

Université de Montréal

Influence de l'inflammation sur le métabolisme catalysé par les cytochromes P450 chez le rat. Approches *in vitro* et implications sur la pharmacocinétique d'agonistes delta

par

Denis Projean

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences pharmaceutiques

Septembre 2003

© Denis Projean, 2003



QV
105
U58
2004
V.003

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Influence de l'inflammation sur le métabolisme catalysé par les
cytochromes P450 chez le rat. Approches *in vitro* et implications
sur la pharmacocinétique d'agonistes delta**

présentée par :

Denis Projean

a été évaluée par un jury constitué des personnes suivantes :

Président du jury : D^r Patrice Hildgen

Directeur de recherche : D^r Julie Ducharme

Codirecteur de recherche : D^r Jean-Louis Brazier

Membre du jury : D^r Albert Adam

Examineur externe : D^r David J. Edwards

Représentant de la F.E.S. : à déterminer

Thèse acceptée le :

RÉSUMÉ

Le présent programme de recherche s'est attaché à donner une représentation de la multidisciplinarité à laquelle le chercheur en métabolisme et pharmacocinétique est exposé en milieu pharmaceutique. Nous nous sommes principalement attardés aux systèmes *in vitro* et aux cytochromes P450 (CYPs) hépatiques, déterminants majeurs de l'élimination de plusieurs molécules chez l'homme et le rat.

Utilisant une approche classique de phénotypage *in vitro* et bénéficiant de la mise au point et de la validation d'une méthode HPLC-MS simple, rapide et sensible permettant la quantification de la morphine et de ses principaux métabolites dans diverses matrices biologiques, nous avons été en mesure d'illustrer, dans le premier volet de cette thèse, le rôle du CYP3A4 et du CYP2C8 dans la *N*-déméthylation de la morphine chez l'homme.

Le deuxième volet de cette thèse s'est intéressé, d'une part, à la caractérisation d'un modèle de douleur inflammatoire et ses répercussions sur le métabolisme et la pharmacocinétique (DMPK) et d'autre part, à l'évaluation de la pharmacologie *in vitro* et à la pharmacocinétique d'agonistes δ et de leurs principaux métabolites. Une diminution du contenu en CYPs dans les microsomes de foie et une augmentation concomitante des concentrations plasmatiques d' α -1-glycoprotéine (AGP) a été observée chez le rat traité avec une dose unique d'Adjuvant Complet de Freund (ACF). Cette diminution était sélective pour les CYP2B, CYP2C6, CYP2C11 et CYP2E1. Nos travaux ont corroboré le rôle majeur de l'IL-6 dans ce phénomène. Lors de la caractérisation de son profil DMPK chez le rat, nous avons confirmé que le SNC80 est principalement éliminé par métabolisme hépatique dépendant des CYPs et est fortement lié aux protéines plasmatiques (>94%) et à l'AGP. Bien que son absorption soit presque complète après administration orale, le SNC80 possède une biodisponibilité orale (F) très faible (4%). Nos travaux suggèrent que le métabolisme pré-systémique contribue à cet effet de premier passage important. Nous avons

démonstré, en utilisant le SNC80, que les modifications biochimiques observées chez le rat traité avec l'ACF pouvaient entraîner une diminution de sa fraction libre plasmatique et sa clairance intrinsèque dans les microsomes de foie. *In vivo*, ces différences se retrouvent principalement au niveau des processus d'élimination du SNC80 (diminution de la clairance plasmatique (~20%)). En revanche, nos résultats ne montrent aucune modification de la biodisponibilité orale. Nous avons suggéré que cette observation pourrait être le fruit de modifications présytémiques non-hépatiques (ex: augmentation du métabolisme intestinal) du SNC80 chez l'animal traité avec l'ACF qui contrecarreraient les effets observés au niveau du métabolisme hépatique. Les travaux de notre dernière étude ont montré que l'ARM390 possède les propriétés pharmacologiques (agoniste très sélectif *in vitro*) et pharmacocinétiques (F=70%), nécessaires pour devenir un outil de choix pour la caractérisation des processus associés au récepteur δ *in vivo*. De plus, il possède aussi un profil métabolique plus sécuritaire que le SNC80 car son métabolite majeur est inactif.

En résumé, les travaux effectués au cours de cette thèse ont contribué à l'avancement de la recherche dans le domaine de la douleur en soulignant l'importance du DMPK et des systèmes *in vitro* autant au niveau clinique que préclinique.

MOTS CLÉ: Cytochromes P450, Pharmacocinétique, Inflammation, Modèles de douleur inflammatoire, Morphine, Agonistes non peptidiques des récepteurs delta, SNC80, Rat, Métabolisme des médicaments, Foie.

ABSTRACT

This research program was undertaken to give a representation of the multidisciplinary to which drug metabolism and pharmacokinetic (DMPK) scientists are exposed in the pharmaceutical industry. We focused principally on *in vitro* systems and hepatic cytochromes P450 (CYPs); which represent major determinants of the elimination of several molecules in rats and humans. In the first section of this thesis, studies were performed to identify the CYPs involved in morphine-*N*-demethylation in human liver microsomes.

As a first step, a simple, rapid and sensitive HPLC-MS method that allowed the quantification of morphine and its principal metabolites in various biological matrixes was developed and validated. Traditional *in vitro* CYP phenotyping studies were then performed. Our *in vitro* findings confirmed that hepatic CYP3A4, and to a lesser extent CYP2C8, play an important role in morphine-*N*-demethylation in man.

Focusing on analgesics and pain, the goals of the second part of this thesis were to characterize an inflammatory pain model and its effect on DMPK and evaluate the *in vitro* pharmacology and *in vivo* pharmacokinetics of non-peptidic δ -receptor agonists and their main metabolites. In the rat, a single Freund's Complete Adjuvant (FCA) injection in the hind paw lead to the development of an inflammatory response with increased α -1-glycoprotein (AGP) and IL-6 plasma levels in the early days that follow injection. These changes were accompanied by a rapid decrease in total CYP contents and the selective downregulation of CYP2B, CYP2C6, CYP2C11 and CYP2E1 in FCA-treated rat liver microsomes (RLM). Our work corroborated the major role of IL-6 in eliciting these changes. In rats, we demonstrated that SNC80 is mainly eliminated by CYP-mediated hepatic metabolism and is highly bound to plasma proteins (>94%) and AGP. Although its absorption was essentially complete after oral administration, this δ -agonist presented poor oral bioavailability (4%) because of extensive pre-systemic metabolism. We showed that, using SNC80, the

biochemical modifications observed in the FCA-treated rats lead to the decrease of its free fraction in plasma (~30%) and of its intrinsic clearance in the RLM (~40%). These modifications led to a decrease (22%) in the plasma clearance of SNC80 *in vivo*. In contrast, our results did not show any modifications of the oral bioavailability of SNC80 in FCA-treated rats. We suggest that FCA-induced non-hepatic mechanisms may have compensated for the decrease in plasma clearance, preventing an increase in the oral bioavailability. The last part of the thesis showed that ARM390 is a highly selective δ -agonist with moderate potency *in vitro*. Its unique selectivity, good oral bioavailability (70%) and the poor *in vitro* activity of its main metabolite (ARM827) make this δ -agonist one of the most attractive tools currently available. One should exercise caution when using (\pm)-BW373U86 or SNC80 as pharmacological tools *in vivo* as they either lack selectivity or release pharmacologically active metabolite(s) that could contribute to pharmacological activity.

