eau résiduelle et des électrolytes. Enfin, le colon sert de stockage temporaire des fèces avant leur élimination par défécation (25).

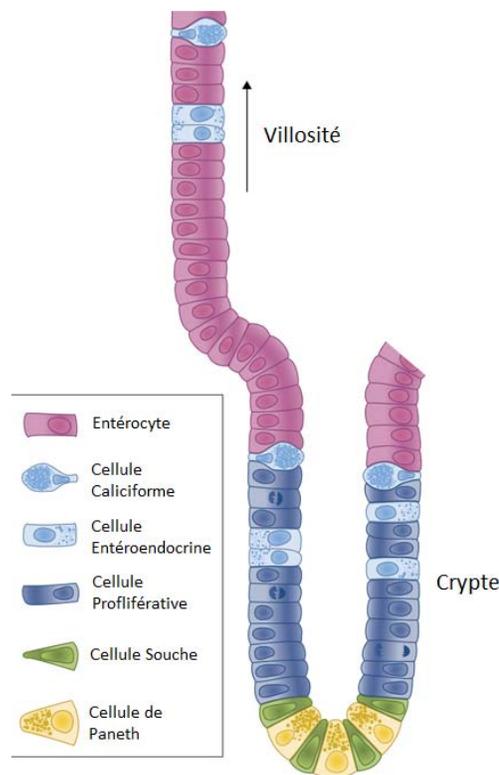


**Figure 3 – Structure macroscopique de l'intestin grêle.** Tirée et adaptée de (25).

L'anatomie du tube gastro-intestinal affecte beaucoup l'absorption des médicaments. Tout d'abord, l'estomac est un lieu peu propice à l'absorption des médicaments étant donné la faible surface d'absorption et le pH acide. Ainsi, l'estomac crée un délai dans l'absorption des médicaments oraux qui est dépendant du temps de vidange gastrique. L'intestin grêle par contre est le lieu où se produira la majorité de l'absorption des médicaments dû à la très grande surface de contact et au volume élevé de fluides qui favoriseront la perméabilité et la solubilité des médicaments respectivement. Enfin, le colon est moins propice à l'absorption des médicaments que l'intestin grêle puisque la surface d'absorption et le volume de liquide y sont moindres (10). Néanmoins, plusieurs médicaments avec une formulation à libération prolongée relâchée dans le colon sont tout de même bien absorbés. Il faudra par contre que leur profil de perméabilité et solubilité soit optimal (26).

Étant donné son rôle clef dans l'absorption des médicaments, il est important de bien comprendre la structure cellulaire de l'épithélium intestinal. Tout d'abord, les villosités sont entourées de cryptes intestinales qui contiennent les cellules souches et les cellules prolifératives à l'origine de tous les autres types cellulaires. En proliférant, les cellules vont se différencier et migrer vers le bout des villosités pour devenir des cellules spécialisées : les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines. Une fois rendues au bout des villosités, les cellules intestinales vont se détacher et entrer en apoptose. L'épithélium intestinal se renouvelle ainsi tous les deux à quatre jours. Un quatrième type cellulaire spécialisé réside au bas de la crypte : les cellules de paneth. Les différents types cellulaires qui composent les villosités et les cryptes de l'intestin grêle sont montrés à la **Figure 4** (25, 27, 28).

Les entérocytes composent la majorité de l'épithélium intestinal. Ils sont pourvus de très nombreuses microvillosités et sont responsables de l'absorption du contenu intestinal. Quant à elles, les cellules caliciformes sont responsables de la sécrétion de mucus, les cellules entéroendocrines de la sécrétion d'enzymes intestinales et d'hormones et les cellules de paneth de la sécrétion d'agents antimicrobiens (25).



**Figure 4 – Types cellulaires composant les villosités et les cryptes intestinales.** Tirée et adaptée de (27).

## 1.4 – Le métabolisme intestinal des médicaments

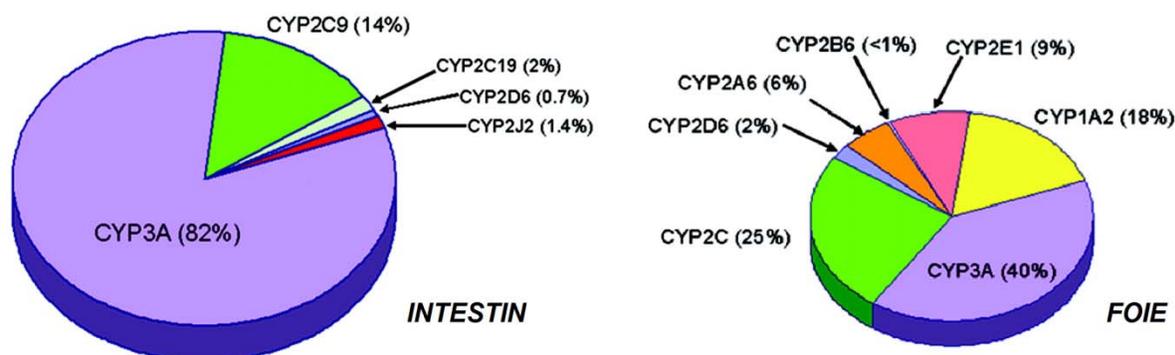
L'intestin est l'organe extra-hépatique exprimant le plus d'enzymes du métabolisme (29). Le métabolisme intestinal a lieu lors de la phase d'absorption des médicaments administrés par la voie orale au moment où les molécules doivent traverser l'épithélium intestinal pour atteindre la circulation systémique. Il joue donc un rôle important dans l'effet de premier passage des médicaments (30).

### 1.4.1 – Enzymes impliquées dans le métabolisme intestinal des médicaments

#### 1.4.1.1 – Métabolisme de phase I

Chez l'humain, les CYP3A4 et CYP3A5 sont certainement les enzymes de phase I les plus importantes du métabolisme intestinal. À eux seuls, ils correspondent à environ 80 % du contenu total de CYP. Outre le CYP3A, seul le CYP2C9 est présent en grande partie. La

**Figure 5** montre l'expression des différents CYP dans l'intestin grêle et le foie chez l'humain (31).



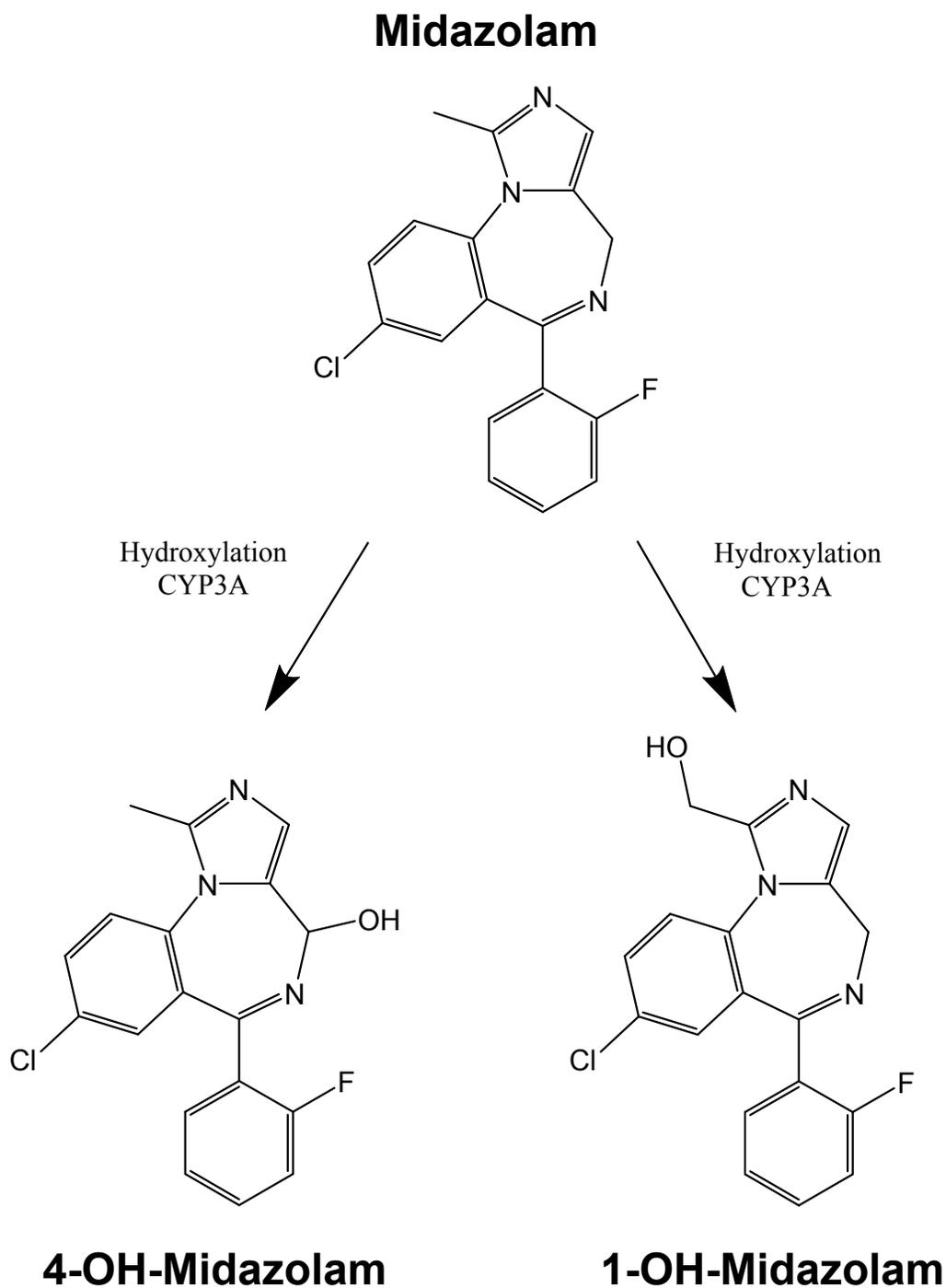
**Figure 5 – Expression des cytochromes p450 dans l'intestin grêle et le foie chez l'humain.**  
Tirée et adaptée de (31).

Plusieurs études ont essayé de quantifier précisément le contenu total en CYP de l'intestin grêle l'estimant entre 20 et 210 pmol/mg. L'incertitude autour de cette valeur montre bien la variabilité interindividuelle dans l'expression intestinale des CYP (3, 17, 31-33). En comparaison, le foie contiendrait entre 210 et 580 pmol/mg de CYP total. De plus, le contenu total en CYP dans l'intestin représenterait environ 1 % de celui du foie (3). Néanmoins, plusieurs substrats du CYP, tels que le midazolam (4, 5), le tacrolimus (6), la nifédipine (34), la féléodipine (7) et le vérapamil (35) sont fortement métabolisés par l'intestin.

L'expression des CYP dans l'intestin est plus élevée dans le duodénum et le jéjunum et diminue considérablement dans l'iléum avec pratiquement aucune expression dans le colon humain (33, 36-38). De plus, les CYP sont exprimés plus fortement dans les entérocytes matures présents au bout des villosités et sont très faiblement exprimés dans les cellules prolifératives des cryptes intestinales (33, 36, 39).

Un médicament particulièrement intéressant pour étudier le métabolisme intestinal de phase I chez l'humain et le rat est le midazolam. Le midazolam est un substrat du CYP3A4 métabolisé en 1-hydroxymidazolam et en 4-hydroxymidazolam au niveau intestinal et hépatique (40, 41). Chez l'humain, il subit une extraction intestinale de 50 % après une

administration orale (42). Les structures du midazolam et de ses deux métabolites sont illustrés à la **Figure 6**.



**Figure 6** – Voies métaboliques du Midazolam chez l’humain et le rat. Source : (40, 41)

### **1.4.1.2 – Métabolisme de phase II**

La glucuronidation est la réaction de phase II la plus importante et la mieux caractérisée du métabolisme intestinal des médicaments. L'ajout de glutathione et la sulfatation ont aussi été rapportés, mais sont moins bien connus (43). Plusieurs isoformes des UGT sont exprimées dans le tube gastro-intestinal tels que l'UGT1A1, 1A7, 1A8, 1A10, 2B7, 2B15 et 2B17 (44-46). De plus, les UGT1A7, 1A8, 1A10 et 2B17 sont exprimés spécifiquement dans l'intestin et sont indétectables dans le foie (44-47). Contrairement aux CYP, les UGT ne diminuent pas systématiquement dans le colon et certaines isoformes sont même exprimées en quantité égale ou supérieure dans le colon comparé à l'intestin grêle (44, 46). Plusieurs médicaments sont glucuronidés par l'intestin chez l'humain tels que le raloxifène (8), le diclofenac, le telmisartan (48) et la troglitazone (49).

### **1.4.1.3 – Autres enzymes importantes**

Outre le métabolisme de Phase I et de Phase II, l'intestin joue aussi un rôle important dans la conversion de plusieurs promédicaments. Par exemple, il arrive souvent qu'un groupement phosphate soit ajouté à une molécule afin d'améliorer sa solubilité. Dans ce cas, le promédicament sera converti en médicament à la membrane des cellules intestinales par l'alcaline phosphatase et sera rapidement absorbé (50). La fosphénytoïne est un exemple de promédicament phosphate utilisé pour améliorer la solubilité de la phénytoïne (51).

Il arrive aussi qu'un groupement lipophile soit ajouté par un lien ester à un médicament peu perméable pour favoriser sa perméabilité. Dans un tel cas, le groupement ester sera rapidement clivé par les estérases une fois absorbé. Comme les cellules intestinales contiennent elles aussi des estérases, elles peuvent jouer un rôle dans le clivage de ces promédicaments. Par exemple, l'énalapril est un promédicament de type ester qui est converti en énalaprilat une fois absorbé (52).

### **1.4.1.4 – Différences interespèces**

Jusqu'à maintenant, il a été seulement question du métabolisme chez l'humain. Par contre, les animaux ont aussi du métabolisme intestinal et hépatique. Il est important de savoir qu'il existe énormément de différences interespèces dans le métabolisme des médicaments.

Ainsi, le métabolisme d'un substrat peut être entièrement différent d'une espèce à l'autre. Par exemple, un médicament métabolisé par le CYP3A chez l'humain ne sera pas nécessairement métabolisé par le CYP3A chez le rat et vice-versa (53-55).

Chez le rat, on retrouve les mêmes familles d'enzymes du métabolisme que chez l'humain. Cependant, les isoformes sont différentes. Dans l'intestin de rat, on retrouve plusieurs isoformes du CYP1A, 2B, 2C, 2D et plusieurs autres isoformes du 3A comme le CYP3A1, 3A9, 3A18 et 3A62 (54, 56-60). Les isoformes du CYP3A et CYP2B seraient les plus présentes au niveau intestinal chez le rat (57). Comme chez l'humain, la glucuronidation joue aussi un rôle important dans le métabolisme intestinal chez le rat (54, 61). Le **Tableau 2** montre différents substrats des enzymes du métabolisme qu'on peut utiliser pour étudier le métabolisme intestinal chez le rat.

<b>Substrats</b>	<b>Isoformes</b>	<b>Références</b>
Phénacétine	CYP1A	(62)
Bupropion	CYP2B	(63)
Propranolol	CYP2D	(64)
Métoprolol	CYP2D et 3A	(65)
Midazolam	CYP3A	(66)
Féلودipine	CYP3A	(67)
Astémizole	CYP2J et 3A	(68)
Raloxifène	UGT	(69)

**Tableau 2 – Différents substrats du métabolisme chez le rat**

Le métoprolol est particulièrement intéressant puisqu'il est complètement absorbé (Fa=1), mais subit un très fort premier passage intestinal et hépatique lorsqu'administré oralement à des rats (70, 71). De plus, il est métabolisé en o-desméthy-metoprolol (ODM) par le CYP3A et en  $\alpha$ -hydroxy-métoprolol (OHM) et en métoprolol-acid (MA) par le CYP2D (65). Puisque l'intestin de rat contient beaucoup de CYP3A et des niveaux minimes de CYP2D (72), on peut s'attendre à des différences dans la production de ses métabolites entre l'intestin et le foie. La **Figure 7** montre les voies métaboliques de métoprolol chez le rat

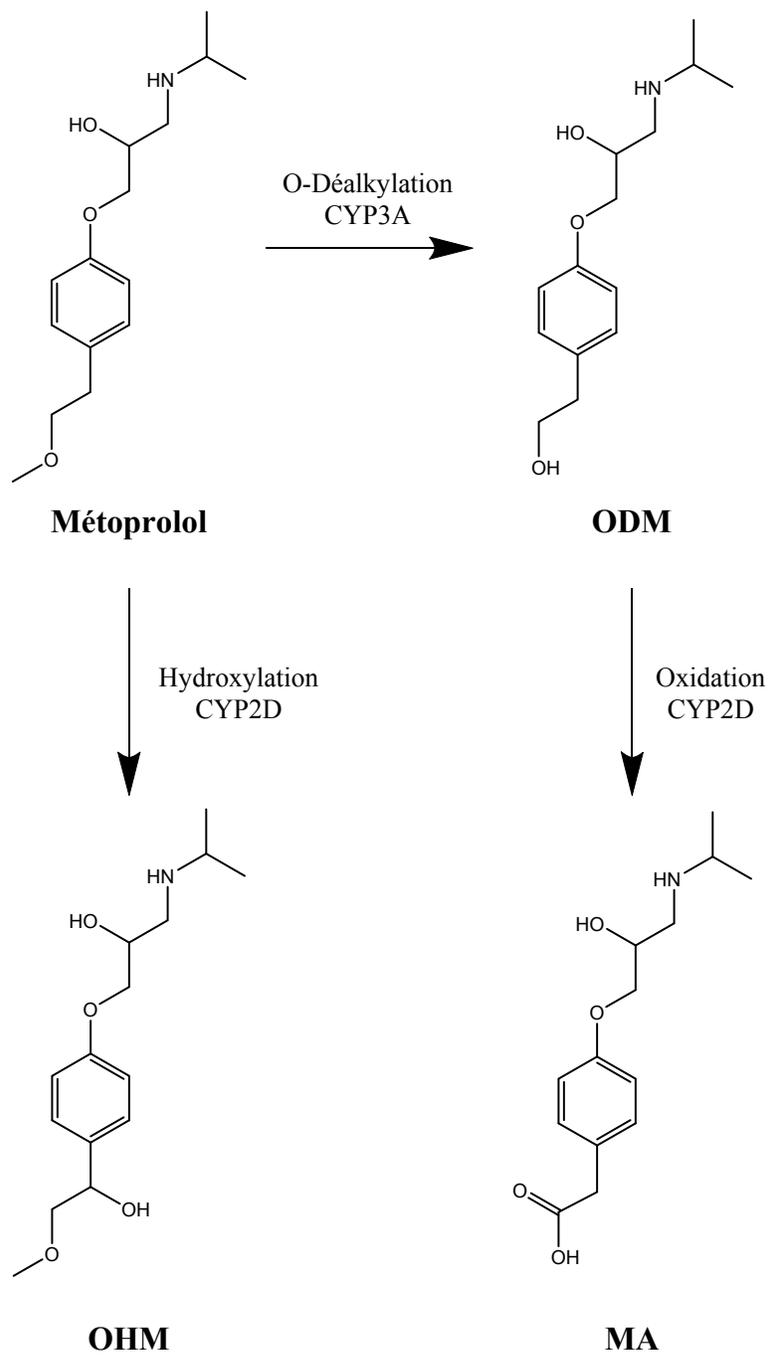


Figure 7 – Voies métaboliques du métoprolol chez le rat. Source : (65).

## **1.4.2 – Outils *in vitro* pour étudier le métabolisme intestinal**

Les outils *in vitro* permettent d'avoir une idée rapide du métabolisme d'un médicament, sans avoir recours à des études chez les animaux. Avec les outils *in vitro*, il est possible d'étudier différents paramètres, soit la clairance intrinsèque d'un médicament, son profil métabolique et même son potentiel d'inhibition ou d'induction des enzymes métaboliques (10). Alors que les outils pour étudier le métabolisme hépatique sont bien décrits, ceux pour étudier le métabolisme intestinal sont encore en développement (2). Les fractions cellulaires sont très certainement l'outil le plus utilisé, mais étant donné leurs limitations, plusieurs travaux sont effectués pour développer un modèle cellulaire qui permettrait l'étude du métabolisme intestinal.

### **1.4.2.1 – Fractions cellulaires**

Les fractions cellulaires sont obtenues par centrifugation différentielle suite à l'homogénéisation mécanique des cellules intestinales. Selon les besoins, on peut utiliser l'homogénat cellulaire, la fraction S9 (obtenue suite à une première centrifugation et qui contient un mélange de cytosol et de microsomes), la fraction cytosolique ou la fraction microsomiale. La fraction microsomiale est la plus utilisée puisqu'elle contient et concentre tous les CYP et la majeure partie des UGT. Cependant, il peut être nécessaire d'avoir recours aux autres fractions quand on étudie une enzyme cytosolique par exemple (10, 73).

Il existe différentes méthodes d'isolation des cellules intestinales qui peuvent donner des microsomes avec des activités très différentes les unes des autres. Ainsi, certaines études préparent les microsomes à partir de l'intestin entier (73), d'autres récoltent uniquement la muqueuse intestinale soit par grattage (73-79) ou par élution avec du EDTA (78-81). De plus, certaines études n'ajoutent pas d'inhibiteurs de protéases (73), alors que d'autres en ajoutent (74, 77). En général, les microsomes préparés par élution avec EDTA en présence d'inhibiteurs de protéases offrent la meilleure activité (78, 79). C'est aussi cette méthode qui est utilisée par plusieurs vendeurs comme Xenotech. Par contre, cette méthode ajoute de la variabilité puisque d'un expérimentateur à l'autre et d'un lot à l'autre ce n'est pas la même proportion d'entérocytes matures qui sera élue (81).