Overall, the work carried out in this thesis highlights the importance of DMPK and *in vitro* systems in many aspects of clinical and pre-clinical pain research.

KEYWORDS: Cytochromes P450, Pharmacokinetics, Inflammation, Inflammatory pain model, Morphine, Non-peptidic delta receptor agonists, SNC80, Rat, Drug metabolism, Liver.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>iii</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xv</i>
<i>Liste des abbréviations</i>	<i>xxi</i>
<i>Dédicace</i>	<i>xxv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xxvi</i>
<i>Avant-propos</i>	<i>xxviii</i>
<i>Annexes</i>	<i>xxix</i>

CHAPITRE I 1

1 LES CYTOCHROMES P450 (CYPS) ET LES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION	2
1.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES ENZYMES DE PHASE I ET DE PHASE II	2
1.2 LES CYTOCHROMES P450.....	3
1.2.1 Présentation générale.....	3
1.2.2 Structure et topologie membranaire	4
1.2.3 Nomenclature	7
1.2.4 Complexe multi-enzymatique	8
1.2.5 Cycle catalytique.....	10
1.2.6 Réactions catalysées par les cytochromes P450.....	12
1.2.7 Principaux CYPs humains et de rats impliqués dans le métabolisme des médicaments et des xénobiotiques	12
1.2.7.1 Famille CYP1	17
1.2.7.1.1 CYP1A.....	17

1.2.7.1.1.1	CYP1A1	17
1.2.7.1.1.2	CYP1A2	18
1.2.7.1.2	CYP1B (ou CYP1B1)	19
1.2.7.2	Famille CYP2	19
1.2.7.2.1	CYP2A	20
1.2.7.2.2	CYP2B	21
1.2.7.2.3	CYP2C	23
1.2.7.2.3.1	CYP2C8	23
1.2.7.2.3.2	CYP2C9	24
1.2.7.2.3.3	CYP2C18	25
1.2.7.2.3.4	CYP2C19	25
1.2.7.2.4	CYP2D	26
1.2.7.2.5	CYP2E	28
1.2.7.3	Famille CYP3	29
1.2.7.3.1	CYP3A	29
1.2.7.3.1.1	CYP3A4 et CYP3A5 humains	30
1.2.7.3.1.2	CYP3A7	31
1.2.7.3.1.3	CYP3A43	31
1.2.7.3.1.4	Les substrats des CYP3As humains	31
1.2.7.3.1.5	Sélectivité des substrats et des inhibiteurs des CYP3As humains	32
1.2.7.3.1.6	Inducteurs des CYP3As humains	32
1.2.7.4	Famille CYP4	33
1.3	FACTEURS MODULANT L'ACTIVITÉ DES CYPS CHEZ L'HOMME ET LE RAT	35
1.3.1	Facteurs génétiques	35
1.3.1.1	Polymorphisme génétique	35
1.3.1.2	Dichotomie sexuelle	35
1.3.2	Facteurs épigénétiques	37
1.3.2.1	Facteurs physiologiques: nutrition, hormones et âge	38

1.3.2.1.1	Facteurs nutritionnels.....	38
1.3.2.1.2	Facteurs liés au vieillissement.....	38
1.3.2.1.3	Facteurs hormonaux.....	38
1.3.2.2	Facteurs environnementaux et pharmaco-toxicologiques.....	39
1.3.2.2.1	Induction.....	39
1.3.2.2.2	Inhibition.....	40
1.3.2.3	Facteurs physiopathologiques.....	42
1.4	IMPACT DE LA MODIFICATION DE L'ACTIVITÉ DES CYPS SUR LA PHARMACOLOGIE DES MÉDICAMENTS CHEZ L'HOMME ET LE RAT.....	43
2	L'INFLAMMATION ET LA DOULEUR INFLAMMATOIRE.....	45
2.1	DÉFINITIONS.....	45
2.2	LA RÉACTION INFLAMMATOIRE LOCALE.....	46
2.2.1	La phase d'initiation (ou vasculo-plasmatique).....	46
2.2.2	La phase d'amplification (ou cellulaire).....	47
2.2.3	la phase de résolution et de réparation.....	47
2.3	LA RÉACTION INFLAMMATOIRE SYSTÉMIQUE.....	48
2.3.1	Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation.....	49
2.4	LES MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES.....	50
2.4.1	Les cytokines.....	51
2.4.1.1	Le TNF- α et l'IL-1 β	52
2.4.1.2	L'IL-6.....	53
2.4.1.3	Voie de signalisation des récepteurs de cytokines.....	54
2.4.2	Le monoxyde d'azote (NO).....	55
2.5	MODÈLES D'INFLAMMATION.....	56
2.5.1	Modèles de réaction inflammatoire locale aiguë et chronique.....	56
2.5.2	Modèles de réaction inflammatoire systémique.....	57

2.6	MANIFESTATION CLINIQUE ASSOCIÉE À L'INFLAMMATION : LA DOULEUR	58
2.6.1	Définitions et types de douleur.....	58
2.6.2	Physiologie de la douleur	59
2.6.3	La douleur inflammatoire.....	61
2.6.3.1	Sensibilisation périphérique associée à l'inflammation	62
2.6.3.2	Sensibilisation centrale associée à l'inflammation	63
2.6.4	Modèles de douleur inflammatoire persistante ou chronique utilisant l'Adjuvant Complet de Freund (ACF)	65
3	L'INFLAMMATION ET LES CYTOCHROMES P450.....	67
3.1	EFFET DE L'INFLAMMATION SUR LE MÉTABOLISME ET LA PHARMACOCINÉTIQUE DES MÉDICAMENTS CHEZ L'HOMME ET LE RAT.....	67
3.2	MODÈLES ANIMAUX D'INFLAMMATION ET D'INFECTION ET IMPACT SUR LES CYPS	69
3.2.1	Stimulation des macrophages péritonéaux	69
3.2.2	Inflammation localisée au niveau d'un site autre que le foie.....	69
3.2.3	Infections bactériennes et parasitaires.....	70
3.2.4	L'infection virale et les inducteurs d'interféron.....	70
3.3	EFFETS DE L'INFLAMMATION ET DE L'INFECTION SUR LES CYPS INDIVIDUELS	71
3.4	EFFETS DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES SUR LES CYPS.....	74
3.5	MÉCANISME DE SUPPRESSION DES CYPS EN CONDITIONS INFLAMMATOIRES.....	77
3.5.1	Mécanismes pré-traductionnels de régulation des CYPs	77
3.5.1.1	Au niveau transcriptionnel.....	79
3.5.1.1.1	Cytokines pro-inflammatoires.....	79
3.5.1.1.2	Autres voies et éléments de régulation	80

3.5.1.2	Au niveau posttranscriptionnel	82
3.5.2	Mécanismes posttraductionnels de régulation des CYPs.....	82
3.5.3	Chute du contenu en CYPs hépatiques et monoxyde d'azote.....	83
4	LES AGONISTES DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES	86
4.1	HISTORIQUE ET DÉFINITIONS.....	86
4.2	LES PRINCIPAUX RÉCEPTEURS OPIOÏDES.....	86
4.2.1	Classification.....	86
4.2.2	Description et mécanisme d'action cellulaire	87
4.2.3	Distribution tissulaire	88
4.2.4	Ligands endogènes	89
4.2.5	Effets pharmacologiques associés à l'activation des récepteurs opioïdes	90
4.2.6	Rôle des récepteurs opioïdes dans le contrôle de la douleur d'origine inflammatoire	90
4.3	LIGANDS SYNTHÉTIQUES DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES.....	91
4.3.1	Différents types de ligands synthétiques des récepteurs opioïdes.....	91
4.3.2	Ligands synthétiques non peptidiques des récepteurs μ : l'exemple de la morphine.....	93
4.3.2.1	Structure et propriétés physico-chimiques de la morphine.....	94
4.3.2.2	Le pharmacophore de la morphine et des morphinomimétiques....	94
4.3.2.3	Propriétés pharmacocinétiques de la morphine chez l'homme et le rat	95
4.3.2.3.1	Biodisponibilité orale et absorption	95
4.3.2.3.2	Distribution	96
4.3.2.3.3	Élimination.....	97
4.3.2.3.4	Métabolisme et profil d'excrétion de la morphine et de ses métabolites chez l'homme et le rat	98
4.3.2.3.4.1	Glucuroconjugaison de la morphine	100
4.3.2.3.4.2	La <i>N</i> -déméthylation de la morphine.....	101

4.3.2.3.4.3	La sulfoconjugaison de la morphine et autres voies métaboliques.....	102
4.3.3	Ligands synthétiques non peptidiques sélectifs pour le récepteur δ	102
4.3.3.1	Les arylméthylpipérazine <i>N, N</i> -diéthylbenzamides (diarylpipérazines) de première génération : le SNC80	104
4.3.3.2	Les arylméthylpipérazine <i>N,N</i> -diéthylbenzamides de seconde génération : le SNC80 version simplifiée.....	108
4.3.3.3	Les arylxylidèneméthylpipéridine <i>N,N</i> -diéthylbenzamides : le SNC80 version achirale	110
5	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	112
	CHAPITRE II.....	116
	I- PREMIER ARTICLE	
	II- DEUXIÈME ARTICLE	
	CHAPITRE III.....	178
	CHAPITRE IV	207
	CHAPITRE V.....	240
	CHAPITRE VI	279
	DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	
	BIBLIOGRAPHIE.....	311

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau I.	Principaux CYPs humains impliqués dans le métabolisme des médicaments	14
Tableau II.	Substrats-marqueurs et inhibiteurs sélectifs utilisés dans le phénotypage <i>in vitro</i> des CYPs hépatiques humains.....	15
Tableau III.	Substrats-marqueurs utilisés dans le phénotypage <i>in vitro</i> des CYPs hépatiques de rats	16
Tableau IV.	Liste non-exhaustive de substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP3As humains utilisés en clinique	34
Tableau V.	Principaux cytochromes P450 humains polymorphiques	36
Tableau VI.	CYPs sexuellement différenciés chez le rat.....	37
Tableau VII.	Mécanismes d'induction des CYPs.....	41
Tableau VIII.	Mécanisme d'inhibition des CYPs.....	42
Tableau IX.	Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique (PK) de médicaments chez le rat.....	68

Tableau X.	Effet de l'administration de différents stimuli inflammatoires sur l'ARN _m , le contenu total ou spécifique des CYPs (ou leur activité correspondante)	73
Tableau XI.	Effet des cytokines sur l'expression des CYPs hépatiques de rats après administration à l'animal intact ou après incubation avec des hépatocytes	76
Tableau XII.	Classification des récepteurs opioïdes	87
Tableau XIII.	Principaux effets (+ : positifs; - : négatifs) des agonistes des récepteurs opioïdes.....	91
Tableau XIV.	Compilation (non exhaustive) de ligands des récepteurs opioïdes	93
Tableau XV.	Paramètres pharmacocinétiques moyens de la morphine chez l'homme et le rat	96

CHAPITRE II

PREMIER ARTICLE

Table I.	Mean ionization efficiency and recovery of M and its metabolites	128
Table II.	Intra- and inter-day accuracy and precision data for M and its major metabolite.....	134
Table III.	Stability of M, NM, M6G and M3G after different storage conditions of QC samples	136

DEUXIÈME ARTICLE

Table I.	Apparent Michaelis-Menten kinetic parameters for morphine <i>N</i> -demethylation in pooled human liver microsomes	155
Table II.	Correlation between morphine <i>N</i> -demethylase activity and various CYP-specific activities following the incubation of morphine (50 μ M) in a panel of 15 different human liver microsomal preparations.....	159
Table III.	Apparent Michaelis-Menten kinetic parameters for morphine <i>N</i> -demethylation in microsomes from cDNA-expressed CYPs in insect cells. Incubations were performed in duplicate.....	163