### 1.4.2.2 – Modèles cellulaires

L'utilisation de cellules entières comparativement aux fractions cellulaires pour étudier le métabolisme apporterait énormément d'avantages. En effet, les cellules sont un modèle dynamique qui ne nécessite pas l'ajout de cofacteurs, qui permet l'étude des interactions médicamenteuses et qui prend en compte la perméabilité membranaire des composés et leurs liaisons aux composantes cellulaires. Pour ces raisons, il a été démontré que les hépatocytes sont plus représentatifs que les microsomes pour prédire le métabolisme hépatique (82-85). Cependant, un seul article rapporte l'utilisation d'entérocytes pour étudier le métabolisme intestinal. Par contre, dans cette étude, la viabilité des entérocytes n'a pas été évaluée au-delà de 90 minutes et les auteurs ont dû utiliser  $1.5 \times 10^7$  cellules/mL afin d'observer du métabolisme (86). C'est 15 fois plus que le  $1 \times 10^6$  cellules normalement utilisé pour les études dans les hépatocytes (87). Le principal obstacle à l'utilisation des entérocytes semble être leur très faible viabilité suite à l'isolation puisque les entérocytes entrent rapidement en apoptose quand ils sont détachés de la muqueuse intestinale (88, 89).

L'utilisation de cellules en culture plutôt que de cellules fraîchement isolées permettrait d'enrayer le problème de faible viabilité causé par le stress de l'isolation. Cependant, l'utilisation de lignées cancéreuses intestinales comme les cellules Caco-2 n'est pas possible puisqu'elles contiennent des quantités négligeables d'enzymes métaboliques (90). Heureusement, les avancements dans le développement de culture primaire à partir de cellules souches intestinales (91) permettront peut-être dans quelques années de développer un modèle cellulaire pour étudier le métabolisme intestinal.

### 1.4.3 – Outils *in vivo* pour étudier le métabolisme intestinal

Bien que les outils *in vitro* nous permettent d'avoir une idée du métabolisme intestinal d'un médicament, ce n'est qu'une fois dans le corps qu'on pourra réellement déterminer l'impact du métabolisme intestinal sur la pharmacocinétique d'un médicament. Dans cette section, il sera question des différents outils disponibles pour étudier le métabolisme intestinal chez le rat.

### 1.4.3.1 – Calculs à partir des paramètres pharmacocinétiques

La méthode la plus simple pour estimer la fraction non métabolisée par l'intestin *in vivo* ( $F_g$ ) est de la calculer à partir des paramètres pharmacocinétiques i.v. à l'aide des deux formules suivantes (13) :

$$F_g = \frac{F}{F_h} \quad \text{et} \quad F_h = 1 - \frac{CL_H}{Q_H}$$

Où  $Q_H$  est le débit sanguin hépatique (70 mL/min/kg chez le rat (92)) et  $CL_H$  est déterminée à partir de la clairance plasmatique suite à une administration i.v. Cette technique fait plusieurs suppositions, soit que la fraction absorbée est complète ( $F_a = 1$ ), que l'élimination du médicament est uniquement hépatique et que la cinétique du médicament est linéaire (13). Ainsi, cette formule ne donne qu'une approximation du métabolisme intestinal et seulement des études plus élaborées avec des rats canulés ou des inhibiteurs enzymatiques permettent de déterminer plus précisément le niveau de métabolisme intestinal.

### 1.4.3.2 – Rats canulés

L'utilisation d'animaux canulés permet de déterminer précisément le  $F_g$ . Deux différentes techniques existent. La première technique consiste à administrer le composé dans le duodénum (i.d), dans la veine porte (i.p.) ainsi qu'i.v. et mesurer les concentrations plasmatiques. Dans ce cas :

$$F_h = \frac{SSC_{i.p.}}{SSC_{i.v.}} \quad \text{et} \quad F_a * F_g = \frac{SSC_{i.d.}}{SSC_{i.p.}}$$

Cependant, cette technique est moins représentative d'une administration orale, puisqu'en administrant un bolus dans le duodénum et la veine porte, on expose l'intestin et le foie à des concentrations plus élevées de médicaments que lors d'une administration orale ce qui peut saturer le métabolisme (93-95).

La seconde technique, plus récente, consiste à prélever des échantillons plasmatiques dans la veine porte (v.p.) et la veine jugulaire (v.j.) suite à une administration orale. Dans ce cas, on évite de saturer le métabolisme. On pourra déterminer le  $F_g$  et le  $F_h$  correspondant avec les équations suivantes :

$$F_h = \frac{SSC_{v.j.}}{SSC_{v.p.}} \quad \text{et} \quad F_a * F_g = \frac{Q_{v.p.} * S/P * (SSC_{v.p.} - SSC_{v.j.})}{Dose}$$

Où  $Q_{v.p.}$  est le débit sanguin dans la veine porte et S/P le ratio entre les concentrations sanguines et plasmatiques du composé (96-100). Une problématique de cette technique est qu'il faut connaître avec précision le débit sanguin de la veine porte. Or, cette valeur varie d'une étude à l'autre. En faisant la moyenne de 6 différentes études, cette valeur a été établie à  $49.8 \pm 12.9$  mL/min/kg (96, 101-105).

### 1.4.3.3 – Utilisation d'inhibiteurs

Un autre moyen de déterminer la contribution de l'intestin au métabolisme de premier passage est d'utiliser des inhibiteurs sélectifs du foie et de l'intestin. Dans ce cas, on ne fait pas une mesure quantitative du métabolisme intestinal, mais plutôt qualitative pour mieux comprendre la contribution de l'intestin au métabolisme d'un médicament.

#### 1.4.3.3.1 – 1-Aminobenzotriazole

1-Aminobenzotriazole (ABT) est un inhibiteur irréversible et non spécifique des CYP (106). Puisqu'il est bien toléré à des doses allant jusqu'à 100 mg/kg chez le rat (107) et qu'il est bien absorbé et a une faible clairance (108), il est très souvent utilisé chez le rat pour comprendre l'effet du métabolisme sur le premier passage (109) ou la toxicité d'un médicament (110). De plus, il a été rapporté qu'une administration i.v. d'ABT permettrait d'inhiber seulement le métabolisme hépatique alors qu'une administration p.o. inhiberait à la fois l'intestin et le foie. Cette hypothèse a été émise puisque la biodisponibilité du midazolam est augmentée après un traitement avec ABT p.o., mais ne l'est pas après un traitement avec ABT i.v. (111). Par contre, il faut faire attention avec ABT puisqu'une étude récente suggère qu'il pourrait affecter la vidange gastrique (112). Quoiqu'il en soit, il pourrait s'agir d'un outil prometteur pour étudier le métabolisme intestinal *in vivo*.

#### 1.4.3.3.2 – Jus de pamplemousse

Le jus de pamplemousse (GFJ) est connu pour les interactions médicamenteuses qu'il peut causer chez l'humain avec plusieurs médicaments comme le midazolam (113) et la felodipine (7). Plusieurs cas d'arrêts cardiaques ont même été rapportés suite à la prise de

terfenadine après avoir consommé du pamplemousse (114). Ces interactions médicamenteuses sont en fait causées par une forte inhibition du CYP3A4 intestinal par les furanocoumarins présents dans le pamplemousse (7, 115). Plus précisément, le bergamottin, le bergaptol et le 6-7-dihydroxybergamottin seraient tous les trois responsables dans des proportions différentes (115-117).

L'inhibition sélective du CYP3A4 intestinal par le GFJ en fait un outil intéressant pour étudier le métabolisme intestinal *in vivo*. Ainsi, différentes études chez le rat ont montré que le GFJ pouvait affecter la pharmacocinétique de plusieurs substrats de la famille CYP3A (118-120). Par contre, il faut faire attention en utilisant le GFJ puisque des interactions avec certains transporteurs ont aussi été rapportées (121).

#### **1.4.4 – Facteurs influençant le métabolisme intestinal**

Le niveau de métabolisme intestinal d'un composé dépend de quatre principaux facteurs : sa clairance intrinsèque, sa perméabilité, sa liaison aux protéines et le débit mucosal (13, 17). La clairance intrinsèque d'un médicament est certainement le facteur le plus important. Il s'agit de la capacité des enzymes du métabolisme à métaboliser le médicament indépendamment des autres facteurs. C'est cette caractéristique qu'on détermine dans un système de métabolisme *in vitro* (42). La perméabilité influence aussi le métabolisme intestinal d'un médicament puisque les médicaments très perméables passeront que très peu de temps dans les cellules intestinales étant absorbés très rapidement (13). À l'inverse, les médicaments peu perméables ou substrats des transporteurs d'efflux seront particulièrement exposés aux enzymes puisqu'ils passeront plus de temps dans les cellules intestinales (122, 123). Le débit intestinal affecte le métabolisme de la même manière que la perméabilité puisque si le débit est lent, les médicaments passeront plus de temps à entrer dans la circulation. Enfin, la liaison aux protéines affecte aussi le métabolisme puisque c'est seulement la fraction libre d'un médicament qui peut être métabolisée (13, 17).

#### **1.4.5 – Différences entre le métabolisme intestinal et hépatique**

Le métabolisme intestinal est très différent du métabolisme hépatique. Dans un premier temps, les enzymes du métabolisme ne sont pas exprimées dans les mêmes proportions dans

les deux organes (31) et certaines isoformes comme les UGT1A8 et 1A10 sont même spécifiques à l'intestin (44). Une autre principale différence est l'exposition au médicament. En effet, certaines régions de l'intestin lors de l'absorption sont exposées à une très grande concentration de médicaments comparativement au foie (124). De plus, les molécules absorbées doivent impérativement passer dans les entérocytes pour atteindre la circulation alors que dans le foie les molécules se retrouvent dans le sang et n'entreront pas nécessairement dans les hépatocytes (2). Ces différences font qu'un médicament ne sera pas nécessairement métabolisé à la même vitesse ni en les mêmes métabolites dans l'intestin et le foie.

Un bon exemple de l'impact de ces différences est le raloxifène. Le raloxifène est un modulateur sélectif du récepteur à l'œstrogène utilisé pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose et du cancer du sein (8, 125). Il a été démontré dans des microsomes de foie que le raloxifène peut former des métabolites réactifs ce qui peut mener à de la toxicité (8). Cependant, on n'observe pas la présence de ces métabolites réactifs chez l'humain puisque le raloxifène est glucuronidé à 95 % par les UGT1A1, 1A8 et 1A10 au niveau de l'intestin lors du premier passage (8, 125-127). Les UGT1A8 et 1A10 n'étant pas exprimés au niveau du foie, la glucuronidation du raloxifène y joue un rôle moins important laissant place à du métabolisme de phase I qui, dans ce cas, forme des métabolites réactifs (8, 126, 127). Dans cet exemple, l'intestin joue donc un rôle protecteur en évitant que le métabolisme se produise dans le foie.

## 1.5 – Objectifs de recherche

L'objectif de ces travaux de maîtrise est d'utiliser, caractériser et développer différents outils *in vitro* et *in vivo* pour mieux comprendre et prédire l'impact du métabolisme intestinal sur l'effet de premier passage des médicaments en comparaison avec le métabolisme hépatique.

Pour ce faire, plusieurs composés contrôles ont été incubés dans des microsomes intestinaux et hépatiques pour déterminer leur métabolisme afin de cibler les différences quantitatives dans la vitesse de métabolisme ainsi que les différences qualitatives dans la formation de métabolites entre les deux organes.

Afin de mettre en perspective l'impact de ces différences *in vivo*, des études pharmacocinétiques avec ont été effectuées chez le rat en utilisant des rats canulés ou traités avec des inhibiteurs enzymatiques. Le métoprolol a été choisi pour ces études puisqu'il est métabolisé différemment par les deux organes. Enfin, l'utilisation d'ABT pour étudier le métabolisme *in vivo* a été évaluée plus spécifiquement et a fait l'objet d'une publication.

Ces travaux ont permis d'améliorer la connaissance des différents outils *in vitro* et *in vivo* pour étudier le métabolisme intestinal et ont aussi permis de mieux comprendre la contribution du métabolisme intestinal au profil pharmacocinétique des médicaments.



## **Chapitre 2 : Matériels et Méthodes**

### **2.1 – Animaux**

Des rats Sprague-Dawley males pesant entre 200 et 250 g ont été obtenus de Charles River (St-Constant, Qc, Canada). Ils ont été logés dans une pièce à température contrôlée avec un cycle de lumière de 12 h et un accès illimité à de l'eau et de la nourriture. À moins d'indications contraires, tous les rats ont été mis à jeun de nourriture 16 h avant d'effectuer les expériences. Toutes les expériences effectuées avec les animaux ont été approuvées par un comité d'éthique et ont été effectuées selon les règles du Conseil canadien de protection des animaux en science.

### **2.2 – Préparation de microsomes intestinaux**

Les microsomes intestinaux ont été préparés par élution au EDTA selon un protocole déjà publié (128). En résumé, les deux premiers tiers du petit intestin ont été isolés et rincés avec une solution saline tamponnée. L'intestin a été rempli d'une solution PBS contenant 1.5 mM EDTA, 3 U/mL héparine et 0.5 mM DTT et immergé dans du PBS contenant 20 % Glycérol. L'intestin a été brassé vigoureusement pendant 15 minutes et les cellules détachées ont été prélevées. Cette étape a été répétée 8 fois de façon à obtenir 8 différentes factions. Les cellules intestinales des 8 fractions ont été combinées, lavées puis lysées dans une solution contenant 5 mM histidine, 250 mM sucrose et 0.5 mM EDTA à pH 7. Les microsomes ont été préparés par centrifugation différentielle à 12 000 g et 100 000 g en utilisant une méthode déjà publiée (128).

Les microsomes hépatiques ont été préparés en utilisant un protocole standard (129). Le foie a été coupé en petits morceaux de 1-5 mm<sup>2</sup> et a été congelé dans de l'azote liquide. Les morceaux de foie ont été homogénéisés au Potter et les microsomes ont été préparés par centrifugation différentielle à 12 000 g et 27 000 g.

Les microsomes ont été suspendus dans du tampon 0.1 M Tris-HCL pH 7.4 contenant 15 % Glycérol et 0.15 M NaCl. La concentration protéique des microsomes a été déterminée en utilisant l'essai BCA (Life technologies).

## 2.3 – Détermination de la clairance

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour déterminer la clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ). La première méthode consiste à déterminer la  $CL_{int}$  à partir de la pente d'élimination :

$$CL_{int}(\mu L/min/mg) = -K_{el} \times V$$

Où  $K_{el}$  est la pente d'élimination du médicament en fonction du temps sur une échelle logarithmique et  $V$  est le volume d'incubation en  $\mu L/mg$  de protéines microsomales. Pour la déterminer, un composé à  $1 \mu M$  a été incubé à  $37 \text{ }^\circ C$  dans  $0.5 \text{ mg/mL}$  de microsomes intestinaux ou  $0.1 \text{ mg/mL}$  de microsomes hépatiques en présence de  $1.5 \text{ mM}$  NADPH ou  $1.5 \text{ mM}$  UDPGA (UDPGA pour Raloxifène seulement). Après 0, 5, 15, 30, 60 et 120 minutes,  $25 \mu L$  de réaction ont été prélevés. Les échantillons ont été extraits en ajoutant  $25 \mu L$  de solution 1 : 1 : 1 ACN : MeOH :  $H_2O$  et  $150 \mu L$  d'ACN contenant  $0.1 \mu g/mL$  du standard interne labétalol. Si nécessaire, des courbes standards ont été préparées en utilisant des échantillons contrôles. Les échantillons ont été dilués 1 : 1 avec de l'eau et analysés par LC-MS/MS.

La seconde méthode consiste à mesurer la  $CL_{int}$  à partir des concentrations de métabolites. Pour ce faire, l'apparition des métabolites d'un composé est évaluée après un temps déterminé en présence de différentes concentrations du composé allant de  $0.5$  à  $200 \mu M$  dans les mêmes conditions que celles mentionnées plus haut. Dans ce cas, la constante d'affinité ( $K_m$ ) et la vélocité maximale ( $V_{max}$ ) pour chaque métabolite ont été déterminées à l'aide du logiciel GraphPad Prism et la  $CL_{int}$  a été déterminée en divisant le  $V_{max}$  par le  $K_m$ . Les conditions spécifiques pour le midazolam et le métoprolol sont décrites dans le **Tableau 3**.

Composés	Concentration microsomes		Temps d'incubation	Métabolites mesurés
	Intestinaux	Hépatiques		
Midazolam	1 mg/mL	0.1 mg/mL	15 minutes	1-OH-Midazolam, 4-OH-Midazolam
Métoprolol	1 mg/mL	0.5 mg/mL	30 minutes	ODM, OHM, MA

**Tableau 3 – Conditions d'incubation pour le  $K_m$  et  $V_{max}$**

## 2.4 – Expériences pharmacocinétiques

Toutes les administrations orales ont été effectuées en administrant un bolus directement dans l'estomac en utilisant une seringue à gavage. Les administrations intraveineuses ont été réalisées en injectant un bolus dans une veine de la queue du rat. Dans toutes les expériences pharmacocinétiques, les rats ont eu accès à de la nourriture 2 h après l'administration du médicament.

Pour les études pharmacocinétiques avec le métoprolol (3 animaux par groupe), le métoprolol a été formulé à 2 mg/mL dans de l'eau et administré p.o. à 10 mg/kg (5 mL/kg) ou i.v. à 2 mg/kg. Du sang a été prélevé de la veine jugulaire après 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 et 24 h. Les échantillons sanguins ont immédiatement été transférés dans des tubes contenant du EDTA K3 et le plasma a été isolé suite à une centrifugation de 10 minutes à 1620 g à 4 °C. Les échantillons de plasma ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse. Pour les études dans des rats canulés dans la veine porte et la veine jugulaire, des échantillons sanguins ont été prélevés simultanément dans la veine porte et la veine jugulaire après 0.05, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 et 8 h. Pour les études avec du jus de pamplemousse, 2 mL de jus fraîchement pressé de pamplemousses du marché ont été administrés p.o. aux rats 16 h et 30 minutes avant l'administration du métoprolol. Pour les études d'excrétion, du métoprolol a été administré p.o. (10 mg/kg) à des rats (n=3) et l'urine et les fèces ont été collectées sur glace sèche pendant 72 h dans des cages métaboliques. Avant l'analyse, les fèces ont été homogénéisées et diluées 1 :10 avec de l'eau.

Les échantillons ont été extraits en ajoutant 25 uL de plasma à 25 uL de 1 :1 :1 ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O et 150 uL de ACN contenant 0.1 ug/mL de labétalol. Une courbe standard de 1 à 10 000 ng/mL contenant le métoprolol et ses trois métabolites a aussi été préparée en même temps que les échantillons. Les échantillons ont été dilués 1 :1 avec de l'eau et ont été analysés par LC-MS/MS.

## 2.5 – Analyses LC-MS/MS

Toutes les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées sur un spectromètre de masse triple quadripolaire Vantage (Thermo Scientific). Les détails des conditions de

spectrométrie de masse ainsi que les colonnes utilisées pour la chromatographie de tous les composés testés sont décrits dans le **Tableau 4**.

## 2.6 – Analyse des données

Les paramètres pharmacocinétiques (SSC,  $CL_T$ ,  $T_{1/2}$ ,  $T_{max}$  et  $C_{max}$ ) ont été déterminés par le logiciel Watson (Thermo Scientific) en utilisant une analyse non-compartmentale. Dans tous les cas, la SSC a été calculée à partir des concentrations plasmatiques du temps 0 au dernier temps avec des concentrations mesurables. La biodisponibilité (% F), le  $F_a * F_g$  et le  $F_h$  ont été déterminés à l'aide des équations suivantes :

$$\% F = \frac{SSC_{p.o.}}{SSC_{i.v.}} \times \frac{Dose_{i.v.}}{Dose_{p.o.}} \qquad F_h = \frac{SSC_{v.j.}}{SSC_{v.p.}}$$

$$F_a * F_g = \frac{Q_{v.p.} * S/P * (SSC_{v.p.} - SSC_{v.j.})}{Dose}$$

La valeur de 49.8 mL/min déterminé à partir de 6 articles (96, 101-105) a été utilisée pour le débit sanguin dans la veine porte ( $Q_{v.p.}$ ). Pour déterminer le ratio entre les concentrations sanguines et plasmatiques (S/P), un échantillon supplémentaire de sang a été prélevé dans l'étude avec les rats canulés en même temps que l'échantillon plasmatique de 2 h. Le sang a été dilué 1 : 3 avec du citrate et a été extrait de la même manière que les échantillons plasmatiques. Le ratio obtenu a été de 1.54 pour le métoprolol.

Les analyses statistiques entre les groupes ont été calculées en utilisant un test de student pour les comparaisons entre 2 groupes ou en utilisant une analyse de la variance unidirectionnelle (ANOVA) avec un test Tukey-Kramer pour les comparaisons entre plus de 2 groupes. Toutes les différences avec une valeur P de moins de 0.05 ont été considérées comme étant statistiquement significatives.