CHAPITRE IV

Table I.	Percentage of the dose found as SNC80 in rat urine or feces following intravenous (10 μ mol/kg) or oral (50 μ mol/kg) administration of SNC80 to naïve or FCA-treated rats.....	223
Table II.	SNC80 pharmacokinetic parameters obtained following an intravenous (10 μ mol/kg) administration of SNC80 to naïve and FCA-treated rats	226
Table III.	SNC80 pharmacokinetic parameters obtained following an oral (50 μ mol/kg) administration of SNC80 to naïve and FCA-treated rats	228

CHAPITRE V

Table I. Pharmacokinetic parameters of ARM390 and SNC80 obtained following a intravenous or oral administration to rats.....	260
Table II. Binding affinities of SNC80, ARM390 and their main metabolite to membranes prepared from HEK-293S cells clones stably expressing δ -, μ -, or κ -receptors	261
Table III. Efficacies and potencies of SNC80, ARM390 and their main metabolite in stimulating [35 S]GTP γ S binding to membranes prepared from HEK-293S cells clones stably expressing δ -, μ -, or κ -receptors.	264
Table IV. Efficacies and potencies of SNC80, ARM390 and their main metabolite in stimulating [35 S]GTP γ S binding to rat brain membranes (with or without antagonists (CTOP) for the μ - or (TIPP) for the δ - receptor)	266

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

- Figure 1. Schéma simplifié des réactions de phase I et de phase II 3
- Figure 2. Structure primaire, secondaire et tertiaire des cytochromes P450 microsomaux (classe II). (a) Composantes typiques des cytochromes P450 microsomaux. (i. Structure primaire d'une variante mitochondriale de l'enzyme (classe I)) (b) Représentation imagée des structures secondaires et de la structure tertiaire de la face distale du CYP2C5..... 6
- Figure 3. Cycle catalytique des cytochromes P450s 11
- Figure 4. Représentation simplifiée de la relation entre le régime thérapeutique, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie 44
- Figure 5. Description des fibres sensorielles A α / β , A δ et C (a) et représentation graphique simplifiée de leur vitesse de conduction et de leur rôle dans la transmission de la douleur (b) 60
- Figure 6. Schématisation représentant les principaux médiateurs inflammatoires impliqués dans la sensibilisation périphérique et neurogénique. 64
- Figure 7. Schéma représentant la complexité des mécanismes prétraductionnels ou posttraductionnels de suppression de l'expression et de l'activité des CYPs en conditions inflammatoires.. 78

Figure 8. Structure chimique de la morphine et représentation de son pharmacophore	94
Figure 9. Profil urinaire de la morphine et de ses principaux métabolites après une administration intraveineuse chez l'homme (H), sous-cutanée chez le rat (R) mâle (♂) ou femelle (♀)	99
Figure 10. Structures chimiques d'un représentant oxymorphindole, du SB-205588 et du (-) TAN-67	104
Figure 11. Structures chimiques du SNC121, SNC80 et du SNC86.....	105
Figure 12. Positionnement suggéré du SNC80 dans le site de liaison du récepteur δ	106
Figure 13. Structure chimique du SB-219825	107
Figure 14. Stratégie de synthèse de nouveaux agonistes δ à partir du SNC80.....	109
Figure 15. Structure chimique d'agonistes δ de nouvelle génération, ARM390 et ARM434.....	111

CHAPITRE II

PREMIER ARTICLE

Figure 1. Chemical structures of morphine (M) and its metabolites, morphine- 3-glucuronide (M3G), morphine-6-glucuronide (M6G) and normorphine (NM).....	122
--	-----

- Figure 2. LC-MS chromatograms of drug-free plasma (A), rat plasma spiked with 150 nM of M, NM, M3G and M6G (B)..... 130
- Figure 3. LC-MS chromatograms of rat plasma spiked with LOQ concentrations of M (2.44 nM), NM (4.88 nM), M3G (4.88 nM) or M6G (4.88 nM)..... 131
- Figure 4. LC-MS chromatograms of a rat plasma sample collected one hour after an intravenous administration (10 μ mol/kg) of morphine 132
- Figure 5. Plasma concentration versus time profile of M (●), M3G (□) and NM (▲) after a 10 μ mol/kg intravenous administration of morphine to one rat ... 137

DEUXIÈME ARTICLE

- Figure 1. Morphine and its main metabolic pathways in humans 147
- Figure 2. Kinetics of normorphine formation from morphine in pooled human liver microsomes (HLM3)..... 156
- Figure 3. Effect of chemical substrates/inhibitors on morphine *N*-demethylation in pooled human liver microsomes 157
- Figure 4. Relationship between paclitaxel-6- α -hydroxylase (A), testosterone-6 β -hydroxylase (B) and morphine *N*-demethylase activity..... 160
- Figure 5. Normorphine formation rate following the incubation of 10 μ M morphine in microsomes prepared from insect cells expressing individual human CYPs 161

- Figure 6. Kinetics of normorphine formation from morphine in cDNA-expressed human CYP enzymes. (●), CYP3A4; (■), CYP2C8; (○), CYP2C19; (□), CYP2D6 and (×), CYP2C9 162
- Figure 7. Percentage contribution to morphine *N*-demethylation for CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 and CYP2C19 predicted from recombinant CYP using RAF normalisation 164

CHAPITRE III

- Figure 1. Volume of liquid displaced by the left hindpaw following a subcutaneous administration of saline (control; ■) or FCA (100 μ L; □) to rats. (B) Nitrite + Nitrate (NO_x; □) and AGP (■) levels in plasma following a subcutaneous administration of saline (control) or FCA to rats 191
- Figure 2. Total CYP and CYP3A2, CYP2E1, CYP2C11, CYP2C6 and CYP2B1/2 proteins contents in rat liver microsomes following a subcutaneous administration of 100 μ L of saline (control)/FCA to rat..... 192
- Figure 3. Western blotting analysis of hepatic microsomal CYP isoforms obtained from control and FCA-treated (72 h) rats 193
- Figure 4. Rates of 6 β (□), 16 α (■) and 2 α (■) hydroxytestosterone formation in rat liver microsomes following a subcutaneous administration of 100 μ L of saline (control) or FCA to rats 194
- Figure 5. *p*-nitrophenol hydroxylase (□), dextromethorphan-O-demethylase (■) and diclofenac-4-hydroxylase (■) activities in rat liver microsomes following a

subcutaneous administration of 100 μ L of saline (control) or FCA to rats ...	
.....	195

CHAPITRE IV

Figure 1. Chemical structure of SNC80 and SNC121	212
Figure 2. Mean total AGP levels (\square) and mean SNC80 unbound fraction (\blacksquare) in rat plasma obtained from naïve and FCA-treated rats.....	221
Figure 3. Mean total CYP contents (\blacksquare) and mean SNC80 <i>in vitro</i> CL _{int} (\square) in rat liver microsomes obtained from naïve and FCA-treated rats	222
Figure 4. Mean plasma concentration-time profile of SNC80 following an intravenous administration of SNC80 (10 μ mol/kg) to Naïve (\bullet) and FCA-treated (\square) rats	225
Figure 5. Mean plasma concentration-time profile of SNC80 following an oral administration of SNC80 (50 μ mol/kg) to Naïve (\bullet) and FCA-treated (\square) rats	227

CHAPITRE V

Figure 1. Proposed major metabolic pathways of ARM390 (a) and SNC80 (b) in rat liver microsomes.	246
---	-----

Figure 2. HPLC-MS chromatograms of RLM incubated 60 min in the presence of NADPH and ARM390 (a) or SNC80 (b). Inserts show the compounds incubated without NADPH 258

Figure 3. I. Mean plasma concentration-time profiles of ARM390 and ARM827 following an intravenous (10 $\mu\text{mol/kg}$) (a) or oral (10 $\mu\text{mol/kg}$) (c) administration of ARM390 to rats. II. Mean plasma concentration-time profile of SNC80 (\bullet) and SNC86 (\circ) following an intravenous (10 $\mu\text{mol/kg}$) (b) or oral (50 $\mu\text{mol/kg}$) (d) administration of SNC80 to rats. 259

Figure 4. Stimulation of [^{35}S]GTP γ S binding to membranes (human HEK-293S cells stably transfected with δ -, μ -, or κ -receptor) in response to SNC80, SNC86, ARM390 and ARM827. (a) human δ - (SNC80 as reference full agonist), (b) human μ - (DAMGO as reference full agonist), (c) human κ - (U-69593 as reference full agonist) 263

Figure 5. Stimulation of [^{35}S]GTP γ S binding to rat brain membranes in response to SNC80, SNC86, ARM390, ARM827 and DAMGO. (a) in absence of opioid antagonist (SNC80 as reference full agonist). (b) in the presence of 1 μM CTOP (SNC80 as reference full agonist) (c) in the presence of 0.5 μM TIPP (DAMGO as reference full agonist)..... 265

CHAPITRE VI

Figure 1. Représentation graphique de la séquence d'événements proposée..... 294

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ACF	Adjuvant Complet de Freund
ACTH	Adrénocorticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGP	α -1-glycoprotéine
Ah	Aromatic hydrocarbon
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein-1
ARN _m	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AUC	Surface sous la courbe
C/EBP β	CCAAT/Enhancer Binding Protein β <u>ou</u> NF-IL6
CAR	« Constitutive androstane receptor »
CGRP	« Calcitonin gene receptor protein »
CL	Clairance
CL _H	Clairance hépatique
Cl _{int,H}	Clairance intrinsèque; Clairance intrinsèque hépatique
C _{max}	Concentration plasmatique maximale
c-myc	Protooncogène c-myc
CYP	Cytochrome P450
DMPK	Métabolisme et pharmacocinétique <u>ou</u> drug metabolism and pharmacokinetics
e-	Electron
E _H	Coefficient d'extraction hépatique
eNOS	Forme endothéliale de la « nitric oxyde synthase »
FAD	Flavine-adénine dinucléotide
FDA	Food and Drug Administration

Fe ²⁺	Fer ferreux
Fe ³⁺	Fer ferrique
FMN	Flavine mononucléotide
F _{oral}	Biodisponibilité orale
f _u	Fraction libre plasmatique
GH	Hormone de croissance
HFN-1α	Hepatic nuclear factor-α
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IL-6R	Récepteur de l'IL-6
INOS	Forme inductible de la « nitric oxyde synthase »
IκB	Protéine inhibitrice du facteur nucléaire κB
JAK	« Janus activating kinase »
KD	KiloDalton
K _m	Constante apparente de Michaelis Menten
LPB	LPS binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
M3G	Morphine-3-glucuronide
M3S	Morphine-3-sulfate
M6G	Morphine-6-glucuronide
MAP-kinase	Mitogen-activating-protein kinase
NADH	Nicotinamide adénosine dinucléotide (forme réduite)
NADP ⁺	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (forme oxydée)
NADPH	Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NF-IL-6	Nuclear factor-IL-6
NF-κB	Nuclear factor-κB
nNOS	Forme neuronale de la « nitric oxyde synthase »
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxide synthase

PCN	prégnénolone 16 α -carbonitrile
PKA	Protéine kinase A
PPA(+)	Protéine de la phase aiguë de l'inflammation positive
PPA(-)	Protéine de la phase aiguë de l'inflammation négative
PPAR	Peroxisome proliferation activating receptor
PXR	Pregnane-X-receptor
Q _{ex}	Quantité excrétée dans les urines
Q _H	Débit hépatique
RAF	Relative activity factor
RH	Substrat des cytochromes P450
ROH	Produit des cytochromes P450
RXR	Retinoid-X-receptor
STAT	Signal transducer and activators of transcription
TCDD	2,3,7,8 tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
Tereben.	Térébenthine
T _{max, oral}	Temps requis pour atteindre la concentration plasmatique maximale
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UGT	Glucuronosyltransférase
V	Volume de distribution
V _{max}	Vitesse maximale apparente
V _{ss}	Volume de distribution à l'équilibre

ACIDES AMINÉS

Ala	alanine
Cys	cystéine
Asp	acide aspartique
Glu	acide glutamique
Phe	phénylalanine
Gly	glycine
His	histidine
Ile	isoleucine
Lys	lysine
Leu	leucine
Met	méthionine
Asn	asparagine
Pro	proline
Gln	glutamine
Arg	arginine
Ser	sérine
Thr	thréonine
Val	valine
Trp	tryptophan
Tyr	Tyrosine

Pour toi Éric

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier avant tout mon directeur de recherche, le D^r Julie Ducharme, pour m'avoir donné l'opportunité d'accomplir ce projet dans un milieu aussi enrichissant. Tout au cours de mes études graduées, le D^r Ducharme a su me faire partager son expertise scientifique, son dynamisme et sa passion pour la recherche. Je suis particulièrement reconnaissant de la confiance et de la patience qu'elle m'a accordé tout au cours de mon cheminement. Je suis vraiment privilégié d'avoir été son premier étudiant gradué.

J'aimerais également remercier mon co-directeur de recherche, le D^r Jean-Louis Brazier, qui a contribué à mon encadrement avec efficacité et disponibilité.

Je voudrais exprimer aussi ma gratitude envers D^r Murray P. Ducharme et du D^r Patrice Hildgen pour leur support et la confiance qu'ils m'ont accordé.