Composés	Transitions (Parent→Fragment)	Énergie de collision	Mode	Colonnes HPLC utilisées
1-OH-Midazolam	341.9→203.1	38	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)
4-OH-Midazolam	342.1→234.1	23	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)
Astémizole	459.1→135	36	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)
Bupropion	240.1→131.1	25	+	Ace 3 C18-PFP 50 x 4.6mm (ACT)
Féلودipine	384.1→338.0	14	+	Ace 3 C18-PFP 50 x 4.6mm (ACT)
Labétalol	329.1→311.2 327.1→309.2	12 20	+ -	Tous (Standard interne)
MA	268.2→145.2	21	+	Ace 3 C18-PFP 50 x 4.6mm (ACT)
Métoprolol	268.2→159.2	20	+	Ace 3 C18-PFP 50 x 4.6mm (ACT)
Midazolam	326.1→291.2	26	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)
ODM	268.2→159.2	20	+	Ace 3 C18-PFP 50 x 4.6mm (ACT)
OHM	284.0→91.1	38	+	Ace 3 C18-PFP 50 x 4.6mm (ACT)
Phenacétine	180.1→110.1	19	+	Ace 3 C18-PFP 50 x 4.6mm (ACT)
Propranolol	260.1→183.1	17	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)
Raloxifène	474.2→112.1	29	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)
Raloxifène-4- Glucuronide	650.2→474.2	26	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)
Raloxifène-6- Glucuronide	650.2→474.2	26	+	Pursuit C8 50 x 2.1 mm (Agilent)

**Tableau 4 – Conditions LC-MS/MS utilisées.**



## Chapitre 3 : Résultats

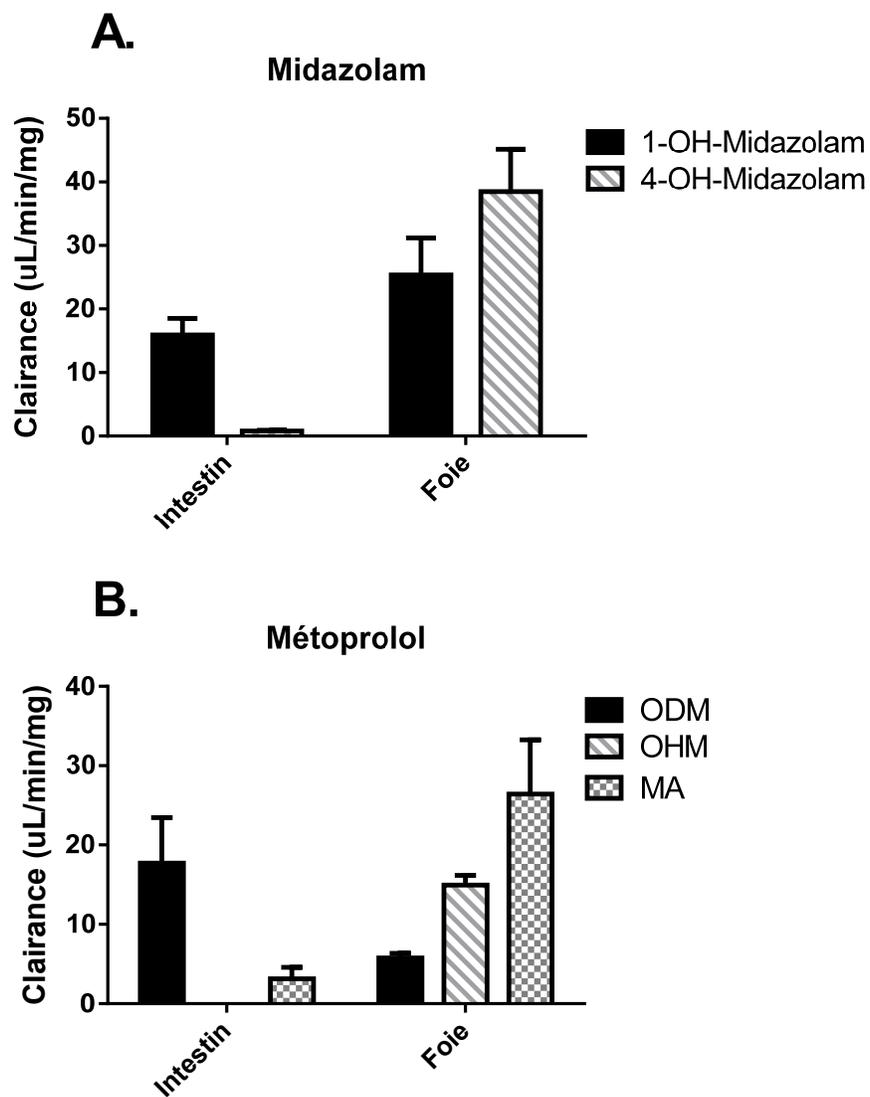
### 4.1 – Différences quantitatives et qualitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique dans les microsomes

Le **Tableau 5** montre la clairance de différents substrats des enzymes de phase I et de phase II dans des microsomes intestinaux et hépatiques de rats. En résumé, on n'observe que très peu de métabolisme intestinal pour les substrats du CYP1A, 2B et 2D alors que les substrats du CYP3A, 2J et des UGT ont une clairance plus élevée. Il est important de noter qu'on n'observe aucune corrélation entre le métabolisme intestinal et hépatique. Par exemple, le midazolam a une clairance beaucoup plus élevée que le métoprolol dans les microsomes hépatiques, mais ces deux substrats ont une clairance équivalente dans les microsomes intestinaux. Aussi, l'astémizole est le composé le plus métabolisé dans les microsomes intestinaux et la fêlodipine le plus métabolisé dans les microsomes hépatiques.

La **Figure 8** illustre les différences qualitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique chez le rat. Pour le midazolam, l'intestin de rat produit presque uniquement le 1-OH-Midazolam alors que le foie produit en plus grande quantité le 4-OH-Midazolam comparativement au 1-OH-Midazolam. On observe aussi des différences pour le métoprolol puisque l'intestin produit presque uniquement le ODM alors que le foie produit en plus grande quantité le MA et le OHM et seulement en petite quantité le ODM.

Substrats	Isoformes	Clairance (uL/min/mg)		$\frac{CL_{\text{foie}}}{CL_{\text{intestin}}}$
		Intestin	Foie	
<b>Phénacétine</b>	CYP1A	Indélectable	24	-----
<b>Bupropion</b>	CYP2B	2.7	41.5	15.4
<b>Propranolol</b>	CYP2D	3.8	282	74.2
<b>Métoprolol</b>	CYP2D et 3A	19.2	62	3.3
<b>Midazolam</b>	CYP3A	20.7	948.5	45.8
<b>Féلودipine</b>	CYP3A	8.7	1764	203
<b>Astémizole</b>	CYP2J et 3A	188.8	596	3.2
<b>Raloxifène</b>	UGT	22	142	6.5

**Tableau 5 – Différences quantitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique.** La clairance de plusieurs substrats a été déterminée dans des microsomes commerciaux intestinaux et hépatiques par la méthode de la pente  $K_{el}$ .



**Figure 8 – Différences qualitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique de midazolam (A.) et métoprolol (B.).** La clairance des métabolites de midazolam et métoprolol a été déterminée par la méthode du  $K_m$  et du  $V_{max}$  dans des microsomes intestinaux et hépatiques préparés à partir de 3 rats. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart type.

## **3.2 – Utilisation et caractérisation de modèles *in vivo* chez le rat pour comprendre les différences entre le métabolisme intestinal et hépatique en utilisant le substrat métoprolol**

### **3.2.1 – Pharmacocinétique et métabolisme de métoprolol chez le rat**

Afin de déterminer son profil pharmacocinétique, le métoprolol a été administré i.v. à 2 mg/kg et p.o. à 10 mg/kg à des rats. Les principaux paramètres pharmacocinétiques mesurés sont décrits dans le **Tableau 6**. De plus, la **Figure 9** montre le profil pharmacocinétique oral du métoprolol administré à 10 mg/kg. En résumé, le métoprolol subit un très fort premier passage puisque la biodisponibilité mesurée est de 11.4 % et qu'on retrouve de plus grandes quantités de métabolites en circulation que de molécule mère suite à une administration orale. En effet, la SSC du métoprolol est seulement de 0.127 ug\*h/mL alors que celles du MA, OHM et ODM sont de 13.4, 1.03 et 0.304 ug\*h/mL respectivement. Le métoprolol est éliminé par les reins sous forme de métabolites puisque 90.0 % de la dose est excrétée dans l'urine de 0 à 72 h majoritairement en MA (76.5 %). Cependant, on y retrouve aussi du OHM (9.72 %) et du ODM (3.36 %) et uniquement des traces de métoprolol (0.33 %). Dans les fèces, on retrouve moins de 5 % de la dose totale sous forme de métabolites ou de molécule mère (résultats non présentés), ce qui indique une bonne absorption.

### **3.2.2 – Étude du métabolisme de metoprolol dans des rats canulés dans la veine jugulaire et la veine porte**

La **Figure 10** montre les concentrations plasmatiques de métoprolol et ses métabolites dans la veine porte et la veine jugulaire suite à une administration orale à 10 mg/kg. En résumé, on retrouve beaucoup plus de métoprolol dans la veine porte que dans la veine jugulaire (SSC de 1.78 et 0.53 ug\*h/mL respectivement). De plus, seulement les concentrations plasmatiques pendant les 30 premières minutes sont différentes entre les deux veines, ce qui suggère que l'absorption du métoprolol a lieu pendant cette période. À partir de ces données, on peut estimer le  $F_g$  à  $0.577 \pm 0.292$  et le  $F_h$  à  $0.313 \pm 0.112$ . Ainsi, 42.3 % de

la dose du métoprolol serait métabolisée lors du premier passage intestinal et 39.6 % lors du premier passage hépatique.

Il est important de mentionner que dans cette expérience, la SSC de métoprolol dans la veine jugulaire est 4 fois plus élevée que celle obtenue dans l'expérience précédente dans des rats non canulés (0.53 versus 0.127 ug\*h/mL). La biodisponibilité mesurée est donc de 48 % dans cette expérience plutôt que 11.4 % dans les rats normaux. Les causes possibles de cette différence seront discutées dans le chapitre 5.

### **3.2.3 – Utilisation des interactions médicamenteuses pour distinguer entre le métabolisme intestinal et hépatique du métoprolol**

#### **3.2.3.1 – Utilisation du jus de pamplemousse**

La **Figure 11** montre l'effet du jus de pamplemousse sur le métabolisme intestinal et hépatique. Dans le foie, on ne voit aucune inhibition significative de la formation des trois métabolites de métoprolol : ODM et OHM ne sont pas modulés alors que le métabolisme de MA est diminué d'un facteur 2. Dans l'intestin par contre, le jus de pamplemousse a eu un impact majeur et a diminué de 15 fois l'apparition du ODM et a rendu indétectable la formation du MA.

La **Figure 12** montre quant à elle l'effet du jus de pamplemousse sur les concentrations plasmatiques du métoprolol et ses métabolites. En résumé, le jus de pamplemousse n'a eu aucun impact sur les concentrations plasmatiques de métoprolol et seulement un effet mineur et non significatif sur les concentrations plasmatiques de ODM et MA pendant la première heure. De plus, aucun changement significatif de la SSC du métoprolol et de ses métabolites n'a été observé.

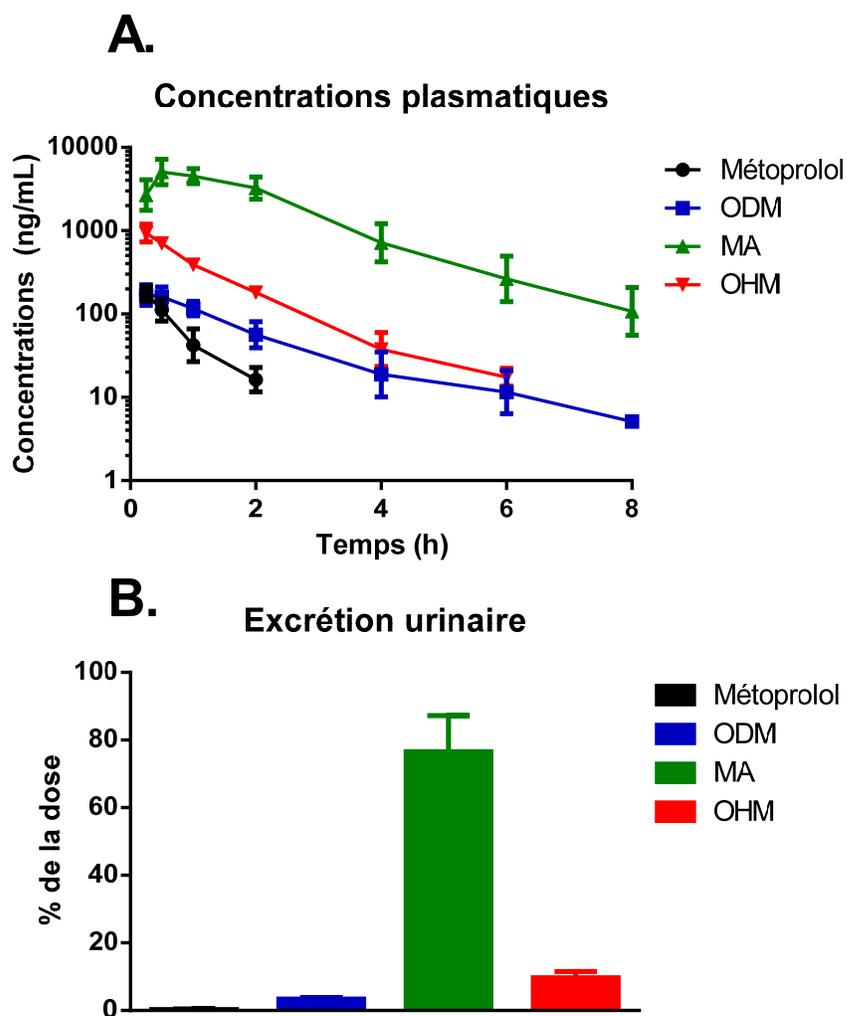
#### **3.2.3.2 – Utilisation de 1-Aminobenzotriazole**

Cette section est présentée dans l'article contenu dans le **Chapitre 4**. En résumé, il a été démontré que l'ABT inhibe à la fois le métabolisme intestinal et hépatique lorsque donnée intraveineux ou oral. Par contre, il affecte aussi la vidange gastrique lorsqu'il est administré 1

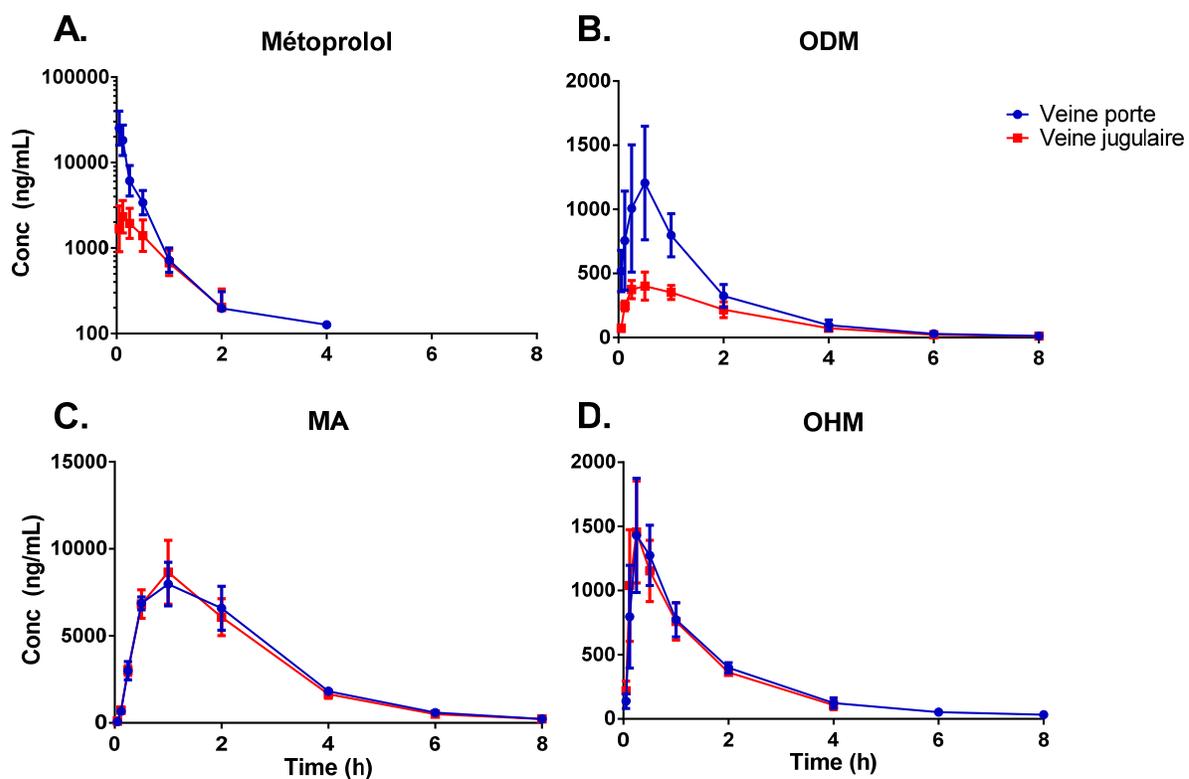
h avant le médicament d'intérêt. L'impact de l'administration d'ABT sur la pharmacocinétique du métoprolol est discuté dans l'article.

<b>Paramètres pharmacocinétiques</b>	<b>Métoprolol 2 mg/kg i.v.</b>	<b>Métoprolol 10 mg/kg p.o.</b>
<b>SSC (ug*h/mL)</b>	0.222 ± 0.015	0.127 ± 0.081
<b>CL<sub>T</sub> (mL/min/kg)</b>	124 ± 3	-----
<b>T<sub>1/2</sub> (h)</b>	0.42 ± 0.06	1.13 ± 0.99
<b>V<sub>d</sub> (L/kg)</b>	4.07 ± 0.66	-----
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	-----	0.176 ± 0.040
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	-----	0.25
<b>% F</b>	-----	11.4 ± 7.3

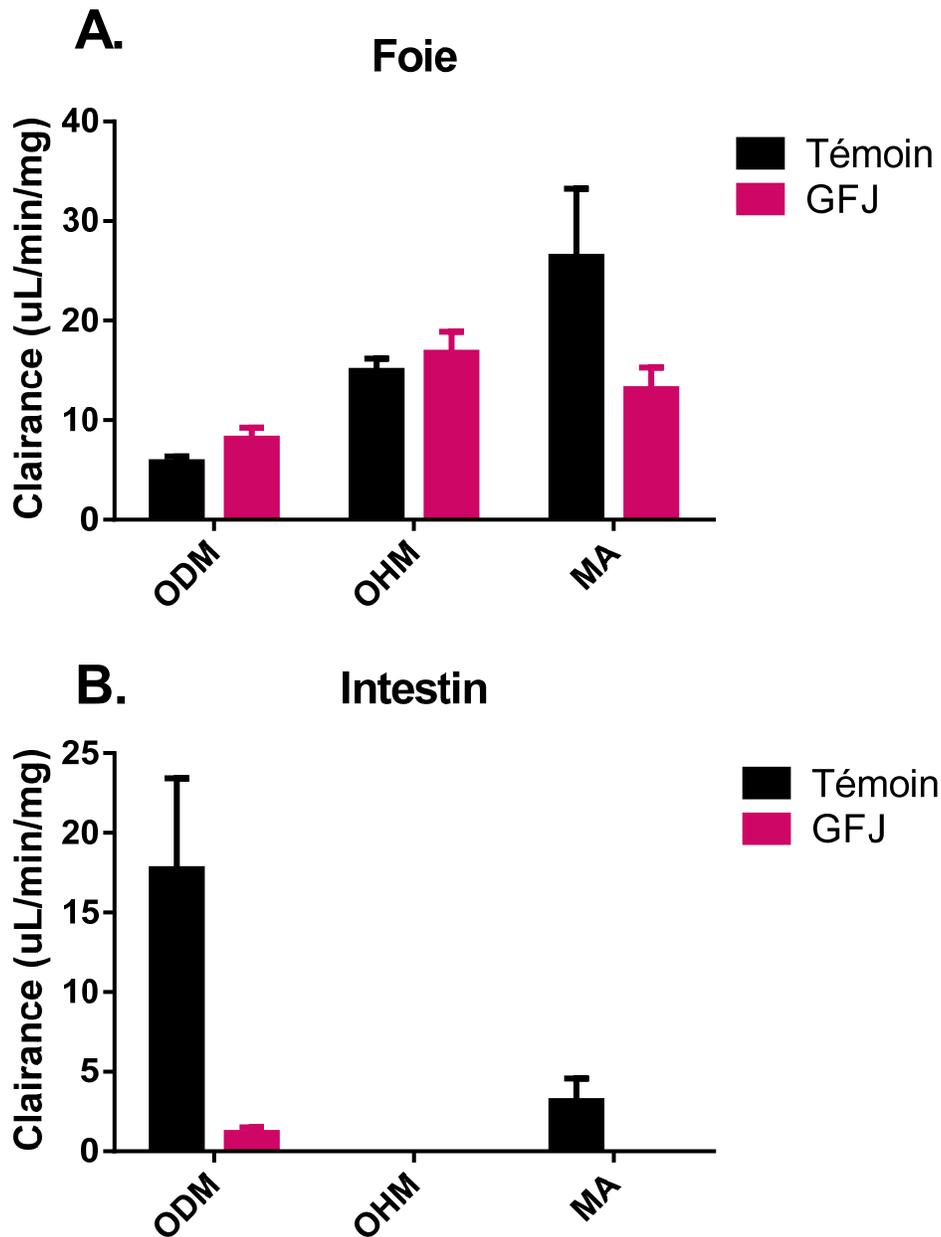
**Tableau 6 – Paramètres pharmacocinétiques du métoprolol administré i.v. et p.o.** La surface sous la courbe du temps 0 au dernier temps avec une concentration mesurable (SSC), la clairance plasmatique totale (CL<sub>T</sub>), le temps de demi-vie (T<sub>1/2</sub>), le volume de distribution V<sub>d</sub>, la concentration maximale (C<sub>max</sub>), le temps au C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>) et la biodisponibilité (% F) ont été déterminés dans des rats suite à une administration intraveineuse de 2 mg/kg ou une administration orale de 10 mg/kg du métoprolol (3 animaux par groupe). Les valeurs sont la moyenne ± l'écart type.



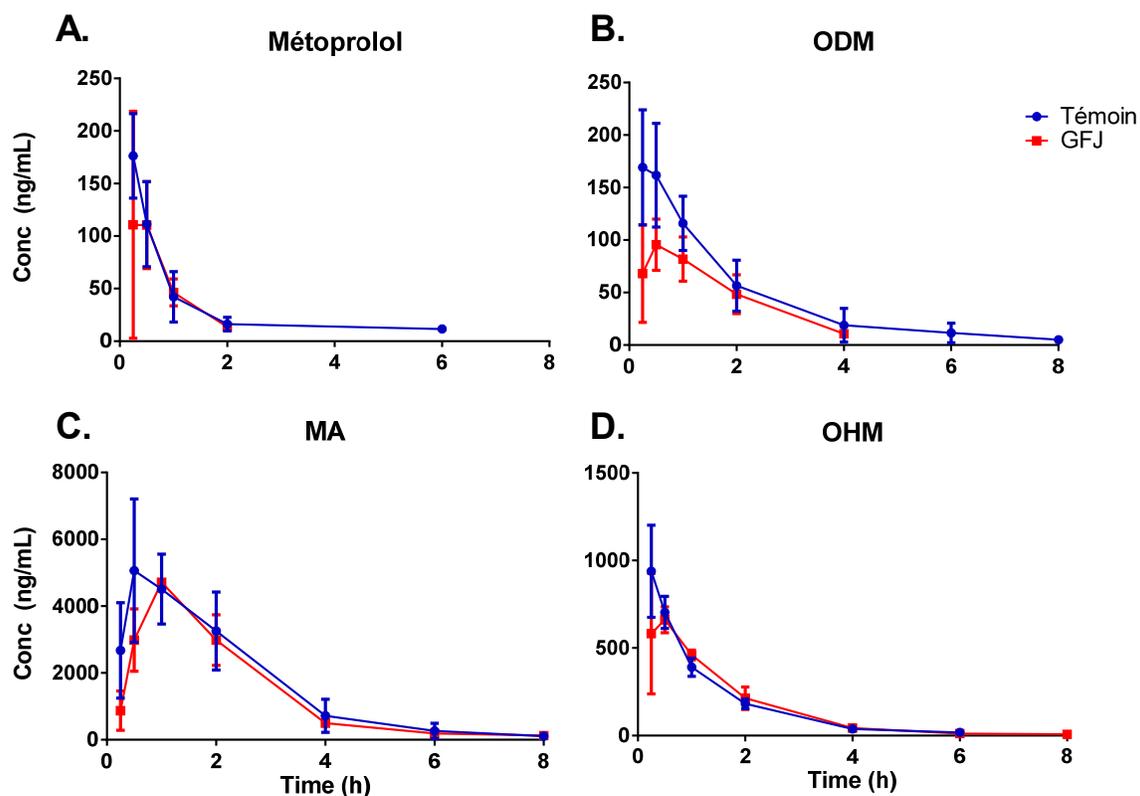
**Figure 9 – Profil pharmacocinétique oral de métoprolol chez le rat.** Les concentrations plasmatiques (A.) et l'excrétion urinaire (B.) de métoprolol et ses métabolites ont été déterminés dans des rats suite à l'administration orale de 10 mg/kg de métoprolol à 3 rats. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart type.



**Figure 10 – Concentrations plasmatiques de métoprolol et ses métabolites dans la veine porte et jugulaire.** Les concentrations plasmatiques de métoprolol (A.), ODM (B.), MA (C.) et OHM (D.) ont été déterminées dans la veine porte et la veine jugulaire suite à l'administration orale de 10 mg/kg de métoprolol à trois rats canulés. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart type.



**Figure 7 – Effet du jus de pamplemousse sur le métabolisme intestinal et hépatique de métoprolol.** La clairance de métoprolol a été déterminée dans des microsomes intestinaux (A.) et hépatiques (B.) de rats témoins ou traités avec 2 mL de jus de pamplemousse 16 h et 30 minutes avant le sacrifice (3 animaux par groupes). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart type.



**Figure 8 – Profil pharmacocinétique de métoprolol dans des rats témoins et traités avec du jus de pamplemousse.** Les concentrations plasmatiques de métoprolol (A.), ODM (B.), MA (C.) et OHM (D.) ont été déterminées suite à l’administration orale de 10 mg/kg de métoprolol à des rats témoins ou prétraités avec 2 mL de jus de pamplemousse 16 h et 30 minutes avant l’administration de métoprolol (3 animaux par groupes). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l’écart type.

## **Chapitre 4 : Article**

### **In vitro and in vivo mechanistic studies toward understanding the role of 1-aminobenzotriazole in rat drug-drug interactions**

Marc-Olivier Boily, Nathalie Charet, Julie Laterreur, François A. Leblond, Chantal Boudreau,  
Marie-Claude Duquet, Jean-François Lévesque, Line Ste-Marie, Vincent Pichette

Service de Néphrologie et Centre de Recherche, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Faculté de  
Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada. MOB, FAL, VP

Vertex Pharmaceuticals Canada Incorporated, Laval, Quebec, Canada. MOB, NC, JL, CB,  
MCD, JFL, LSM

Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology  
and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

**Running title:** Effect of ABT on pharmacokinetics of metoprolol in rats

**Number of:**

- Text pages :13
- Tables : 4
- Figures : 3
- References : 26
- Words :
  - o Abstract : 250
  - o Introduction : 585
  - o Discussion : 1144
  - o Total : 3825

**Abbreviations:** ABT, 1-Aminobenzotriazole; AUC, Area under the curve; CE, Collision energy;  $CL_{int}$ , Intrinsic clearance;  $C_{max}$ , Maximal concentration; DDI, Drug-drug interactions; % F, Bioavailability; i.v., Intravenous;  $K_m$ , Concentration at half the maximal velocity; LC-MS/MS, Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; MA, Metoprolol acid; ODM, o-desmethyl-metoprolol; OHM,  $\alpha$ -hydroxy-metoprolol; PK, Pharmacokinetics;  $T_{1/2}$ , Half-life;  $T_{max}$ , Time at maximal concentration;  $V_{max}$ , Maximal velocity.

## Abstract

1-Aminobenzotriazole (ABT) is regularly used *in vivo* as a non-specific and irreversible cytochrome P450 inhibitor to elucidate the role of metabolism on the pharmacokinetic profile of xenobiotics. However, few reports have considered the recent findings that ABT can alter drug absorption or have investigated the possible differential inhibition of ABT on intestinal and hepatic metabolism. To address these uncertainties, pharmacokinetic studies under well-controlled and defined ABT pretreatment conditions (50 mg/kg, 1 h ABT i.v. and 16 h ABT p.o.) were conducted prior to the oral administration of metoprolol, a permeable P450 probe that undergoes extensive intestinal and hepatic metabolism. The pharmacokinetic profile of metoprolol was affected differently by the two ABT pretreatments. An increase in AUC of 16-fold with ABT p.o. and 6.5-fold with ABT i.v. was observed compared to control. Based on *in vitro* studies, this difference could not be attributed to a differential inhibition of intestinal and hepatic metabolism. In the ABT i.v. pretreatment, the increase in AUC was also associated with a prolonged T<sub>max</sub> (24-fold versus control) suggesting a delay in absorption. This was further confirmed by the administration of a charcoal meal which resulted in a 7-fold increase in stomach weights in the 1 h ABT pretreated groups compared to untreated or 16 h ABT pretreated rats. Based on these results, we recommend pretreating rats with ABT p.o. 16 h before the administration of a test compound to preserve the inhibitory effect on intestinal and hepatic metabolism and to avoid the confounding effect on drug absorption.

## Introduction

1-Aminobenzotriazole (ABT) is an irreversible and non-specific inhibitor of the major cytochrome P450 enzymes responsible for the metabolism of many xenobiotics (Balani et al., 2002). Upon oxidation, ABT forms a reactive benzyne intermediate which inactivates the cytochrome P450 by alkylation of the prosthetic heme (Mico et al., 1988). Since ABT is highly soluble, has a good *in vivo* bioavailability (%F), a low clearance (Town et al., 1993) and a good safety profile at doses up to 100 mg/kg in rats (Meschter et al., 1994), it is used to understand the role of metabolism on the pharmacokinetics (PK) of drugs in pre-clinical species. For example, it has been reported that ABT can be used to discriminate between poor absorption and extensive CYP-mediated metabolism for poorly bioavailable compounds (Caldwell et al., 2005). It can also be valuable in distinguishing between the toxicity mediated by the parent drug and its metabolites (Subramanian et al., 2014). There is even some evidence that the route of administration of ABT could provide insights on the contribution of hepatic versus intestinal metabolism to the first pass effect. This assumption is predicated on the fact that the bioavailability of midazolam was not affected by a treatment with ABT i.v., while there was a significant increase when ABT was given orally. Since midazolam is known to be highly metabolised in the gut, the authors concluded that ABT i.v. did not inhibit gut enzymes in comparison to ABT p.o. (Strelevitz et al., 2006).

Although there are numerous studies demonstrating the ability of ABT to block metabolism *in vivo*, there is a lack of consistent methodologies in these studies (**Table 1**) and therefore, it is difficult to extrapolate conclusions from one study to another. In addition, most studies report changes in the pharmacokinetic profiles of the probe substrates but few have examined the corresponding changes in the pharmacokinetic profiles of the circulating metabolites. This may lead to misinterpretation of the impact of ABT on *in vivo* metabolism, in

light of the recent report that ABT may also affect intestinal transit time (Stringer et al., 2014). Finally, none of these studies have undertaken a systematic approach to measure the impact of ABT pretreatment on the role of gut and liver metabolism.

The aim of the present study is to define the best pretreatment conditions for the use of ABT in rats to avoid any disturbance in the gastro-intestinal tract while maintaining its P450 inactivation. Metoprolol was selected as the P450 probe for these studies. Metoprolol is completely absorbed but exhibits very poor bioavailability (F of 4%) due to high first pass metabolism (Borg et al., 1975b) in the intestine and liver (Yoon et al., 2011). The metabolic pathways of metoprolol are represented in **Figure 1**. Pharmacokinetic studies with metoprolol were conducted in rats treated with ABT under well-controlled and defined dosing conditions (50 mg/kg, 1 h ABT i.v. pretreatment and 16 h p.o. pretreatment). To obtain the complete absorption and metabolic profile of metoprolol, the plasma levels of three major circulating metabolites of metoprolol ( $\alpha$ -hydroxy-metoprolol (OHM), o-desmethyl-metoprolol (ODM) and metoprolol acid (MA) (Borg et al., 1975a)) were also measured. In addition, to put into perspective the impact of ABT on metoprolol intestinal and hepatic metabolism, *in vitro* metabolic studies using intestinal and hepatic microsomes prepared from ABT pretreated rats were conducted. Finally the impact of ABT on the gastric emptying and the intestinal transit time was assessed using the charcoal method. Based on our results, we provide recommendations for the future use of ABT in pharmacokinetics studies.

## **Materials and methods**

### **Drugs and chemicals.**

Metoprolol tartrate salt, labetalol hydrochloride, activated charcoal and reduced  $\beta$ -NADPH sodium salt were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, United-States).

Metoprolol acid (MA),  $\alpha$ -hydroxy-metoprolol (OHM) and o-desmethylnmetoprolol (ODM) were obtained from Toronto Research Chemicals (Toronto, On, Canada). All other reagent were of ACS grade or higher.

### **Animals.**

Male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g were obtained from Charles River (St-Constant, Quebec, Canada) and were housed in a temperature-controlled room with a 12 h light-dark cycle. All rats were fasted 15-16 h prior to experiments and water was available *ad libitum*. Oral administrations were performed by delivering a bolus of the drug in solution directly into the stomach using a syringe with a flexible gavage needle. All i.v. administrations were made by injecting a bolus of the drug solution via a tail vein. For pharmacokinetic studies, standard rat chow was provided 2 h post administration of the drug. All the experiments were approved by an ethical committee and were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for the care and use of laboratory animals.

### **Pharmacokinetics studies.**

To assess the impact of ABT on the pharmacokinetics of metoprolol, metoprolol was formulated in water and dosed p.o. at 10 mg/kg in control rats and rats pretreated 1 h with ABT i.v. (50mg/kg in saline, 1mL/kg) or 16 h with ABT p.o. (50mg/kg in saline, 5mL/kg) n=5 per group, see **Table 2** for specific conditions. Blood was collected from the jugular vein at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 9, 8 and 24 hrs post dosing. Samples were immediately transferred into tubes containing EDTA K3 and plasma was obtained following a centrifugation at 1620 g for 10 min at 4°C. The plasma samples were stored at -30°C until analysis.

### **Preparation of hepatic and intestinal microsomes.**

To determine the effect of ABT on hepatic and intestinal enzymes, untreated as well as ABT i.v. and p.o. pretreated rats (see **Table 2** for details) were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation (n=3 per group). The livers were immediately collected, cut into pieces of 1-5 mm<sup>2</sup> and frozen in liquid nitrogen. The small intestine was removed and the first 2/3 starting from the pyloric valve was placed in ice-cold PBS.

Liver tissues were homogenised and hepatic microsomes were prepared by differential centrifugation using standard methods (Cinti et al., 1972). The preparation of intestinal microsomes was performed using a previously reported protocol (Leblond et al., 2002). Briefly, enterocytes were isolated from the first 2/3 of the small intestine by elution with an EDTA containing solution. Then, the cells were lysed and microsomes were prepared using two differential centrifugations at 12000 g and 100000 g. The pellets containing the microsomes were resuspended in 0.1 M Tris (pH 7.4), 20 % glycerol and 0.15 M NaCl and the microsomes obtained from each dose group were pooled. Protein concentration of hepatic and intestinal preparations was measured using bicinchoninic acid (BCA) as previously described (Smith et al., 1985).

### **Measurement of the intrinsic clearance in intestinal and hepatic microsomes.**

Metoprolol was incubated at a final concentration between 0.5 and 200 uM for 30 min in 100 mM phosphate buffer (pH=7,4) containing 1.5 mM NADPH using 1 mg/mL of intestinal microsomes or 0.5 mg/mL of hepatic microsomes obtained from controls and ABT i.v. and p.o. pretreated rats. These conditions were optimized to be under linear turn-over conditions (results not shown). The reaction was terminated by the addition of acetonitrile containing 0.1 ug/mL of the internal standard labetalol.

### **Gastric emptying and intestinal transit time study.**

The charcoal meal technique was used to evaluate the impact of ABT on the gastric emptying and the intestinal transit time. The protocol was designed based on published methods (Mittelstadt et al., 2005; Prior et al., 2012). Untreated rats and ABT i.v. and p.o. pretreated rats (see **Table 2** for details) were used for this experiment (n=4 per group). A control group pretreated 1h before with ABT p.o. was incorporated in the study to distinguish between the time of administration and the route of administration. A volume of 2 mL of charcoal meal (5 % (w/v) of activated charcoal in 2 % (w/v) of caboxymethyl-cellulose) was administered to the animals and 30 minutes later, the rats were anesthetized with isoflurane, sacrificed by cervical dislocation and the stomachs and the small intestines were collected. The full stomach was weighted and its content was removed by washing in phosphate buffer saline and then sponging with a gauze. The resulting empty stomachs were then weighted. The full length of the small intestine, from the pyloric valve to the ileo-caecal junction, and the maximal distance traveled by the charcoal from the pyloric valve to last visible charcoal were measured.

### **Sample preparation and analytical methods.**

To determine the concentration of metoprolol and its major metabolites in plasma and microsomal incubates, samples were extracted by the addition of six volumes of acetonitrile containing the internal standard labetalol (0.1 ug/mL). The samples were vortexed and centrifuged at 2500 g for 11 minutes at 4 °C. The resulting supernatants were diluted 1:1 with water and analyzed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

LC-MS/MS analysis was performed using a Thermo Fisher Scientific system composed of a TSQ Vantage mass spectrometer coupled with Accela U-HPLC system (Thermo Fischer). Chromatographic separation was achieved on an ACE 3 C18-PFP column

(50 x 4.6 mm, from Advanced chromatography Technologies Ltd) using a linear gradient at 0.9 mL/min. Mobile phase A consisted of 0.1 % acetic acid in water and mobile phase B consisted of acetonitrile. A gradient program was initiated starting at 5 % B which was held for 0.3 minutes, then ramped from 5 % to 90 % B in 2.2 minutes. After holding at 90% B for an additional 1.2 minutes, the program changed back to 5% B. The column was equilibrated with 5% B for 1.2 minutes before the next injection. The mass spectrometer was operated in the positive mode with electrospray ionization. The following transition along with their collision energy (CE) were used: 268.2 → 159.2 (CE : 20 V) for metoprolol, 254.1 → 177.1 (CE : 17 V) for ODM, 284.0 → 91.1 (CE : 38 V) for OHM, 268.2 → 145.2 (CE: 21 V) for MA and 329.1 → 311.2 (CE: 12 V) for labetalol.

#### **Data analysis.**

Pharmacokinetic parameters were determined by non-compartmental method using Watson (Thermo Scientific), a purpose-built laboratory information management system designed to support drug metabolism and pharmacokinetic studies. The area under the plasma concentration-time curve (AUC) from time 0 to last time point with a measurable concentration ( $AUC_{0-T}$ ) was calculated by the trapezoidal method. The maximal plasma concentration ( $C_{max}$ ), the half-life ( $T_{1/2}$ ) and the time to reach  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) were obtained from the observed data.

The kinetic constant  $K_m$  (the concentration at half the maximal activity) and  $V_{max}$  (the maximal velocity) were determined for each metabolite by fitting the data with the software Graphpad Prism using the nonlinear regression analysis. The  $CL_{int}$  for each metabolite was calculated by dividing the  $V_{max}$  by the  $K_m$ .

Gastric emptying was evaluated by the weight of the stomach content which is equal to the difference between the weight of the full stomach and the weight of the empty stomach. Intestinal transit time was measured by the % of the small intestine traveled by the charcoal and was calculated as follows: (distance traveled by the charcoal/small intestine length) x 100.

For group comparison, the statistical significance of the difference between mean values was calculated using analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer test used for multiple comparisons. Differences with a P value of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### Effect of ABT on Metoprolol oral pharmacokinetics in rats.

To evaluate the effect of pretreatment of ABT on the oral pharmacokinetics of metoprolol in rats, oral PK studies with metoprolol (10 mg/kg) were performed in control and ABT treated rats. The PK profiles of metoprolol and its major metabolites are represented in **Figure 2** and the main PK parameters are shown in **Table 3**. Pretreatment with ABT p.o. significantly affected the PK of metoprolol as it increased the AUC by 16-fold and the C<sub>max</sub> by 5-fold versus untreated animals. In contrast to these finding, pretreatment with ABT i.v. resulted in a moderate increase in AUC (6.5-fold) and no effect on the C<sub>max</sub> of metoprolol. The inhibition of metoprolol metabolism by ABT is also confirmed by a decrease in the production of metabolites as measured by the ratio of the total AUC of the metabolites divided by the AUC of the parent compared to controls (from 81.2 in controls to 12.2 for ABT i.v. and 5.0 for ABT p.o.).

For the metabolites, both group pretreated with ABT increased the AUC of OHM and only ABT i.v. decreased the AUC of ODM. However, we found a significant reduction in the C<sub>max</sub> of the three metabolites following ABT pretreatment (i.v. and p.o.) compared to control, in line with a decrease in first pass metabolism. The decrease in the C<sub>max</sub> is more important in the group ABT i.v. compared to ABT p.o. for OHM and MA.

Moreover, a significant delay in absorption was observed in the ABT i.v. pretreated group (T<sub>max</sub> of 5.9 h) when compared to controls or ABT p.o. pretreated rats (0.25 and 0.5 h, respectively). This also translated to a delayed T<sub>max</sub> (up to 17-fold) of the three metabolites in the ABT i.v. pretreated group.

#### **Effect of ABT on intestinal and liver metabolic enzymes.**

To further put into perspective the PK data and elucidate the impact of pretreatment of ABT i.v. and ABT p.o. on liver and intestinal metabolism, microsomes were prepared from the liver and the intestine of untreated and ABT treated animals. The metabolic activity was assessed by measuring the CL<sub>int</sub> of metoprolol in the microsomal preparation with the K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> method. Results are shown in **Figure 3**. In summary, ABT given orally or i.v. inhibits significantly and to a similar extent the metabolism in intestinal and hepatic microsomes (5-fold and 3-fold, respectively). It is also worth mentioning that differences in metabolic pathways were observed in hepatic and intestinal microsomal incubations. Indeed, hepatic microsomes converted metoprolol mostly to MA and OHM while the intestinal microsomes produced mostly ODM.