J'aimerais aussi souligner la contribution du D^r Roch Thibert qui m'a initié au travail de laboratoire et qui m'a encouragé à poursuivre dans le domaine de la recherche.

Je remercie spécialement mes collègues du département de métabolisme et pharmacocinétique chez AstraZeneca R&D Montréal: Pierre-Emmanuel Morin, Sophie Dautrey, The Minh Tu, Etienne Lessard, Marie Roumi, Heli Parenteau et Hélène Maurice, dont la collaboration dynamique et fructueuse m'a été indispensable. M'ayant fait bénéficier de leur expérience avec tant de disponibilité, de gentillesse et d'humour, ils ont à leur façon contribué à faire de moi non seulement un meilleur scientifique mais aussi une meilleure personne.

J'aimerais remercier les membres du jury pour avoir bien voulu accepter de réviser et d'évaluer cette thèse.

Je voudrais saluer la contribution d'AstraZeneca R&D Montréal et de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur soutien financier.

J'aimerais enfin rendre hommage :

À mes amis, particulièrement Dominic et Justine. Je les remercie pour leur aide, leurs encouragements et leur permanente complicité. Je vous prie de croire à mon amitié et à ma reconnaissance.

À Guy et Micheline, pour leur soutien et leur solidarité.

À mon frère, David, pour sa disponibilité et son intérêt marqué face à ce projet.

À mes parents, Raymond et Lise, qui ont su m'écouter, me supporter et m'inculquer le désir de me dépasser et de persévérer.

À ma copine Eve pour son amour et sa compréhension. Ta contribution à ce projet est beaucoup plus importante que tu ne le croies.

AVANT-PROPOS

Cette thèse est le fruit de travaux effectués et de connaissances acquises principalement dans un contexte industriel. Elle est une représentation de la multidisciplinarité à laquelle le chercheur en métabolisme et pharmacocinétique est exposé lorsqu'il oeuvre dans ce milieu. La pharmacologie *in vitro*, les études de pharmacodynamie, la biologie moléculaire, la pharmacocinétique, le métabolisme, la chimie médicinale sont tous, pour ne citer que ceux-là, des sujets et/ou des disciplines qui ensemble permettent aux scientifiques d'atteindre le but ultime du centre de recherche : la découverte d'un nouveau médicament.

Les chapitres (II, III, IV et V) constituant le corps de cette thèse sont composés d'articles publiés, acceptés ou soumis pour publication dans des journaux scientifiques. Ayant fait un passage direct de la maîtrise au doctorat, les manuscrits présentés au Chapitre II sont le résultat de travaux entrepris au cours de mes études de maîtrise, puis complétés au cours de ma première année de doctorat. Ces travaux ont pour points communs la morphine et les approches *in vitro* utilisées en vue d'identifier les cytochromes P450 (CYPs) impliqués dans sa *N*-déméthylation. Les connaissances acquises au cours de ces études avec la morphine ont permis de mettre en oeuvre le développement de méthodes analytiques et de techniques de phénotypage rigoureuses, nécessaires au deuxième volet de cette thèse. Demeurant dans le domaine des analgésiques et de la douleur, le deuxième volet de cette thèse s'est, d'une part, attaché à la caractérisation d'un modèle de douleur inflammatoire et des répercussions sur le métabolisme et la pharmacocinétique (Chapitre III et IV) et, d'autre part, attaché à l'évaluation de la pharmacologie *in vitro* et à la pharmacocinétique d'agonistes non peptidiques des récepteurs opioïdes δ et de leurs principaux métabolites (Chapitre IV et V).

CHAPITRE I

Revue de littérature

1 LES CYTOCHROMES P450 (CYPS) ET LES ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION

1.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES ENZYMES DE PHASE I ET DE PHASE II

Tout organisme vivant est constamment et inévitablement exposé à des substances chimiques endogènes, à des nutriments ou à des xénobiotiques. De façon générale et non exhaustive, sont désignés comme étant xénobiotiques, les médicaments, les drogues, les solvants organiques, les pro-carcinogènes, les polluants ou toute autre substance provenant de plantes ou micro-organismes étrangers au règne animal. La provenance des xénobiotiques est tout aussi diversifiée que leur potentiel à générer un effet pharmacologique ou toxique. Entre autres, ceux-ci peuvent provenir de la nourriture, de l'environnement ou de substances synthétisées par l'homme. Les propriétés physico-chimiques favorables de ces entités chimiques leur permettent de traverser les barrières tissulaires de façon efficace afin d'atteindre leur site d'action.

Le plus souvent, les enzymes de biotransformation convertissent ces molécules non polaires, lipophiles et pharmacologiquement actives en métabolites polaires, inactifs et non toxiques qui seront éliminés par les voies d'excrétion. Les enzymes qui catalysent les réactions de biotransformation peuvent cependant jouer un rôle clé dans la toxicité et le pouvoir carcinogène d'une multitude d'entités chimiques (Parkinson, 1996). En effet, l'altération de la structure de la molécule peut aussi conduire à la formation de produits actifs ou réactifs. Les voies de biotransformation sont classées en deux groupes: 1) celles découlant des enzymes de phase I qui impliquent la modification du substrat par oxydation, réduction ou hydrolyse de façon à générer un produit plus polaire avec une hydrophilicité modeste et 2) celles résultant des enzymes de phase II qui entraînent la conjugaison bimoléculaire d'un substituant hydrophile endogène à son substrat (xénobiotique ou métabolite de phase I) afin de

permettre la génération de produits très polaires qui pourront être rapidement excrétés dans l'urine ou dans la bile (Figure 1) (Parkinson, 1996). Molécules mères et métabolites de phase I ou II peuvent à leur tour être sous l'influence de protéines dites de phase III qui incluent les transporteurs tels la P-glycoprotéine et les MRPs (Suzuki et coll., 2001).