#### **Effect of ABT on gastric emptying and intestinal transit time.**

To elucidate the potential effect of ABT i.v. and ABT p.o. on delaying absorption, gastric emptying and intestinal transit time were measured using the charcoal meal method.

Four groups were studied: untreated, ABT i.v. 1 h before charcoal, ABT p.o. 16 h before charcoal and ABT p.o. 1 h before charcoal. Results are shown in **Table 4**. It is clear that a pretreatment of 1 h with ABT i.v. or p.o. significantly affects gastric emptying in rats as it increases by 7-fold the weight of the stomach content while a pretreatment of 16 h with ABT p.o. has no effect. Furthermore, no effect of ABT on intestinal transit was observed for all groups.

## Discussion

The goal of the present study was to characterize the role of ABT in drug-drug interaction (DDI) studies by looking at its impact on absorption as well as its effect on intestinal and hepatic metabolism. This was achieved by conducting pharmacokinetics studies with metoprolol under two well-defined ABT pretreatments. The three main metabolites of metoprolol were also monitored to corroborate the data obtained with the parent drug.

The oral pretreatment with ABT (16 h pre dosing) resulted in a large increase in the AUC and C<sub>max</sub> of metoprolol while ABT i.v (1 h pre-dosing) caused an increase of the AUC with no impact on C<sub>max</sub> (**Table 3**). In addition, the C<sub>max</sub> of the metabolites decreased compared to control. These results suggest that the inhibition of first pass metabolism is important under both ABT pretreatment conditions (i.v. and p.o.), with a stronger effect observed in the oral pretreatment group. This data could suggest that additional inhibition of intestinal enzymes is occurring when ABT is given orally, as proposed by Strelevitz et al., 2006. However, careful examination of the results may not support this hypothesis. Indeed, the decrease in the C<sub>max</sub> of the metabolites is more important in the ABT i.v. group even though the AUC of metoprolol increased less in this group compared to oral ABT group. Moreover, in the ABT i.v. group, the T<sub>max</sub> of metoprolol and its three metabolites are

considerably delayed compared to control or ABT p.o. pretreated group suggesting a delayed absorption. Since the absorption is only delayed in the group ABT i.v., it is difficult then to conclude that the differences observed in the i.v. and p.o. groups is due exclusively to metabolism.

To clarify whether or not ABT i.v. inhibits intestinal metabolism, intestinal and hepatic microsomes were prepared from control and ABT-pretreated rats. The  $CL_{int}$  of metoprolol measured in these microsomes is decreased similarly in the two pretreatment groups (5-fold and 3-fold in intestinal and hepatic microsomes, respectively) (**Figure 3**). These results clearly indicate that ABT cannot be used to discriminate between intestinal and liver first pass metabolism. In fact, based on the *in vitro* studies, both treatments inhibited more the intestine than the liver. In addition, it is not unusual to observe such an effect when a drug is dosed i.v. since the intestine is highly perfused (Dimich et al., 1991; Nakase et al., 2001)

Some differences were observed between the *in vitro* metabolism of metoprolol in rat intestinal and hepatic microsomes. Intestinal microsomes metabolize metoprolol almost exclusively in ODM while hepatic microsomes produced preferentially MA, followed by OHM and ODM. This difference can be explained by the specificity of cytochrome P450 isoforms as DDI studies with ketoconazole, cimetidine and quinidine performed in rats demonstrated that OHM and MA are produced by CYP2D and ODM by CYP3A (Boralli et al., 2009). As the rat intestine contains higher quantities of CYP3A versus CYP2D (Mitschke et al., 2008), this difference in expression levels will likely favor the formation of ODM in intestinal microsomes. This may explain the importance of the ODM and MA pathway in untreated rats as the intestine possibly produces a high amount of ODM that is later converted in MA by the liver. This can also explain the significant increase in the AUC of OHM following ABT p.o. pretreatment compared to control (**Table 3**). The intestine probably contribute less to the

metabolism of metoprolol in ABT p.o. pretreated rats since it is more inhibited than the liver (**Figure 3**) and can only metabolize the drug during the first pass and not the elimination process. However, as the impact of ABT on the elimination of the metabolites themselves is unknown, a precise interpretation of these results remains unclear.

Since the inhibition of the intestine and the liver metabolism is similar *in vitro* for the ABT p.o. and ABT i.v. groups, we speculated that the delayed absorption observed in the ABT i.v. pretreated group may, in part, explain the difference in the PK of metoprolol between the ABT p.o. and i.v. groups. To better understand the impact of ABT on absorption, we evaluated gastric emptying and intestinal transit time with the charcoal meal technique (**Table 4**). A 1 h pretreatment with ABT (i.v. or p.o.) significantly inhibited the gastric emptying in rats. This effect is only temporary since no effect is in the 16 h pretreatment with ABT. In addition, it is worth noting that the charcoal meal technique can quickly and clearly distinguish between an effect on gastric emptying or intestinal transit. Indeed, in the experiment with ABT, no effect on intestinal transit was observed.

These results are consistent with the study of Stringer et al, 2014 who demonstrates with a fluorescent marker that ABT inhibits the gastric emptying when dosed p.o. or intraperitoneally 2 h before the test meal. They observed no significant difference when ABT was dosed 15 h before the test meal in fasted male wistar rats. Therefore, we can conclude that ABT affects the gastric emptying when dosed 1-2 h before the experiment regardless of the route of administration and that this effect fades in time with no significant effect after 15-16 h.

The change in the absorption is of high importance considering that if the drug is liberated slowly from the stomach, the absorption will be delayed, the C<sub>max</sub> lowered and the T<sub>max</sub> delayed. Since less drug enters the circulation, the first pass extraction may also be

increased. This is exactly what we observed in the present study: less metoprolol reaches the systemic circulation in the early time points in the i.v. ABT group likely due to the altered gastric emptying (**Figure 2**). This gives the false impression that the intestinal first pass metabolism is selectively inhibited in the ABT p.o. group. However, this is not the case as demonstrated by the *in vitro* studies where both p.o. and i.v. pretreatments gave similar reduced intestinal metabolic activity when compared to controls (**Figure 3**). Moreover, fewer metabolites also enter in the ABT i.v. group compared to ABT p.o. during the early time points which supports the conclusion that the absorption is altered (**Figure 2**). Thus, it is not possible to make conclusions about metabolism when using ABT if the rate of absorption is affected.

In conclusion, this study demonstrates that ABT cannot be used to distinguish between intestinal and hepatic first pass metabolism. Also, we have clearly shown that ABT can affect gastric emptying when rats are dosed 1-2 h prior to a pharmacokinetic study. For future studies, we recommend ABT to be dosed 15-16 h before the experiment (50 mg/kg p.o.). These conditions are sufficient for the inhibition of intestinal and hepatic metabolic enzymes and do not affect the absorption phase. Therefore, ABT can still be a useful tool to determine if the cause of low oral bioavailability is due to phase I first-pass metabolism or poor absorption if it is correctly used.

## **Acknowledgments**

Special thanks to the *in vivo* team from Vertex Pharmaceuticals for their participation in the experiments.

## **Authorship Contributions**

Participated in research design: Boily, Chauret, Pichette, Laterreur, Leblond, Lévesque, Ste-Marie

Conducted experiments: Boily, Boudreau, Duquet

Performed data analysis: Boily

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Boily, Chauret, Pichette, Laterreur

## References

- Anby MU, Nguyen TH, Yeap YY, Feeney OM, Williams HD, Benameur H, Pouton CW, and Porter CJ (2014) An in Vitro Digestion Test That Reflects Rat Intestinal Conditions To Probe the Importance of Formulation Digestion vs First Pass Metabolism in Danazol Bioavailability from Lipid Based Formulations. *Mol Pharm* **11**:4069-4083.
- Balani SK, Zhu T, Yang TJ, Liu Z, He B, and Lee FW (2002) Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **30**:1059-1062.
- Boralli VB, Coelho EB, and Lanchote VL (2009) Influence of quinidine, cimetidine, and ketoconazole on the enantioselective pharmacokinetics and metabolism of metoprolol in rats. *Chirality* **21**:886-893.
- Borg KO, Carlsson E, Hoffmann KJ, Jonsson TE, Thorin H, and Wallin B (1975a) Metabolism of metoprolol-(3-h) in man, the dog and the rat. *Acta pharmacologica et toxicologica* **36**:125-135.
- Borg KO, Fellenius E, Johansson R, and Wallborg M (1975b) Pharmacokinetic studies of metoprolol-(3-h) in the rat and the dog. *Acta pharmacologica et toxicologica* **36**:104-115.
- Caldwell GW, Ritchie DM, Masucci JA, Hageman W, Cotto C, Hall J, Hasting B, and Jones W (2005) The use of the suicide CYP450 inhibitor ABT for distinguishing absorption and metabolism processes in in-vivo pharmacokinetic screens. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* **30**:75-83.
- Cinti DL, Moldeus P, and Schenkman JB (1972) Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca<sup>2+</sup>-sedimented microsomes from rat liver. *Biochem Pharmacol* **21**:3249-3256.

- Dimich I, Katende R, Singh PP, Mikula S, and Sonnenklar N (1991) The effects of intravenous cimetidine and metoclopramide on gastric pH and volume in outpatients. *Journal of clinical anesthesia* **3**:40-44.
- El-Kattan AF, Poe J, Buchholz L, Thomas HV, Brodfuehrer J, and Clark A (2008) The use of 1-aminobenzotriazole in differentiating the role of CYP-mediated first pass metabolism and absorption in limiting drug oral bioavailability: a case study. *Drug metabolism letters* **2**:120-124.
- Leblond FA, Petrucci M, Dube P, Bernier G, Bonnardeaux A, and Pichette V (2002) Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**:1579-1585.
- Leong BK, Sabaitis CP, Rop DA, Jeffrey P, Parker TJ, Burton NK, Petry TW, Jolly RA, and Cooper MM (1997) Alterations in the cardiopulmonary effects and pharmacokinetics of a bisphosphonate drug by a cytochrome P-450 inhibitor in conscious rats. *Journal of applied toxicology : JAT* **17**:279-288.
- Matsuda Y, Konno Y, Hashimoto T, Nagai M, Taguchi T, Satsukawa M, and Yamashita S (2014) Quantitative Assessment of Intestinal First-pass Metabolism of Oral Drugs Using Portal-vein Cannulated Rats. *Pharm Res.*
- Meschter CL, Mico BA, Mortillo M, Feldman D, Garland WA, Riley JA, and Kaufman LS (1994) A 13-week toxicologic and pathologic evaluation of prolonged cytochromes P450 inhibition by 1-aminobenzotriazole in male rats. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* **22**:369-381.
- Mico BA, Federowicz DA, Ripple MG, and Kerns W (1988) In vivo inhibition of oxidative drug metabolism by, and acute toxicity of, 1-aminobenzotriazole (ABT). A tool for biochemical toxicology. *Biochem Pharmacol* **37**:2515-2519.

- Mitschke D, Reichel A, Fricker G, and Moenning U (2008) Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **36**:1039-1045.
- Mittelstadt SW, Hemenway CL, and Spruell RD (2005) Effects of fasting on evaluation of gastrointestinal transit with charcoal meal. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **52**:154-158.
- Muzeeb S, Pasha MK, Basha SJ, Mullangi R, and Srinivas NR (2005) Effect of 1-aminobenzotriazole on the in vitro metabolism and single-dose pharmacokinetics of chlorzoxazone, a selective CYP2E1 substrate in Wistar rats. *Xenobiotica* **35**:825-838.
- Nakase H, Okazaki K, Kawanami C, Uchida K, Ohana M, Uose S, Nishi T, Itoh T, Okano A, Nishio A, Takakuwa H, and Chiba T (2001) Therapeutic effects on intestinal Behcet's disease of an intravenous drug delivery system using dexamethasone incorporated in lipid emulsion. *Journal of gastroenterology and hepatology* **16**:1306-1308.
- Prior H, Ewart L, Bright J, and Valentin JP (2012) Refinement of the charcoal meal study by reduction of the fasting period. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **40**:99-107.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**:76-85.
- Strelevitz TJ, Foti RS, and Fisher MB (2006) In vivo use of the P450 inactivator 1-aminobenzotriazole in the rat: varied dosing route to elucidate gut and liver contributions to first-pass and systemic clearance. *J Pharm Sci* **95**:1334-1341.
- Stringer RA, Weber E, Tigani B, Lavan P, Medhurst S, and Sohal B (2014) 1-Aminobenzotriazole Modulates Oral Drug Pharmacokinetics through Cytochrome P450 Inhibition and Delay of Gastric Emptying in Rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **42**:1117-1124.

- Subramanian R, Aidasani D, Bailey K, Branstetter D, Everds N, Jiang J, Norman MH, Primack R, Skiles GL, Soto I, Stec MM, Wagner M, Wu T, Zhu X, and Lebrec H (2014) P450-Mediated O-Demethylated Metabolite Is Responsible for Rat Hepatobiliary Toxicity of Pyridyltriazine-Containing PI3K Inhibitors. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **142**:298-310.
- Sun Q, Harper TW, Dierks EA, Zhang L, Chang S, Rodrigues AD, and Marathe P (2011) 1-Aminobenzotriazole, a known cytochrome P450 inhibitor, is a substrate and inhibitor of N-acetyltransferase. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**:1674-1679.
- Town C, Henderson L, Chang D, Mortillo M, and Garland W (1993) Distribution of 1-aminobenzotriazole in male rats after administration of an oral dose. *Xenobiotica* **23**:383-390.
- Yoon IS, Choi MK, Kim JS, Shim CK, Chung SJ, and Kim DD (2011) Pharmacokinetics and first-pass elimination of metoprolol in rats: contribution of intestinal first-pass extraction to low bioavailability of metoprolol. *Xenobiotica* **41**:243-251.

## Footnotes

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and the Hôpital Maisonneuve-Rosemont foundation through the event La nephrologie et son impact.

## Tables

**Table 1.** Dosing regimen of ABT across different studies

Dose (mg/kg)	Route of administration	Time of pretreatment with ABT(hrs)	References
100	p.o.	2	(Muzeeb et al., 2005; Sun et al., 2011)
50	p.o.	2	(El-Kattan et al., 2008; Subramanian et al., 2014)
100	p.o.	15-16	(Strelevitz et al., 2006; Anby et al., 2014; Matsuda et al., 2014)
50	i.p.	16	(Caldwell et al., 2005)
50	i.v.	1	(Leong et al., 1997; Strelevitz et al., 2006)..

**Table 2.** ABT pretreatment conditions prior to metoprolol dosing

<b>Treatment</b>	<b>Dose (mg/kg)</b>	<b>Dose volume (mL/kg)</b>	<b>Formulation</b>	<b>Time of pretreatment (hrs)</b>
<b>ABT i.v.</b>	50	1	Saline	1
<b>ABT p.o.</b>	50	5	Saline	16

**Table 3.** Effect of ABT on the PK parameters of metoprolol and its metabolites in rats

PK parameter after p.o. administration of 10 mg/kg of metoprolol in control or ABT treated rats. Data are mean and standard deviation of five rats.

Parameters	Control	ABT i.v. <sup>a</sup>	ABT p.o. <sup>b</sup>
<b>Metoprolol</b>			
AUC <sub>0-T</sub> (ug*h/mL)	0.166 ± 0.215	1.08 ± 0.37*	2.69 ± 0.77***###
Tmax (h)	0.250	5.90 ± 4.98*	0.500#
Cmax (ug/mL)	0.255 ± 0.296	0.233 ± 0.028	1.29 ± 0.37***###
T <sub>1/2</sub> (h)	0.524 ± 0.141	3.98 ± 3.92	0.936 ± 0.199
<b>ODM</b>			
AUC <sub>0-T</sub> (ug*h/mL)	0.279 ± 0.114	0.0439 ± 0.0289***	0.183 ± 0.034#
Tmax (h)	0.350 ± 0.137	6.10 ± 4.75*	1.30 ± 0.67#
Cmax (ug/mL)	0.138 ± 0.075	0.0224 ± 0.0058**	0.0561 ± 0.0153*
T <sub>1/2</sub> (h)	1.39 ± 0.366	N.D.	2.00 ± 0.589
<b>OHM</b>			
AUC <sub>0-T</sub> (ug*h/mL)	1.05 ± 0.21	1.92 ± 0.32*	2.05 ± 0.77*
Tmax (h)	0.350 ± 0.137	6.10 ± 4.75*	0.500#
Cmax (ug/mL)	0.718 ± 0.229	0.169 ± 0.048*	1.29 ± 0.37***###
T <sub>1/2</sub> (h)	1.57 ± 0.943	27.6 ± 44.4	2.22 ± 0.366
<b>MA</b>			
AUC <sub>0-T</sub> (ug*h/mL)	12.2 ± 1.1	11.3 ± 1.3	11.3 ± 0.7
Tmax (h)	1.00	6.40 ± 4.34*	1.80 ± 0.45#
Cmax (ug/mL)	4.86 ± 1.00	1.02 ± 0.18***	3.16 ± 0.44***###
T <sub>1/2</sub> (h)	2.78 ± 0.513	14.5 ± 24.4	2.60 ± 1.39

<sup>a</sup> Rats were treated i.v. with 50 mg/kg of ABT 1 h before the administration of metoprolol

<sup>b</sup> Rats were treated p.o. with 50 mg/kg of ABT 16 h before the administration of metoprolol

Statistically significant differences: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  ABT i.v. and ABT p.o. versus control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  ABT i.v. versus ABT p.o.

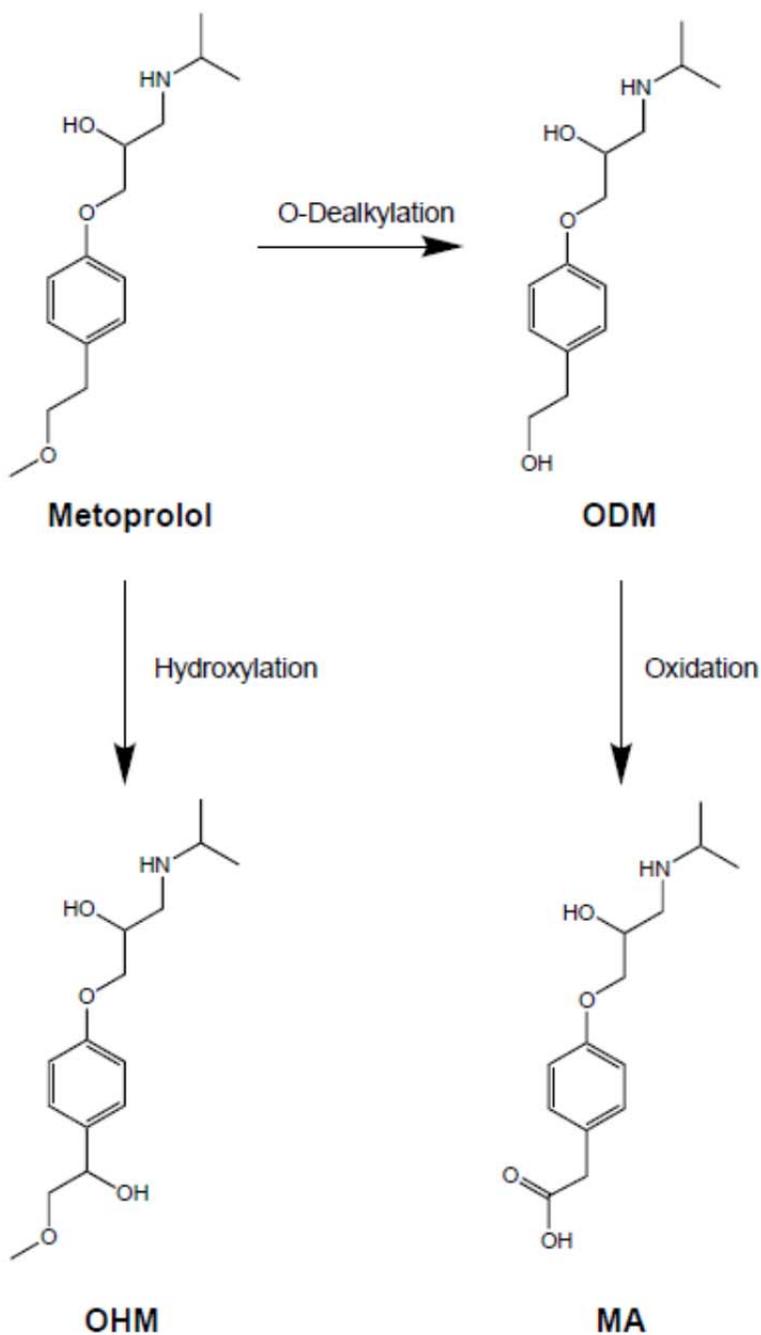
**Table 4.** Effect of ABT on stomach content and intestinal transit in rats dosed with a charcoal meal

The stomach content (g) and the intestinal transit (% of the small intestine travelled by the charcoal) were measured 30 minutes after the administration of 2 mL of activated charcoal in control or 50 mg/kg ABT treated rats. Data are mean and standard deviation of four rats.