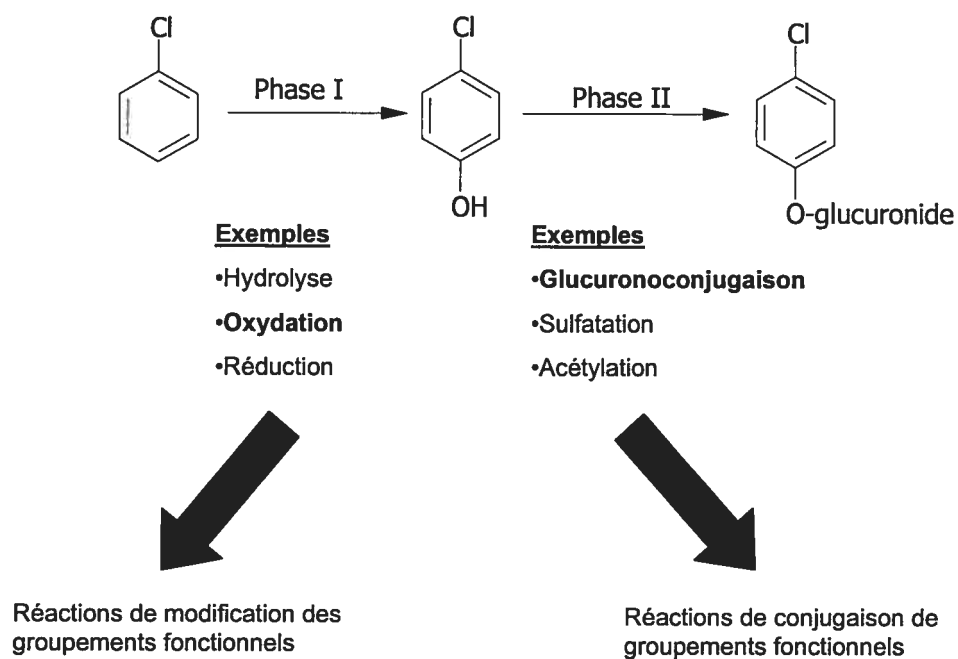


Figure 1. Schéma simplifié des réactions de phase I et de phase II.

1.2 LES CYTOCHROMES P450

1.2.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Les cytochromes P450 constituent une superfamille d'enzymes de type hème-thiolate qui sont exprimées de part et d'autre de l'arbre phylogénétique (Nelson et coll., 1996). Ces enzymes ont reçu cette dénomination en raison du complexe qu'elles

forment avec le monoxyde de carbone en conditions réductrices; ce complexe présente une bande facilement reconnaissable à 450 nm (Omura et Sato, 1964). De multiples formes de cytochromes P450 sont maintenant connues chez une multitude d'organismes vivants tels que les bactéries, les champignons, les plantes, les poissons, les oiseaux, les reptiles, les insectes et les mammifères, incluant l'homme (Lewis et coll., 1998a). Les revues les plus récentes proposent une liste de plus de 481 gènes, présents chez près de 85 espèces différentes d'eucaryotes et de 20 différentes espèces de procaryotes. La plupart des cytochromes P450 présents chez les procaryotes sont solubles alors qu'ils sont membranaires chez les eucaryotes (Ortiz de Montellano, 1999). Jusqu'à présent, on estime à 750 le nombre de cytochromes P450 identifiés, dont 57 sont présents chez l'homme (Nebert et Russell, 2002).

1.2.2 STRUCTURE ET TOPOLOGIE MEMBRANAIRE

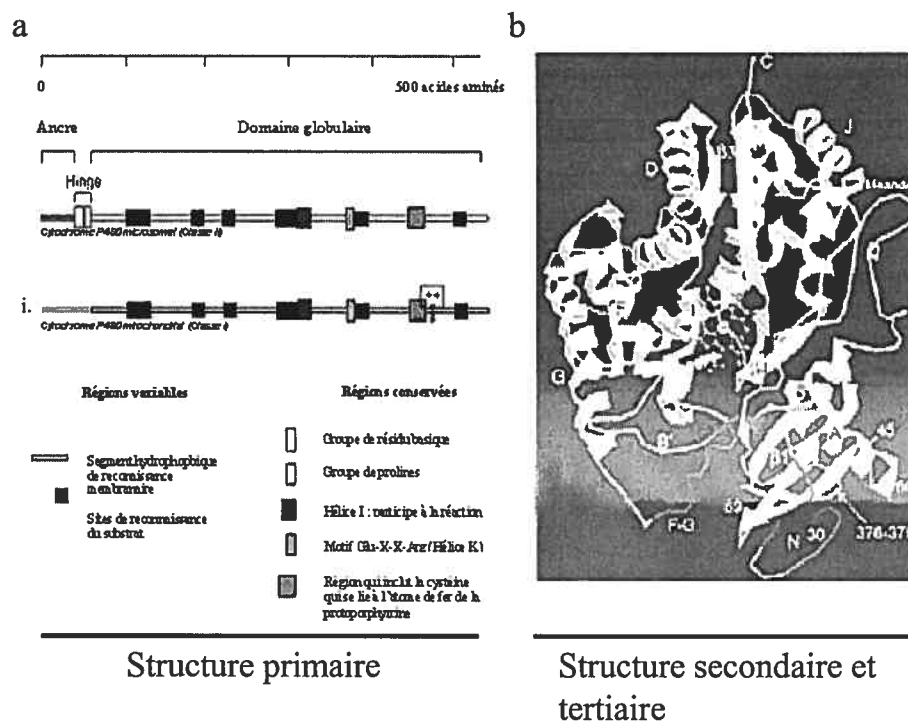
L'identité de séquence entre les cytochromes P450 est faible, atteignant parfois moins de 20 % (Hasemann et coll., 1995). Cependant, les informations structurales obtenues à partir d'études cristallographiques suggèrent que la variabilité observée au niveau de la séquence d'acides aminés n'empêche pas la conservation de la topologie générale de l'enzyme et de sa structure tertiaire (Peterson et Graham, 1998; Graham et Peterson, 1999). Ceci est supporté par de nombreuses études utilisant la mutagenèse dirigée et la modélisation homologue (Domanski et Halpert, 2001). L'identité en acides aminés la plus importante résiderait au niveau du noyau central de la protéine (Graham et Peterson, 1999). L'enzyme est constituée d'une partie protéique et d'une partie hémique, la protoporphyrine IX, qui demeure très bien conservée d'une espèce à l'autre (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Cette dernière serait profondément enfouie à l'intérieur du noyau central de la protéine (Poulos et coll., 1987; Poulos, 1995). L'atome de fer au centre de la partie hémique serait engagé dans un complexe de six liaisons: quatre liaisons de coordination aux atomes d'azote pyrroliques du noyau porphyrique, une liaison avec l'apoprotéine par

un groupement cystéine (Cys) qui confère aux cytochromes P450 leurs propriétés spectrales et une dernière liaison, opposée au groupement thiolate, avec l'oxygène d'une molécule d'eau (Ortiz de Montellano et De Voss, 2002).