	<b>Stomach content (g)</b>	<b>Intestinal transit (%)</b>
<b>Control group</b>	0.464 ± 0.063	67.7 ± 2.3
<b>ABT i.v. 1 h before charcoal</b>	3.21*** ± 0.49	73.5 ± 11.0
<b>ABT p.o. 16 h before charcoal</b>	0.658 ± 0.510	69.1 ± 3.6
<b>ABT p.o. 1 h before charcoal</b>	3.33*** ± 0.86	68.8 ± 3.5

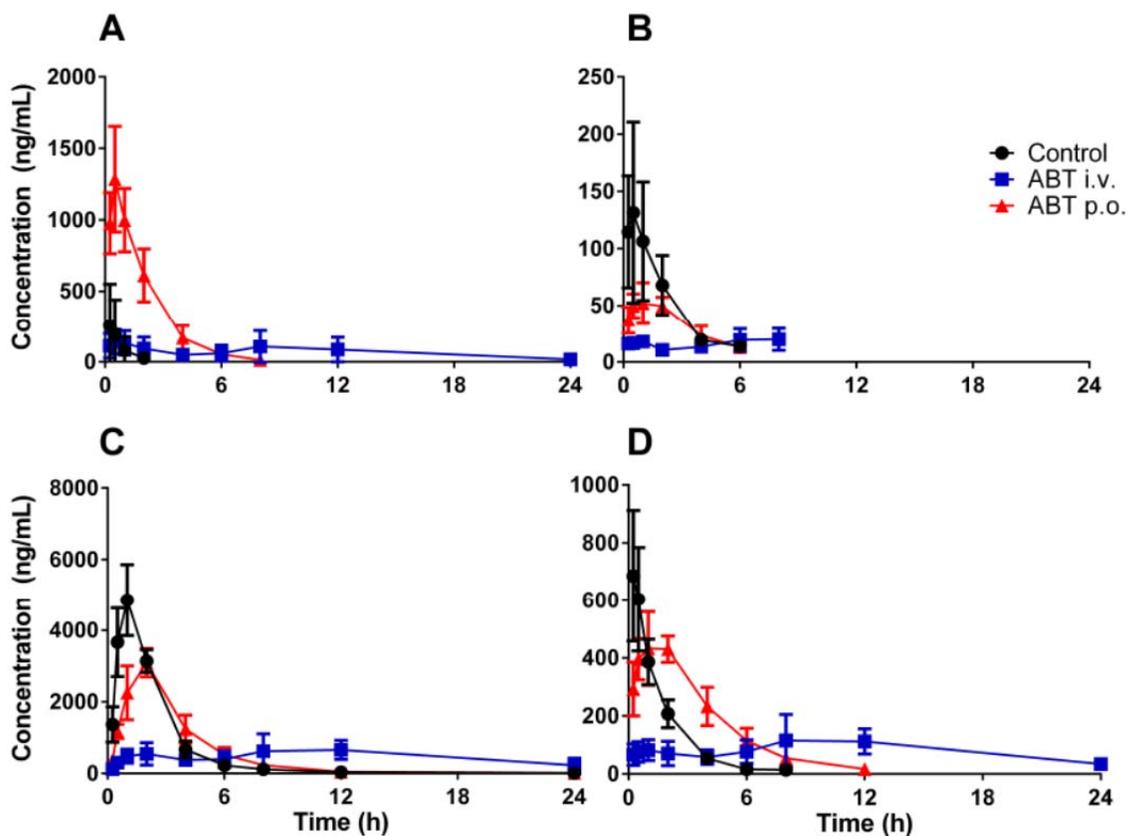
*Statistically significant differences: \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 versus control*

**Figure 1**



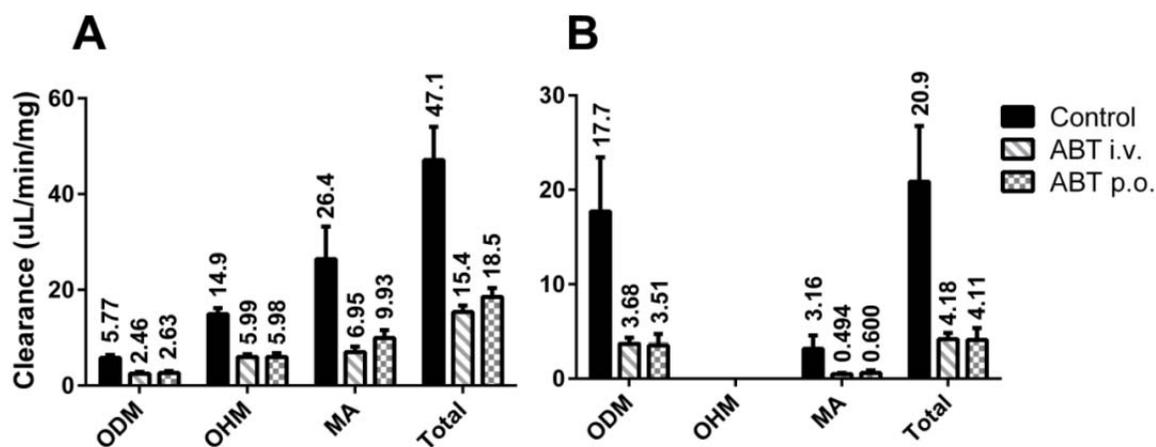
**Fig. 1.** Metabolic pathway of metoprolol in rats. ODM is o-desmethyl-metoprolol, OHM α-hydroxy-metoprolol and MA metoprolol-acid (Borg et al., 1975a; Boralli et al., 2009).

**Figure 2**



**Fig. 2.** Plasmatic concentration of metoprolol (A), o-desmethyl-metoprolol (B), metoprolol-acid (C) and  $\alpha$ -hydroxy-metoprolol (D) following the administration of 10mg/kg of metoprolol in untreated rats and in 50mg/kg ABT i.v. 1 h or ABT p.o. 16 h pretreated rats. Data are mean and standard deviations of five rats.

**Figure 3**



**Fig. 3.** Intrinsic clearance of metoprolol in hepatic (A) and intestinal (B) microsomes of untreated rats or ABT i.v. 1h and ABT p.o. 16 h pretreated rats. ODM is o-desmethyl-metoprolol, OHM  $\alpha$ -hydroxy-metoprolol and MA metoprolol-acid.

## Chapitre 5 : Discussion

### 5.1 – Rappel des objectifs de recherche

Pour atteindre la circulation systémique, les médicaments administrés par la voie orale doivent être absorbés dans l'intestin et éviter d'être métabolisés lors de leur passage dans l'intestin et le foie (10). Étant donné que l'expression intestinale des enzymes du métabolisme représente seulement 1 % de l'expression hépatique (4), le métabolisme intestinal a longtemps été considéré comme ayant un impact mineur sur l'effet de premier passage. Par contre, plusieurs études ont démontré qu'il peut jouer un rôle significatif et parfois même plus important que le foie pour plusieurs substrats (5-9). Cependant, le métabolisme intestinal reste très mal connu particulièrement parce que les outils *in vitro* et *in vivo* pour l'étudier sont inexistantes ou mal caractérisés (2). L'objectif de ces travaux est donc d'évaluer l'impact du métabolisme intestinal sur l'effet de premier passage des médicaments en comparaison avec le métabolisme hépatique. Pour ce faire, différents outils *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés, caractérisés et développés afin de permettre d'améliorer les outils et les connaissances sur le métabolisme intestinal des médicaments.

Ainsi, différents substrats ont été incubés dans des microsomes intestinaux et hépatiques pour cerner les différences quantitatives dans la vitesse de métabolisme et les différences qualitatives dans la production de métabolites entre les deux organes. Par la suite, étant donné que le substrat métoprolol a démontré des différences dans la production de métabolites entre l'intestin et le foie, des études pharmacocinétiques ont été effectuées chez le rat pour exposer l'importance du métabolisme intestinal sur l'effet de premier passage et la production de métabolites circulants. Ainsi, l'utilisation d'animaux canulés dans la veine porte et jugulaire ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes du métabolisme a été évaluée pour mieux caractériser l'impact du métabolisme intestinal et hépatique séparément.

## 5.2 – Différences quantitatives et qualitatives entre le métabolisme intestinal et hépatique dans les microsomes

Afin de mieux comprendre le métabolisme intestinal, huit substrats de différentes enzymes du métabolisme ont été incubés dans des microsomes intestinaux et hépatiques de rats. La capacité des microsomes à métaboliser ces médicaments a été évaluée en mesurant la clairance intrinsèque de chaque substrat. Les résultats présentés dans le **Tableau 5** montrent premièrement que le métabolisme intestinal est beaucoup plus important pour les substrats du CYP3A, 2J et pour les UGT, alors que les substrats du CYP1A, 2B et 2D ne sont pratiquement pas métabolisés par l'intestin. Ces résultats sont en lien avec ceux de la littérature puisque l'intestin du rat exprime en grande quantité le CYP3A, mais en plus faible quantité les autres isoformes comme le CYP1A, et 2D (54, 56-60, 72). Par contre, une publication a démontré que le CYP2B est très présent dans l'intestin du rat (72). Pourtant, le substrat du CYP2B utilisé dans cette étude, le bupropion (130), a été que très faiblement métabolisé dans les microsomes intestinaux. Il est donc possible que le métabolisme de ce substrat ne soit pas représentatif de l'expression de l'enzyme. Enfin, il n'est pas surprenant d'observer beaucoup de métabolisme dans les microsomes intestinaux pour le raloxifène puisque les UGT sont bien connues pour jouer un rôle important dans le métabolisme intestinal chez le rat (54, 61).

Un second aspect de ces résultats est la différence entre la vitesse de métabolisme dans les microsomes intestinaux et hépatiques. En effet, pour les 8 substrats testés, il n'existe aucun lien entre les deux organes : le ratio entre la clairance intrinsèque hépatique et intestinale varie de 3.3 à 203 selon les substrats. Ainsi, le foie n'est pas du tout représentatif du métabolisme intestinal. Pourtant, certains articles proposent d'estimer le métabolisme intestinal à partir des données de métabolisme obtenues dans les microsomes hépatiques (13, 42). Ces articles se basent principalement sur des données obtenues avec des substrats du CYP3A uniquement et favorisent ainsi l'idée que le métabolisme intestinal n'est qu'une version plus lente du métabolisme hépatique. Par contre, les résultats présentés ici montrent que pour des substrats d'enzymes distinctes, la vitesse de métabolisme est différente entre les deux organes. Cette différence est même observée pour les substrats métabolisés spécifiquement par le CYP3A.

Dans un deuxième temps, afin de mieux comprendre la formation des métabolites entre les deux organes, le midazolam et le métoprolol ont été incubés dans des microsomes et la formation de leurs principaux métabolites a été étudiée. Les résultats présentés à la **Figure 8** illustrent bien les différences qualitatives dans la formation de métabolites entre l'intestin et le foie. En effet, le midazolam forme principalement le 1-OH-midazolam dans l'intestin, mais forme en égale quantité le 1 et le 4-OH-midazolam dans le foie. Le métoprolol quant à lui forme principalement le ODM dans l'intestin, et en plus grande quantité le MA et le OHM dans le foie. Ces résultats démontrent bien que les métabolites produits dans le foie ne seront pas nécessairement prédictifs de ceux produits dans l'intestin. Ceci augmente l'importance d'étudier le métabolisme intestinal indépendamment du métabolisme hépatique.

Les différences quantitative et qualitative entre le métabolisme intestinal et hépatique peuvent s'expliquer par les différences entre les proportions d'enzymes dans les deux organes. En effet, l'intestin exprime majoritairement le CYP3A et très peu des autres enzymes alors que le foie a une plus grande diversité enzymatique (31, 72). Ainsi, un substrat du CYP3A sera plus susceptible d'être métabolisé dans l'intestin qu'un substrat du CYP2D par exemple. La situation se complexifie pour les composés métabolisés par plusieurs enzymes. Par exemple, le métoprolol est métabolisé par le CYP2D et par le CYP3A chez le rat (65). Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que son métabolisme intestinal soit médié principalement par le CYP3A et que son métabolisme hépatique par le CYP2D et 3A. C'est probablement pour cette raison que les microsomes intestinaux produisent principalement le ODM alors que ceux hépatiques produisent le MA et le OHM, d'autant plus que le ODM serait produit par le CYP3A et le MA et le OHM par le CYP2D (65). Pour le midazolam, la différence entre les métabolites produits dans l'intestin et dans le foie est plus difficile à expliquer. En effet, le midazolam est connu pour être un substrat sélectif du CYP3A chez le rat (66). Les métabolites produits dans l'intestin et le foie devraient donc être similaires. Pourtant, on observe une formation majoritaire de 1-OH-midazolam dans l'intestin alors que le foie produit en quantité similaire le 1 et le 4-OH-midazolam. Le métabolisme du midazolam doit donc se faire différemment dans les deux organes. Il est possible que les différents isoformes du CYP3A exprimés dans l'intestin, le CYP3A1, 3A9, 3A18 et 3A62 (54, 56-60), puissent produire

sélectivement le 1-OH-midazolam comparativement au CYP3A2 qui est l'isoforme principale du CYP3A dans le foie du rat (131).

Chez l'humain, on peut aussi s'attendre à de telles différences entre le métabolisme hépatique et intestinal puisque l'expression des enzymes est aussi différente entre les deux organes (31). Cependant, ce n'est pas nécessairement le cas pour le midazolam et le métoprolol puisqu'il existe beaucoup de différence interspèces entre les spécificités des enzymes (53-55).

Quoi qu'il en soit, ces résultats démontrent l'importance d'étudier le métabolisme intestinal d'un composé indépendamment de son métabolisme hépatique. En effet, puisque les outils *in vitro* pour étudier le métabolisme intestinal sont très peu utilisés en phase de développement du médicament, il pourrait être possible de manquer la formation d'un métabolite produit uniquement dans l'intestin. Ainsi, lors des études cliniques, on pourrait découvrir la formation d'un nouveau métabolite qui n'avait pas nécessairement été détecté dans les microsomes hépatiques ou les espèces animales. Étant donné que les agences réglementaires exigent que les métabolites identifiés dans le plasma chez l'humain circulent au moins dans des niveaux similaires dans les études de toxicologies animales (132), cette situation pourrait retarder la mise en marché d'un médicament. De plus, la présence de métabolisme intestinal peut aussi diminuer les concentrations systémiques attendues du médicament ou même changer le risque d'interactions médicamenteuses.

### **5.3 – Utilisation et caractérisation de modèles *in vivo* chez le rat pour comprendre les différences entre le métabolisme intestinal et hépatique en utilisant le substrat métoprolol**

Pour mieux comprendre l'impact des différences observées entre le métabolisme intestinal et hépatique sur la pharmacocinétique des médicaments *in vivo*, plusieurs expériences pharmacocinétiques ont été effectuées chez le rat en utilisant le métoprolol. Ainsi, différents modèles permettant de comprendre la contribution de l'intestin et du foie au métabolisme du métoprolol ont été utilisés et développés. Plus particulièrement, l'impact de

l'intestin sur les métabolites circulants du métoprolol a été évalué pour mettre en perspective les résultats obtenus *in vitro*.

### **5.3.1 – Pharmacocinétique et métabolisme de métoprolol chez le rat**

Le métoprolol est éliminé très rapidement chez le rat ce qui mène à une clairance plasmatique très élevée (124 mL/min/kg) ainsi qu'un temps de demi-vie très court (0.42 h) suite à une administration i.v. Son volume de distribution de 4.07 L/kg est très élevé ce qui suggère une distribution du métoprolol dans les tissus. Bien que le métoprolol soit absorbé très rapidement avec un Tmax de 0.25 h suite à une administration orale, sa biodisponibilité est seulement de 11.4 %. De plus, on retrouve de plus grandes concentrations de métabolites que de molécule mère dans la circulation systémique. Étant donné que 90 % de la dose orale du métoprolol est excrété dans les urines principalement sous forme de métabolites, on peut conclure que la plus grande majorité du métoprolol administré est absorbé dans l'intestin et subit par la suite un très fort premier passage intestinal et hépatique. Ces résultats sont en lien avec les données historiques de la littérature puisque le métoprolol est connu pour être complètement absorbé, mais avoir une très faible % F due à un fort premier passage intestinal et hépatique (65, 70, 71, 133).

Suite à une administration orale le principal métabolite en circulation et excrété dans les urines est le métoprolol acide (MA). On retrouve aussi de plus faibles quantités de OHM et de ODM. Ceci est en lien avec les données dans les microsomes qui montraient une formation majoritaire du ODM dans l'intestin suivi d'une plus grande formation de MA et de OHM dans le foie. Ainsi, une partie du métoprolol administré est probablement transformé en ODM dans l'intestin. Lors de son passage au foie, une autre partie du métoprolol restant doit être converti en MA et en OHM, et le ODM produit dans l'intestin est probablement retransformé en MA, résultant en des niveaux circulants de MA très importants.

### **5.3.2 – Étude du métabolisme de metoprolol dans des rats canulés dans la veine jugulaire et la veine porte**

Pour mieux comprendre la contribution respective de l'intestin et du foie au métabolisme de premier passage, des rats canulés dans la veine porte et la veine jugulaire ont

été utilisés. Ce modèle permet d'administrer un médicament oralement et de prendre des prélèvements sanguins dans la veine porte et la veine jugulaire. Puisque la biodisponibilité d'un médicament peut être décrite comme étant la fraction d'un médicament passant d'un compartiment à un second compartiment, il est possible de mesurer la fraction de la dose qui atteint la veine porte et qui est donc absorbée et non métabolisée par l'intestin ( $F_a \cdot F_g$ ). Il permet aussi de calculer la fraction du médicament qui passera de la veine porte à la circulation systémique et qui sera ainsi non métabolisée par le foie ( $F_h$ ). Pour cette raison, plusieurs articles ont décrit l'utilisation d'animaux canulés pour comprendre le métabolisme intestinal pour les médicaments complètement absorbés ( $F_a=1$ ) (96, 98-100) ou mieux comprendre la fraction absorbée pour les médicaments n'ayant pas de métabolisme intestinal ( $F_g=1$ ) (97). Cependant, un des principaux défauts de ce modèle est que la formule permettant de calculer le  $F_a \cdot F_g$  nécessite de connaître le débit sanguin dans la veine porte chez le rat. Puisque cette valeur varie d'un article à un autre, la valeur de  $49.8 \pm 12.9$  mL/min a été utilisée dans cette étude. Cette valeur a été déterminée en faisant la moyenne de 6 différents articles (96, 101-105). Cependant, il faut garder en tête que la valeur du  $F_a \cdot F_g$  peut varier grandement selon le débit sanguin utilisé.

Tel que discuté précédemment, le métoprolol est complètement absorbé chez le rat ( $F_a=1$ ), mais subit un fort premier passage intestinal et hépatique menant à une biodisponibilité de 11.4 %. Ainsi, le modèle de rats canulés était le modèle idéal pour mesurer exactement le  $F_g$  et le  $F_h$  du métoprolol suite à une administration orale. Tout d'abord, si on observe les concentrations plasmatiques dans la veine porte et la veine jugulaire du métoprolol et ses métabolites (**Figure 10**), on voit que seules les concentrations du métoprolol et du ODM varient entre les deux veines. Ce résultat démontre que seul le métoprolol et le ODM sont absorbés à partir de l'intestin, ce qui est en lien avec les données dans les microsomes où seul le ODM était produit par l'intestin. De plus, ces données nous permettent de calculer un  $F_g$  de  $0.577 \pm 0.292$  et un  $F_h$  de  $0.313 \pm 0.112$ , ce qui veut dire que 42.3 % de la dose administrée est métabolisée par l'intestin en ODM et que 39.6 % de la dose est métabolisée par le foie ne laissant que 18.1 % en circulation. Ceci est très près de la biodisponibilité de 11.4 % calculé dans les rats normaux. Ces résultats suggèrent donc que l'intestin contribue en plus grande partie au métabolisme de la dose totale comparativement au foie. Même si le  $F_g$  est plus petit

que le  $F_h$ , étant donné que le métabolisme intestinal survient en premier il contribue en plus grande partie au métabolisme de métoprolol et donc à la formation de métabolites. Ainsi, environ 40 % de la dose est transformée en ODM dans l'intestin qui est vraisemblablement reconverti en MA au foie. Ceci explique probablement pourquoi le MA est le métabolite majoritaire excrété dans l'urine et que le OHM y est moins présent même s'il est pourtant produit en grande quantité dans les microsomes hépatiques. Ces résultats démontrent encore une fois qu'il est très important d'étudier le métabolisme intestinal lors du développement d'un médicament puisque dans le cas du métoprolol, c'est davantage le métabolisme intestinal qui est responsable de la production des métabolites retrouvés en circulation.

Par contre, certains bémols par rapport aux résultats de cette étude sont à mentionner. Tout d'abord, la SSC du métoprolol dans la veine jugulaire est 4 fois plus élevée que celle obtenue dans des rats non canulés. Ainsi, la % F calculé à partir d'une administration i.v. est de 48 %. Étrangement, la % F calculé dans cette expérience à partir du  $F_a \cdot F_g$  et du  $F_h$  est de 18.1 % ce qui est plus proche de la valeur de 11.4 % obtenue dans les rats normaux. Il est donc possible que la chirurgie ou la présence de canules chez le rat affecte d'une certaine façon l'élimination du métoprolol en changeant le métabolisme ou alors le débit sanguin dans la veine porte. Pourtant, il a été montré dans la littérature que la canulation n'affectait pas les paramètres physiologiques des animaux y compris l'activité des enzymes métaboliques (96). Par contre, il est possible que ce ne soit pas le cas pour les rats utilisés dans cette étude. Dans ce cas, si le métabolisme était inhibé, une plus grande quantité de médicaments atteindrait la circulation systémique. À l'inverse, si le débit sanguin dans la veine porte était affecté, alors l'élimination du métoprolol serait directement diminuée puisque la clairance hépatique du métoprolol est dépendante de la quantité qui se rend au foie et donc du débit sanguin hépatique. Dans ce cas, l'élimination serait beaucoup plus affectée que le métabolisme de premier passage qui ne dépend pas du débit sanguin. Étant donné que la % F calculé à partir du  $F_g$  et du  $F_h$  est très près de la valeur dans les rats normaux alors que celle calculée à partir de la SSC est plus élevée, il est plus probable que ce soit l'élimination du composé qui soit affectée par la canulation et non l'effet de premier passage. En effet, si l'élimination du composé est affecté, la SSC sera augmenté même si la %F réelle demeurera inchangé.

Ces études ont tout de même permis de mieux comprendre la fraction du métoprolol métabolisé par l'intestin et le foie. Elles ont aussi permis de démontrer que l'intestin est un acteur clef menant à la faible % F et à la production de métabolites circulants chez le rat.

### **5.3.3 – Utilisation des interactions médicamenteuses pour distinguer entre le métabolisme intestinal et hépatique du métoprolol**

Pour aller plus loin dans la compréhension du rôle du métabolisme intestinal et hépatique dans le métabolisme de premier passage et la production des métabolites circulants, le jus de pamplemousse (GFJ) et le 1-aminobenzotriazole (ABT) ont été utilisés pour produire des interactions médicamenteuses avec le métoprolol. Le GFJ est un inhibiteur connu et sélectif du métabolisme intestinal. Il permet donc de voir l'impact de l'inhibition du métabolisme intestinal sur la %F et les métabolites circulant du métoprolol. Pour ABT, certains articles suggèrent qu'une administration i.v. permettrait une inhibition sélective des enzymes hépatiques. Ces deux modèles ont donc été utilisés pour approfondir notre compréhension de la contribution des deux organes au métabolisme de premier passage.

#### **5.3.3.1 – Utilisation du jus de pamplemousse**

Le GFJ est bien connu pour son inhibition sélective du CYP3A4 intestinal qui mène à des interactions médicamenteuses avec plusieurs médicaments. Ces interactions sont aussi observées chez le rat pour plusieurs substrats de la famille CYP3A (118-120). Pour mieux comprendre l'impact de l'intestin sur la production de métabolites circulants et le premier passage du métoprolol, un modèle utilisant le GFJ a été développés chez le rat. Puisque les protocoles employés dans la littérature varient entre les articles (118-120), 2 mL par rat de jus de pamplemousse ont été administrés 16 h et 30 minutes avant le métoprolol afin d'obtenir une inhibition maximale du métabolisme intestinal. Afin de confirmer que le métabolisme du métoprolol était inhibé dans ces conditions, des microsomes intestinaux et hépatiques ont été préparés à partir de rats traités avec du jus de pamplemousses et la clairance intrinsèque a été déterminé en mesurant le  $K_m$  et le  $V_{max}$ . Les résultats illustrés à la **Figure 11** démontrent clairement une inhibition sélective du métabolisme intestinal par le GFJ. Étant donné que le

GFJ est connu pour inhiber sélectivement la famille du CYP3A, ces résultats suggèrent encore une fois que le ODM est produit par cette famille d'enzyme dans l'intestin.

Afin de voir l'effet de l'inhibition du métabolisme intestinal sur la PK du métoprolol, le métoprolol a été administré oralement à des rats prétraités avec du jus de pamplemousse. Étonnamment, aucun changement majeur de la SSC de métoprolol et de ses métabolites n'a été observé. Par contre, les concentrations plasmatiques du ODM et du MA sont légèrement diminuées pendant la première heure dans le groupe traité avec le GFJ (**Figure 12**).

Il est surprenant que l'inhibition du métabolisme intestinal avec le GFJ n'ait eu qu'un impact très mineur sur les concentrations plasmatiques du parent et des métabolites puisque les résultats obtenus chez les animaux canulés montrent que 40 % de la dose est métabolisée par l'intestin. Il est possible que le métabolisme hépatique compense pour la perte de métabolisme intestinal chez les rats traités avec le GFJ. Ainsi, il est possible que bien que l'intestin ne métabolise plus le métoprolol dans les rats traités par le GFJ, le foie compense pour le métoprolol supplémentaire ce qui rend les concentrations systémiques du métoprolol et ses métabolites inchangés. De plus, comme le métabolisme intestinal ne survient que la phase d'absorption, son impact est plus important lors de la phase d'absorption dans la première heure. Il serait intéressant d'observer l'impact d'administrer du GFJ à des animaux canulés pour voir l'impact sur le  $F_g$  et  $F_h$ . Cette étude permettrait de mieux comprendre l'effet du GFJ sur métoprolol.

Dans la littérature, les substrats connus pour être significativement affectés par le GFJ chez le rat sont principalement des substrats du pgp. En effet, la cyclosporine (118) et le lopinavir (119) sont significativement affectés par le GFJ alors qu'une augmentation non significative est observée pour le midazolam (120). Ces résultats suggèrent donc que les substrats des transporteurs d'efflux sont davantage affectés par une inhibition du métabolisme intestinal puisqu'ils entrent et sortent à plusieurs reprises dans les entérocytes ce qui augmente leur exposition aux enzymes intestinales. Les autres substrats par contre ne pourront être victime du métabolisme intestinal qu'une seule fois lors de leur absorption et ainsi seront potentiellement moins affectés par une inhibition du métabolisme intestinal.

### 5.3.3.2 – Utilisation de 1-Aminobenzotriazole

Étant donné que l'inhibition du métabolisme intestinal n'a qu'un effet mineur sur la pharmacocinétique du métoprolol, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif du métabolisme hépatique a été envisagée pour mieux comprendre la contribution de l'intestin au premier passage du métoprolol. ABT, un inhibiteur non sélectif et irréversible des CYP (106), a été choisi pour ces études puisqu'un article suggérait que varier sa voie d'administration pouvait permettre d'avoir une inhibition sélective du métabolisme hépatique. En fait, les auteurs avaient démontré que la biodisponibilité du midazolam n'était pas affectée par un prétraitement d'une heure avec ABT donné i.v. alors qu'un prétraitement de 16 h avec ABT donné oralement augmentait significativement la biodisponibilité du midazolam. Puisque le midazolam est connu pour avoir un fort premier passage intestinal chez le rat, les auteurs en ont conclu que l'effet mineur du groupe ABT i.v. sur midazolam était causé par son absence d'inhibition intestinal (111).

L'article présenté au chapitre 4 montre les travaux qui ont été effectués pour mieux comprendre l'utilisation d'ABT dans des études de DDI chez le rat. Des résultats similaires à ceux rapportés pour le midazolam ont été obtenus lorsque le métoprolol a été administré à des rats prétraités avec ABT. Tout d'abord, un prétraitement avec ABT p.o. 16 h avant l'administration du métoprolol a résulté en une forte augmentation de la SSC et du  $C_{max}$  de métoprolol alors qu'un traitement avec ABT i.v. (1 h avant) a résulté en une augmentation plus modeste de la SSC et aucun changement du  $C_{max}$ . Ainsi, en prenant en compte uniquement ces données, on pourrait porter une conclusion similaire à celle obtenue par l'étude antérieure avec le midazolam soit que le groupe ABT p.o. exerce une inhibition supplémentaire du métabolisme intestinal menant à une augmentation plus marquée des concentrations plasmatiques. Cependant, si on porte attention aux données des métabolites, on se rend compte que les concentrations plasmatiques des trois métabolites du métoprolol sont fortement diminuées dans le groupe ABT i.v., même si ce groupe a eu un effet moins important sur la SSC de métoprolol qu'ABT p.o. De plus, le  $T_{max}$  du métoprolol et ses métabolites est retardé dans le groupe ABT i.v., ce qui suggère un changement dans l'absorption du métoprolol. Ainsi, si l'absorption du métoprolol est affectée par un traitement avec ABT i.v., il devient difficile de porter des conclusions sur son effet sur le métabolisme.

Étant donné que toutes les études suggérant une inhibition sélective du métabolisme hépatique par ABT i.v. s'étaient uniquement basées sur des données pharmacocinétiques, des microsomes hépatiques et intestinaux ont été préparés à partir de rats prétraités avec ABT pour réfuter ou confirmer cette hypothèse. Nos résultats ont démontrés que peu importe la voie d'administration d'ABT, ce dernier inhibe le métabolisme dans l'intestin et le foie de 5 fois et 3 fois respectivement. Ainsi l'hypothèse selon laquelle ABT i.v. pouvait inhiber sélectivement le foie était erronée.

Puisque l'inhibition des enzymes du métabolisme est similaire entre les deux traitements, nous avons supposé que les différences dans la pharmacocinétique du métoprolol et du midazolam pouvaient être expliquées par un changement dans l'absorption. De plus, un article récent dans la littérature démontrait qu'ABT pouvait affecter la vidange gastrique (112). Ainsi, la vidange gastrique et le temps de transit intestinal ont été évalués dans des rats témoins et prétraités avec ABT i.v. administré 1 h avant ou ABT p.o. administré 1 h et 16 h avant. Nos résultats ont démontrés qu'ABT inhibe fortement la vidange gastrique lorsqu'il est administré 1 h avant l'expérience alors qu'il n'a aucun effet significatif lorsqu'administré 16 h avant.

Ainsi, la différence entre les deux groupes ABT i.v. et p.o. peut être expliqué par l'inhibition de la vidange gastrique dans le groupe i.v. ce qui affecte l'absorption du métoprolol résultant en des concentrations plasmatiques moins élevées que le groupe ABT p.o. Cette démonstration est d'une haute importance puisque plusieurs articles utilisent ABT pour comprendre l'effet du métabolisme sur la biodisponibilité des médicaments ou même sur la toxicité de ses métabolites (100, 109-111, 134-138). D'autant plus que plusieurs de ces articles administrent ABT 1-2 h avant de faire l'expérience (110, 111, 134-136, 138) ce qui affecte l'absorption et peut biaiser leurs conclusions. Ainsi, les résultats de ces travaux permettront de mieux planifier les études futures avec ABT pour étudier l'impact du métabolisme sur la biodisponibilité ou la toxicité des médicaments.

Malheureusement, nos travaux ont démontré qu'ABT ne peut être utilisé pour induire une inhibition sélective du métabolisme hépatique, ce qui ne nous permet pas d'avoir un modèle animal ayant uniquement du métabolisme intestinal pour mieux comprendre le métabolisme de premier passage du métoprolol. Cependant, certaines observations peuvent

être faites sur le profil métabolique du métoprolol dans les rats traités avec ABT. En effet, dans le groupe ABT p.o., les résultats *in vitro* ont montré une inhibition plus marquée des enzymes intestinales (5 fois) comparativement aux enzymes hépatiques (3 fois). Aussi, étant donné que le métabolisme intestinal ne peut survenir que dans la phase d'absorption alors que le métabolisme hépatique participe aussi à la phase d'élimination, un traitement avec ABT p.o. aura probablement un effet plus important sur le métabolisme intestinal que sur le métabolisme hépatique. Cette hypothèse explique peut-être pourquoi le OHM est le seul métabolite ayant un SSC et un Cmax affecté par un prétraitement avec ABT p.o. En effet, puisque ce métabolite est uniquement formé dans le foie, si le métabolisme du métoprolol est redirigé vers le foie, ses concentrations risquent d'augmentées. Par contre, étant donné qu'aucune différence n'avait été observée dans les rats traités avec le GFJ, il faut faire attention avec cette hypothèse d'autant plus que l'inhibition d'ABT peut être différente d'une isoenzyme à une autre.

Finalement, bien que les travaux avec ABT ne permettent pas de mieux comprendre l'impact du métabolisme intestinal sur la pharmacocinétique du métoprolol, ils ont permis de mettre à jour l'impact d'ABT sur la vidange gastrique et ainsi d'émettre des recommandations pour que les études futures avec ABT soient faites adéquatement pour éviter de porter des conclusions erronées par rapport au métabolisme quand l'absorption est aussi affectée.

## Chapitre 6 : Conclusion

En conclusion, ces travaux ont permis de d'améliorer les connaissances des différents outils *in vitro* et *in vivo*. Ils ont aussi aidés à démontrer l'importance d'étudier le métabolisme intestinal et les différences entre le rôle de l'intestin et le foie sur l'effet de premier passage. Dans un premier temps, l'étude de différents substrats dans les microsomes intestinaux et hépatiques a permis de montrer que la vitesse de métabolisme dans l'intestin n'est pas en lien avec celle du foie. Ainsi, il est important de caractériser séparément les deux organes puisque ce n'est pas parce qu'un médicament est faiblement métabolisé dans le foie qu'il le sera dans l'intestin. Dans un deuxième temps, ces résultats ont permis de mettre l'emphase sur les différences dans la production des métabolites entre l'intestin et le foie chez le rat pour deux substrats, le métoprolol et le midazolam.

Afin de mettre en perspective l'impact de ces différences *in vivo*, le profil métabolique du métoprolol a été analysé dans différents modèles pharmacocinétiques chez le rat. Ainsi, l'utilisation de rats canulés a permis de déterminer que l'intestin et le foie contribuaient tous les deux au métabolisme d'environ 40 % de la dose menant à une faible biodisponibilité. Ce modèle a aussi permis de confirmer que le ODM était le seul métabolite produit par l'intestin *in vivo* comme *in vitro*. Par contre, aucune différence dans les concentrations plasmatiques du métoprolol et ses métabolites n'a été observée suite à l'administration de jus de pamplemousse, ce qui suggère que le métabolisme hépatique compense pour la perte de métabolisme intestinal pour ce composé. Par contre, il est probable que les conclusions auraient été différentes pour un autre médicament, particulièrement s'il est substrats des transporteurs d'efflux.

Finalement, l'utilisation d'ABT comme outil pour étudier le métabolisme intestinal et hépatique a été évaluée et a fait l'objet d'une publication. Ce qui a été démontré est que, peu importe la voie d'administration d'ABT, le métabolisme intestinal et hépatique sont tous les deux inhibés par ABT. Cependant, l'administration d'ABT 1 h avant une étude PK affecte l'absorption en retardant la vidange gastrique. Il faut donc pour les études futures qu'ABT soit administré 16 h avant pour conserver l'inhibition du métabolisme intestinal et hépatique tout en évitant son effet sur l'absorption.

Ces études ont permis d'améliorer les connaissances du métabolisme intestinal en démontrant qu'il peut avoir un rôle majeur sur le premier passage des médicaments et la production de métabolites circulants. De plus, ces études ont aussi permis d'améliorer nos connaissances des différents outils pour mieux comprendre séparément le rôle de l'intestin et du foie dans l'effet de premier passage.

Cependant, plusieurs études restent à venir. Il serait important d'améliorer les connaissances des outils *in vitro* pour étudier le métabolisme intestinal. Le développement, par exemple, d'un modèle cellulaire permettant l'étude du métabolisme intestinal serait un grand avancement puisqu'il serait plus proche de la situation physiologique que les fractions cellulaires et permettrait aussi l'étude de l'induction intestinale des enzymes métaboliques. De plus, il serait important d'améliorer les connaissances par rapport à la prédiction du métabolisme intestinal à partir des données *in vitro* pour rendre l'étude du métabolisme intestinal plus facile.

## **Bibliographie**

1. Hamman JH, Demana PH, Olivier EI. Targeting receptors, transporters and site of absorption to improve oral drug delivery. *Drug target insights*. 2007;2:71-81. Epub 2007/01/01.
2. Karlsson FH, Bouchene S, Hilgendorf C, Dolgos H, Peters SA. Utility of in vitro systems and preclinical data for the prediction of human intestinal first-pass metabolism during drug discovery and preclinical development. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(12):2033-46. Epub 2013/08/07.
3. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(3):1552-62. Epub 1998/02/12.
4. Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Marsh CL, McVicar JP, et al. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1996;60(1):14-24. Epub 1996/07/01.
5. Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, et al. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1996;59(5):491-502. Epub 1996/05/01.
6. Floren LC, Bekersky I, Benet LZ, Mekki Q, Dressler D, Lee JW, et al. Tacrolimus oral bioavailability doubles with coadministration of ketoconazole. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1997;62(1):41-9. Epub 1997/07/01.
7. Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, et al. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(10):2545-53. Epub 1997/05/15.
8. Dalvie D, Kang P, Zientek M, Xiang C, Zhou S, Obach RS. Effect of intestinal glucuronidation in limiting hepatic exposure and bioactivation of raloxifene in humans and rats. *Chemical research in toxicology*. 2008;21(12):2260-71. Epub 2009/06/24.

9. Ansel. HC, Allen. LV, Popovich Ng. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 7e éd: Lippincott Williams and Wilkins; 1999.
10. Kerns. EH, Di L. *Drug-like Properties : Concepts, Structure Design and Methods. From ADME to Toxicity Optimization*: Elsevier; 2008.
11. Clarysse S, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Augustijns P. Intestinal drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: comparison with solubility in human intestinal fluids. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2011;43(4):260-9. Epub 2011/05/17.
12. Ku MS. Use of the Biopharmaceutical Classification System in early drug development. *Aaps j*. 2008;10(1):208-12. Epub 2008/05/01.
13. Yang J, Jamei M, Yeo KR, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Prediction of Intestinal First-Pass Drug Metabolism. *Current Drug Metabolism*. 2007;8:676-84.
14. van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(3):192-204. Epub 2003/03/04.
15. Gibson GG, Skett P. *Introduction to Drug Metabolism*. 3e éd: Nelson Thornes Publishers; 2001.
16. Neal M. *Pharmacologie médicale*. Traduction de la 3e éd: De Boeck Université; 1999.
17. Thelen K, Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2009;61:541-58.
18. Anandatheerthavarada HK, Addya S, Dwivedi RS, Biswas G, Mullick J, Avadhani NG. Localization of multiple forms of inducible cytochromes P450 in rat liver mitochondria: immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 1997;339(1):136-50. Epub 1997/03/01.
19. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Rang and Dale's Pharmacology*. 6e éd: Elsevier; 2007.
20. Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Molecular interventions*. 2003;3(4):194-204. Epub 2004/03/03.

21. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *The pharmacogenomics journal*. 2003;3(3):136-58. Epub 2003/06/20.
22. Li T, Chiang JY. Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4alpha and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(5):756-64. Epub 2006/02/04.
23. Chen J, Raymond K. Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2006;5:3. Epub 2006/02/17.
24. Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(9):819-50. Epub 2003/07/29.
25. Marieb EN, Hoehn K. *Anatomie et physiologie humaines*. 4e éd: Pearson Education, Inc.; 2010.
26. Tannergren C, Bergendal A, Lennernas H, Abrahamsson B. Toward an increased understanding of the barriers to colonic drug absorption in humans: implications for early controlled release candidate assessment. *Mol Pharm*. 2009;6(1):60-73. Epub 2009/02/03.
27. Schuijers J, Clevers H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *The EMBO journal*. 2012;31(12):2685-96. Epub 2012/05/24.
28. Lahar N. Intestinal Subepithelial Myofibroblasts Support in vitro and in vivo Growth of Human Small Intestinal Epithelium. *PLOS ONE*. 2011;6(11):1-9.
29. Lin JH, Chiba M, Baillie TA. Is the Role of the Small Intestine in First-Pass Metabolism Overemphasized? *Pharmalogical Reviews*. 1999;51(2):135-57.
30. Heikkinen AT, Baneyx G, Caruso A, Parrott N. Application of PBPK modeling to predict human intestinal metabolism of CYP3A substrates - an evaluation and case study using GastroPlus. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2012;47(2):375-86. Epub 2012/07/05.

31. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The Human Intestinal Cytochrome P450 "Pie". *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(5):880-6.
32. Watkins PB, Wnughton SA, Schuetz EG, Molowa DT, Guzelian PS. Identification of Glucocorticoid-inducible Cytochromes P-450 in the Intestinal Mucosa of Rats and Man. *J Clin Invest*. 1987;80:1029-36.
33. Zhang Q, Dunbar D, Ostrowska A, Zejsloft S, Yang J, Kaminsky L. Characterization of Human Small Intestinal Cytochrome P450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1999;27(7):804-9.
34. Holtbecker N, Fromm MF, Kroemer HK, Ohnhaus EE, Heidemann H. The nifedipine-rifampin interaction. Evidence for induction of gut wall metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1996;24(10):1121-3. Epub 1996/10/01.
35. Fromm MF, Busse D, Kroemer HK, Eichelbaum M. Differential induction of prehepatic and hepatic metabolism of verapamil by rifampin. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1996;24(4):796-801. Epub 1996/10/01.
36. McKinnon RA, Burgess WM, Hall PM, Roberts-Thomson SJ, Gonzalez FJ, McManus ME. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut*. 1995;36(2):259-67. Epub 1995/02/01.
37. Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, et al. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics*. 1994;4(5):247-59. Epub 1994/10/01.
38. Peters WH, Kremers PG. Cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of man. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(9):1535-8. Epub 1989/05/01.
39. Murray GI, Barnes TS, Sewell HF, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *British journal of clinical pharmacology*. 1988;25(4):465-75. Epub 1988/04/01.

40. 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):1643-53. Epub 1994/04/29.
41. Eeckhoudt SL, Horsmans Y, Verbeeck RK. Differential induction of midazolam metabolism in the small intestine and liver by oral and intravenous dexamethasone pretreatment in rat. *Xenobiotica.* 2002;32(11):975-84. Epub 2002/12/19.
42. Gertz M, Harrison A, Houston JB, Galetin A. Prediction of Human Intestinal First-Pass Metabolism of 25 CYP3A Substrates from In Vitro Clearance and Permeability Data. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2010;38(7):1147-58.
43. Kaminsky LS, Zhang Q-Z. The Small Intestine as a Xenobiotic-Metabolizing Organ. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2003;31(12):1520-5.
44. Ohno S, Nakajin S. Determination of mRNA expression of human UDP-glucuronosyltransferases and application for localization in various human tissues by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2009;37(1):32-40. Epub 2008/10/08.
45. Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH. Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol.* 1997;52(2):212-20. Epub 1997/08/01.
46. Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273(15):8719-26. Epub 1998/05/16.
47. Mojarrabi B, Mackenzie PI. Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247(3):704-9. Epub 1998/07/02.
48. Deguchi T, Watanabe N, Kurihara A, Igeta K, Ikenaga H, Fusegawa K, et al. Human pharmacokinetic prediction of UDP-glucuronosyltransferase substrates with an animal scale-

up approach. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(5):820-9. Epub 2011/02/02.

49. Cubitt HE, Houston JB, Galetin A. Relative importance of intestinal and hepatic glucuronidation-impact on the prediction of drug clearance. *Pharm Res*. 2009;26(5):1073-83. Epub 2009/02/03.

50. Yuan H, Li N, Lai Y. Evaluation of in vitro models for screening alkaline phosphatase-mediated bioconversion of phosphate ester prodrugs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2009;37(7):1443-7. Epub 2009/04/18.

51. Burstein AH, Cox DS, Mistry B, Eddington ND. Phenytoin pharmacokinetics following oral administration of phenytoin suspension and fosphenytoin solution to rats. *Epilepsy research*. 1999;34(2-3):129-33. Epub 1999/04/21.

52. Holenarsipur VK, Gaud N, Sinha J, Sivaprasad S, Bhutani P, Subramanian M, et al. Absorption and cleavage of enalapril, a carboxyl ester prodrug, in the rat intestine: in vitro, in situ intestinal perfusion and portal vein cannulation models. *Biopharm Drug Dispos*. 2015. Epub 2015/04/03.

53. Bueters T, Juric S, Sohlenius-Sternbeck A-K, Hu Y, Bylund J. Rat poorly predicts the combined non-absorbed and presystemically metabolized fractions in the human. *Xenobiotica*. 2013;43(7):607-16.

54. Komura H, Iwaki M. In vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A and UGT substrates in preclinical animals species and humans: species difference. *Drug Metabolism Reviews*. 2011;43(4):476-98.

55. Shiratani H, Katoh M, Nakajima M, Yokoi T. Species Differences in UDP-Glucuronosyltransferase Activities in Mice and Rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(9):1745-52.

56. Mureith D, Darwish WS, Ikenaka Y, Kanja L, Ishizuka M. Cytochrome P450 3A mRNA expression along goat and rat gastrointestinal tracts. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 2012;60(4):205-10.

57. Mitschke D, Reichel A, Fricker G, Moenning U. Characterization of Cytochrome P450 Protein Expression along the Entire Length of the Intestine of Male and Female Rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(6):1039-45.
58. Kawase A, Fujii A, Negoro M, Akai R, Ishikubo M, Komura H, et al. Differences in Cytochrome P450 and Nuclear Receptor mRNA Levels in Liver and Small Intestines between SD and DA Rats. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23(3):196-206.
59. Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Isolation and Characterization of a New Major Intestinal CYP3A Form, CYP3A62, in the Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;309(3):1282-90.
60. Zhang Q-Y, Wikoff J, Dunbar D, Kaminsky L. Characterization of Rat Small Intestinal Cytochrome P450 Expression and Inducibility. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 1996;24(3):322-8.
61. Shelby MK, Cherrington NJ, Vansell NR, Klaassen CD. Tissue mRNA expression of the rat UDP-glucuronosyltransferase gene family. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2003;31(3):326-33. Epub 2003/02/14.
62. Hu YZ, Yao TW. Induction of diphenyltriazol on cytochrome CYP1A. *Acta pharmacologica Sinica*. 2004;25(4):528-33. Epub 2004/04/07.
63. Dumrongsak Pektong CD, Hélène Martin and Lysiane Richert. Bupropion hydroxylation as a selective marker of rat CYP2B1 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* 2012. 2012;40(1):32-8.
64. Hiroi T, Chow T, Imaoka S, Funae Y. Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(9):970-6. Epub 2002/08/09.
65. Boralli VB, Coelho EB, Lanchote VL. Influence of quinidine, cimetidine, and ketoconazole on the enantioselective pharmacokinetics and metabolism of metoprolol in rats. *Chirality*. 2009;21(10):886-93. Epub 2009/01/24.
66. CHOVAN JP. Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats. *Xenobiotica*. 2007;37(5):459-73.

67. Sridhar V, Surya Sandeep M, Ravindra Babu P, Naveen Babu K. Evaluation of first-pass cytochrome P4503A (CYP3A) and P-glycoprotein activities using felodipine and hesperetin in combination in Wistar rats and everted rat gut sacs in vitro. *Phytotherapy research* : PTR. 2014;28(5):699-705. Epub 2013/07/25.
68. Matsumoto S, HIRAMA T, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y. Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(11):1240-5. Epub 2002/10/19.
69. FURUKAWA T. Quantitative Prediction of Intestinal Glucuronidation of Drugs in Rats Using In Vitro Metabolic Clearance Data. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012;27(2):171-80.
70. Borg KO, Fellenius E, Johansson R, Wallborg M. Pharmacokinetic studies of metoprolol-(3-h) in the rat and the dog. *Acta pharmacologica et toxicologica*. 1975;36(Suppl 5):104-15. Epub 1975/01/01.
71. Yoon IS, Choi MK, Kim JS, Shim CK, Chung SJ, Kim DD. Pharmacokinetics and first-pass elimination of metoprolol in rats: contribution of intestinal first-pass extraction to low bioavailability of metoprolol. *Xenobiotica*. 2011;41(3):243-51. Epub 2010/12/07.
72. Mitschke D, Reichel A, Fricker G, Moenning U. Characterization of cytochrome P450 protein expression along the entire length of the intestine of male and female rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(6):1039-45. Epub 2008/03/12.
73. Damre A, Mallurwar SR, Behera D. Preparation and characterization of rodent intestinal microsomes: comparative assessment of two methods. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2009;71(1):75-7. Epub 2010/02/24.
74. Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky LS. Characterization of mouse small intestinal cytochrome P450 expression. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2003;31(11):1346-51. Epub 2003/10/23.

75. Zhang QY, Fang C, Zhang J, Dunbar D, Kaminsky L, Ding X. An intestinal epithelium-specific cytochrome P450 (P450) reductase-knockout mouse model: direct evidence for a role of intestinal p450s in first-pass clearance of oral nifedipine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2009;37(3):651-7. Epub 2008/12/06.
76. Zhu Y, Ding X, Fang C, Zhang QY. Regulation of intestinal cytochrome P450 expression by hepatic cytochrome P450: possible involvement of fibroblast growth factor 15 and impact on systemic drug exposure. *Mol Pharmacol*. 2014;85(1):139-47. Epub 2013/11/05.
77. Bruyère A, Declèves X, Bouzom F, Proust L, Martinet M, Walther B, et al. Development of an optimized procedure for the preparation of rat intestinal microsomes: comparison of hepatic and intestinal microsomal cytochrome P450 enzyme activities in two rat strains. *Xenobiotica*. 2009;39(1):22-32.
78. Galetin A, Houston JB. Intestinal and hepatic metabolic activity of five cytochrome P450 enzymes: impact on prediction of first-pass metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(3):1220-9. Epub 2006/06/10.
79. Mohri K, Uesawa Y. Enzymatic activities in the microsomes prepared from rat small intestinal epithelial cells by differential procedures. *Pharm Res*. 2001;18(8):1232-6. Epub 2001/10/06.
80. Michaud J, Leblond FA, Naud J, Boisvert C, Desbiens K, Nicoll-Griffith DA, et al. Use of a fluorescent substrate for the selective quantification of rat CYP3A in the liver and the intestine. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 2007;55(2):209-13. Epub 2006/09/19.
81. Emoto C, Yamazaki H, Yamasaki S, Shimada N, Nakajima M, Yokoi T. Characterization of cytochrome P450 enzymes involved in drug oxidations in mouse intestinal microsomes. *xenobiotica*. 2000;30(10):943-53.
82. Lam JL, Benet LZ. Hepatic microsome studies are insufficient to characterize in vivo hepatic metabolic clearance and metabolic drug-drug interactions: studies of digoxin metabolism in primary rat hepatocytes versus microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2004;32(11):1311-6. Epub 2004/10/16.

83. Gomez-Lechon MJ, Castell JV, Donato MT. Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chemico-biological interactions*. 2007;168(1):30-50. Epub 2006/12/01.
84. Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. *Aaps j*. 2009;11(2):262-76. Epub 2009/05/02.
85. Fagerholm U. Prediction of human pharmacokinetics--evaluation of methods for prediction of hepatic metabolic clearance. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2007;59(6):803-28. Epub 2007/07/20.
86. Bonnefille P, Sezgin-Bayindir Z, Belkhelfa H, Arellano C, Gandia P, Woodley J, et al. The use of isolated enterocytes to study Phase I intestinal drug metabolism: validation with rat and pig intestine. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2010;25:104-14.
87. Kilford PJ, Gertz M, Houston JB, Galetin A. Hepatocellular Binding of Drugs: Correction for Unbound Fraction in Hepatocyte Incubations Using Microsomal Binding or Drug Lipophilicity Data. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36:1194-7.
88. Kaeffer B. Mammalian Intestinal Epithelial Cells in Primary culture : A Mini-Review. *In Vitro Cell Dev Biol*. 2002;38:123-34.
89. Castellanos-Gonzalez A, Cabada MM, Nichols J, Gomez G, White AC. Human Primary Intestinal Epithelial Cells as an improved In vitro model for cryptosporidium parvum infection. *Infect Immun*. 2013;81(6):1996 - 2001.
90. Nakamura T, Sakaeda T, Ohmoto N, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction for MDR1, MRP1, MRP2, and CYP3A-mRNA levels in Caco-2 cell lines, human duodenal enterocytes, normal colorectal tissues, and colorectal adenocarcinomas. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(1):4-6. Epub 2001/12/18.
91. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries R, Es J, Brink SVD, et al. Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology*. 2011;141:1762-72.

92. Vijaya Bhaskar V, Middha A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitation of cremophor el and its applications. *International journal of analytical chemistry*. 2013;2013:135613. Epub 2013/08/29.
93. Letendre L, Scott M, Dobson G, Hidalgo I, Aungstl B. Evaluating Barriers to Bioavailability in Vivo: Validation of a Technique for Separately Assessing Gastrointestinal Absorption and Hepatic Extraction. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(8):1457-62.
94. Yoon I-S, Choi M, Kim J, Chim C, Chung S, Kim D. Pharmacokinetics and first-pass elimination of metoprolol in rats: contribution of intestinal first-pass extraction to low bioavailability of metoprolol. *Xenobiotica*. 2011;41(3):243-51.
95. Raof AA, Augustijns P, Verbeeck R. In vivo assesment of intestinal, hepatic, and pulmonary first pass metabolism of propofol in the rat. *Pharmaceutical Research*. 1996;13(6):891-5.
96. Matsuda Y, Konno Y, Satsukawa M, Kobayashi T, Takimoto Y, Morisaki K, et al. Assessment of Intestinal Availability of Various Drugs in Oral Absorption Process Using Portal Vein Cannulated Rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012;40:2231-8.
97. Matsuda Y, Konno Y, Hashimoto T, Nagai M, Taguchi T, Satsukawa M, et al. In vivo assessment of the impact of efflux transporter on oral drug absorption using portal vein-cannulated rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(8):1514-21. Epub 2013/05/21.
98. Kuze J, Mutoh T, Takenaka T, Morisaki K, Nakura H, Hanioka N, et al. Separate evaluation of intestinal and hepatic metabolism of three benzodiazepines in rats with cannulated portal and jugular veins: comparison with the profile in non-cannulated mice. *Xenobiotica*. 2009;39(11):871-80.
99. Kadono K, Koakutsu A, Naritomi Y, Terashita S, Tabata K, Teramura T. Comparison of intestinal metabolism of CYP3A substrates between rats and humans: application of portal-systemic concentration difference method. *Xenobiotica*. 2014;44(6):511-21. Epub 2013/12/18.

100. Matsuda Y, Konno Y, Hashimoto T, Nagai M, Taguchi T, Satsukawa M, et al. Quantitative Assessment of Intestinal First-pass Metabolism of Oral Drugs Using Portal-vein Cannulated Rats. *Pharm Res.* 2014. Epub 2014/08/29.
101. Hoffman DJ, Seifert T, Borre A, Nellans HN. Method to estimate the rate and extent of intestinal absorption in conscious rats using an absorption probe and portal blood sampling. *Pharm Res.* 1995;12(6):889-94. Epub 1995/06/01.
102. Daemen MJ, Thijssen HH, van Essen H, Vervoort-Peters HT, Prinzen FW, Struyker Boudier HA, et al. Liver blood flow measurement in the rat. The electromagnetic versus the microsphere and the clearance methods. *Journal of pharmacological methods.* 1989;21(4):287-97. Epub 1989/07/01.
103. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993;10(7):1093-5. Epub 1993/07/01.
104. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology.* 1984;87(5):1120-6. Epub 1984/11/01.
105. Hadengue A, Lee SS, Koshy A, Girod C, Lebrec D. Regional blood flows by the microsphere method: reproducibility in portal hypertensive rats and influence of a portal vein catheter. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY).* 1988;187(4):461-8. Epub 1988/04/01.
106. Balani SK, Zhu T, Yang TJ, Liu Z, He B, Lee FW. Effective dosing regimen of 1-aminobenzotriazole for inhibition of antipyrine clearance in rats, dogs, and monkeys. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2002;30(10):1059-62. Epub 2002/09/14.
107. Meschter CL, Mico BA, Mortillo M, Feldman D, Garland WA, Riley JA, et al. A 13-week toxicologic and pathologic evaluation of prolonged cytochromes P450 inhibition by 1-aminobenzotriazole in male rats. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology.* 1994;22(3):369-81. Epub 1994/04/01.

108. Town C, Henderson L, Chang D, Mortillo M, Garland W. Distribution of 1-aminobenzotriazole in male rats after administration of an oral dose. *Xenobiotica*. 1993;23(4):383-90. Epub 1993/04/01.
109. Caldwell GW, Ritchie DM, Masucci JA, Hageman W, Cotto C, Hall J, et al. The use of the suicide CYP450 inhibitor ABT for distinguishing absorption and metabolism processes in in-vivo pharmacokinetic screens. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2005;30(1-2):75-83. Epub 2005/07/14.
110. Subramanian R, Aidasani D, Bailey K, Branstetter D, Everds N, Jiang J, et al. P450-Mediated O-Demethylated Metabolite Is Responsible for Rat Hepatobiliary Toxicity of Pyridyltriazine-Containing PI3K Inhibitors. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2014;142(1):298-310. Epub 2014/08/28.
111. Strelevitz TJ, Foti RS, Fisher MB. In vivo use of the P450 inactivator 1-aminobenzotriazole in the rat: varied dosing route to elucidate gut and liver contributions to first-pass and systemic clearance. *J Pharm Sci*. 2006;95(6):1334-41. Epub 2006/04/21.
112. Stringer RA, Weber E, Tigani B, Lavan P, Medhurst S, Sohal B. 1-Aminobenzotriazole Modulates Oral Drug Pharmacokinetics through Cytochrome P450 Inhibition and Delay of Gastric Emptying in Rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2014;42(7):1117-24. Epub 2014/04/15.
113. Kupferschmidt HHT, Ha HR, Ziegler WH, Meier PJ, Krahenbuhl S. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1995;58(1):20-8.
114. Benton RE, Honig PK, Zamani K, Cantilena LR, Woosley RL. Grapefruit juice alters terfenadine pharmacokinetics, resulting in prolongation of repolarization on the electrocardiogram. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1996;59(4):383-8. Epub 1996/04/01.
115. Ho P-C, Saville DJ. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2001;4(3):217-27.

116. Mohri K, Uesawa Y. Effects of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on nifedipine pharmacokinetics in rats. *Pharm Res.* 2001;18(2):177-82.
117. Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in intestinal CYP3A4 inhibition kinetic and binding properties. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2004;32(10):1146-53. Epub 2004/07/23.
118. Mangano NG, Cutuli VMC, Caruso A, Bernardis ED, Amico-Roxas M. Grapefruit juice effects on the bioavailability of cyclosporin-A in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2001;5:1-6.
119. Ravi PR, Vats R, Thakur R, Srivani S, Aditya N. Effect of Grapefruit Juice and Ritonavir on Pharmacokinetics of Lopinavir in Wistar Rats. *Phytotherapy research.* 2012;26:1490-5.
120. Kuze J, Mutoh T, Takenaka T, Oda N, Hanioka N, Narimatsu S. Evaluation of animal models for intestinal first-pass metabolism of drug candidates to be metabolized by CYP3A enzymes via in vivo and in vitro oxidation of midazolam and triazolam. *Xenobiotica.* 2013;43(7):598-606.
121. Paine MF, Oberlies NH. Clinical relevance of the small intestine as an organ of drug elimination: drug–fruit juice interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2007;3(1):67-80.
122. Ito K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effects of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein on oral drug absorption--theoretical approach. *Pharm Res.* 1999;16(2):225-31. Epub 1999/04/01.
123. Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Advanced drug delivery reviews.* 1997;27(2-3):161-70. Epub 2000/06/06.
124. Gertz M, Houston JB, Galetin A. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Intestinal First-Pass Metabolism of CYP3A Substrates with High intestinal Extraction. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2011;39(9):1633-42.
125. Sun D, Jones NR, Manni A, Lazarus P. Characterization of raloxifene glucuronidation: potential role of UGT1A8 genotype on raloxifene metabolism in vivo. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa).* 2013;6(7):719-30. Epub 2013/05/18.

126. Mizuma T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10. *International journal of pharmaceutics*. 2009;378(1-2):140-1. Epub 2009/06/03.
127. Kemp DC, Fan PW, Stevens JC. Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(6):694-700. Epub 2002/05/23.
128. Leblond FA, Petrucci M, Dube P, Bernier G, Bonnardeaux A, Pichette V. Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2002;13(6):1579-85. Epub 2002/06/01.
129. Cinti DL, Moldeus P, Schenkman JB. Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca<sup>2+</sup>-sedimented microsomes from rat liver. *Biochem Pharmacol*. 1972;21(24):3249-56. Epub 1972/12/15.
130. Pekthong D, Desbans C, Martin H, Richert L. Bupropion hydroxylation as a selective marker of rat CYP2B1 catalytic activity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012;40(1):32-8. Epub 2011/10/04.
131. Agrawal AK, Shapiro BH. Constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 isoforms in senescent male and female rats and response to low-dose phenobarbital. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2003;31(5):612-9. Epub 2003/04/16.
132. Gao H, Jacobs A, White RE, Booth BP, Obach RS. Meeting report: metabolites in safety testing (MIST) symposium-safety assessment of human metabolites: what's REALLY necessary to ascertain exposure coverage in safety tests? *Aaps j*. 2013;15(4):970-3. Epub 2013/07/04.
133. Borg KO, Carlsson E, Hoffmann KJ, Jonsson TE, Thorin H, Wallin B. Metabolism of metoprolol-(3-h) in man, the dog and the rat. *Acta pharmacologica et toxicologica*. 1975;36(Suppl 5):125-35. Epub 1975/01/01.

134. Muzeeb S, Pasha MK, Basha SJ, Mullangi R, Srinivas NR. Effect of 1-aminobenzotriazole on the in vitro metabolism and single-dose pharmacokinetics of chlorzoxazone, a selective CYP2E1 substrate in Wistar rats. *Xenobiotica*. 2005;35(8):825-38. Epub 2005/11/10.
135. Sun Q, Harper TW, Dierks EA, Zhang L, Chang S, Rodrigues AD, et al. 1-Aminobenzotriazole, a known cytochrome P450 inhibitor, is a substrate and inhibitor of N-acetyltransferase. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(9):1674-9. Epub 2011/06/17.
136. El-Kattan AF, Poe J, Buchholz L, Thomas HV, Brodfuehrer J, Clark A. The use of 1-aminobenzotriazole in differentiating the role of CYP-mediated first pass metabolism and absorption in limiting drug oral bioavailability: a case study. *Drug metabolism letters*. 2008;2(2):120-4. Epub 2009/04/10.
137. Anby MU, Nguyen TH, Yeap YY, Feeney OM, Williams HD, Benameur H, et al. An in Vitro Digestion Test That Reflects Rat Intestinal Conditions To Probe the Importance of Formulation Digestion vs First Pass Metabolism in Danazol Bioavailability from Lipid Based Formulations. *Mol Pharm*. 2014;11(11):4069-83. Epub 2014/09/30.
138. Leong BK, Sabaitis CP, Rop DA, Jeffrey P, Parker TJ, Burton NK, et al. Alterations in the cardiopulmonary effects and pharmacokinetics of a bisphosphonate drug by a cytochrome P-450 inhibitor in conscious rats. *Journal of applied toxicology : JAT*. 1997;17(5):279-88. Epub 1997/10/27 20:29.