La séquence d'acides aminés de l'apoprotéine est composée d'une série d'hélices α et de feuillets β (Figure 2). Ensemble, les hélices α forment un prisme triangulaire qui est caractéristique de la structure tertiaire de tous les cytochromes P450 (Poulos et coll., 1987; Williams et coll., 2000a; Williams et coll., 2000b). Le noyau central, bien conservé, est formé d'un enchevêtrement de six hélices α (D, E, I, J, K et L), de deux feuillets β et du « meander » (Figure 2) (Gotoh et coll., 1983; Koymans et coll., 1993; Graham et Peterson, 1999; Williams et coll., 2000a). Bien que la structure générale de la protéine soit bien conservée à travers l'arbre phylogénétique, il y a suffisamment de variabilité de séquence pour que chaque cytochrome P450 soit unique (Peterson et coll., 1997). Les régions les plus variables sont situées sur la portion *N*-terminale de la séquence d'acides aminés et sont principalement associées à celles impliquées dans l'ancrage et la localisation des cytochromes P450 membranaires, puis à celles impliquées dans la liaison et la reconnaissance du substrat.

Les cytochromes P450 sont synthétisés avec une séquence signal d'environ 35-40 acides aminés présente au niveau de la région *N*-terminale (Domanski et Halpert, 2001). Cette séquence permet de diriger la protéine vers la membrane du réticulum endoplasmique ou, lorsqu'elle est clivée, vers d'autres organelles (Bhagwat et coll., 1999; Szczesna-Skorupa et coll., 2000). Bien qu'ils puissent atteindre les mitochondries ou la membrane plasmique, la plupart des cytochromes P450 sont retenus au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Loeper et coll., 1990; Loeper et coll., 1993; Robin et coll., 2000). Au niveau du réticulum endoplasmique, la translocation des CYPs microsomaux est terminée par une séquence d'arrêt de transfert (un groupe d'acides aminés basiques) positionnant le domaine catalytique sur la surface cytoplasmique de la membrane (Monier et coll., 1988). La région *N*-terminale contient un groupe d'acides aminés hydrophobes et une séquence de

prolines qui contribuent à l'ancrage de la protéine à la membrane (Williams et coll., 2000a; Szczesna-Skorupa et Kemper, 2000).



(Adaptée de Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000)

Figure 2. Structure primaire, secondaire et tertiaire des cytochromes P450 microsomaux. Composantes typiques des cytochromes P450 microsomaux (classe II) (a). Représentation imagée des structures secondaires et de la structure tertiaire de la face distale du CYP2C5 (b). (i. Structure primaire d'une variante mitochondriale de l'enzyme (classe I))

Les régions impliquées dans la liaison et la reconnaissance du substrat sont en contact avec la partie héminique du cytochrome P450 et sont situées près du canal protéique où elles permettent l'accès au substrat (Gotoh, 1992; Halpert et He, 1993; Hasler et

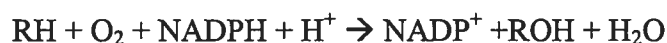
coll., 1994; Roussel et coll., 2000; Domanski et Halpert, 2001). Communément appelées sites de reconnaissance du substrat, ces régions sont flexibles et permettent à l'enzyme de fixer et de positionner le substrat afin de favoriser la réaction enzymatique (Gotoh, 1992). Les récentes études de caractérisation de structure, de modélisation par homologie et de mutagenèse dirigée suggèrent que la séquence de reconnaissance du substrat serait relativement bien conservée pour la plupart des cytochromes P450 (Domanski et Halpert, 2001).

1.2.3 NOMENCLATURE

La connaissance de la structure primaire a conduit à la création d'un système de nomenclature basé sur une classification ancestrale permettant de distinguer les cytochromes P450 (Nelson et coll., 1996). Le système de nomenclature regroupe les enzymes en familles et sous-familles où le préfixe CYP est utilisé pour définir les cytochromes P450 (Cyp pour la souris). Le premier chiffre arabe désigne les membres d'une même famille (ex : CYP1, 2, ...) lors que la lettre majuscule (minuscule pour la souris) qui suit indique la sous-famille (ex : CYP1A, B... ou Cyp1a). Enfin, un dernier chiffre arabe désigne un isoforme en particulier (ex : CYP2A2, 3, ...). Les membres d'une même famille possèdent plus de 40 % d'homologie de séquence en acides aminés alors que les membres d'une même sous-famille montrent plus de > 59 % d'homologie de séquence en acides aminés. La famille est désignée par un chiffre arabe suivant l'appellation CYP alors que la lettre majuscule (minuscule pour la souris) qui suit indique la sous-famille. Le gène doit être écrit en italique (ex : *CYP1A2*). Les progrès récents en biologie moléculaire ont aussi conduit à la découverte de plusieurs allèles et à l'adoption d'un système de nomenclature de ces derniers (ex : *CYP1A2*1*, *CYP1A2*2*, ...) (Ingelman-Sundberg et coll., 2000; Ingelman-Sundberg et Oscarson, 2002).

1.2.4 COMPLEXE MULTI-ENZYMATIQUE

Les CYPs sont désignés depuis longtemps comme étant des monooxygénases parce qu'un seul atome d'oxygène est incorporé au substrat, le second servant à former une molécule d'eau (Danielson, 2002). De façon générale, la réaction de mono-oxygénation de substrats organiques peut être représentée de la façon suivante:



Il est entendu que cette réaction nécessite la présence d'une molécule capable de réduire l'atome de fer porphyrique du CYP en lui faisant don d'un électron. Dans la plupart des cas, la nature s'est dotée d'outils permettant le transfert efficace d'électrons provenant d'agents réducteurs comme le NADPH ou le NADH. D'un point de vue biochimique, les CYPs peuvent être divisés en quatre classes de par la façon dont ils s'approprient les électrons nécessaires à leur fonctionnement (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000; Degtyarenko et Kulikova, 2001):

Classe I CYPs requérant une flavoprotéine; FAD réductase et une ferro-sulforédoxine (e.g. adrénoxine):



Classe II CYPs requérant une flavoprotéine; FAD/FMN réductase:



Classe III CYPs ne requérant pas de NADPH

Classe IV CYPs recevant leurs électrons directement du NADPH

Chez les mammifères, la plupart des CYPs sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique et au niveau mitochondrial (Domanski et Halpert, 2001). Selon le système de nomenclature présenté ci-haut, les CYPs mitochondriaux sont définis comme étant des enzymes de classe I, utilisant une FAD réductase et l'adrénoxine comme partenaire rédox (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Au niveau du réticulum endoplasmique, le NADPH fournit ses électrons par l'entremise d'une FMN/FAD protéine, la NADPH:CYP réductase, qui transfère ces derniers à l'unité CYP, un à la fois. Les CYPs du réticulum endoplasmique sont donc des enzymes de classe II.

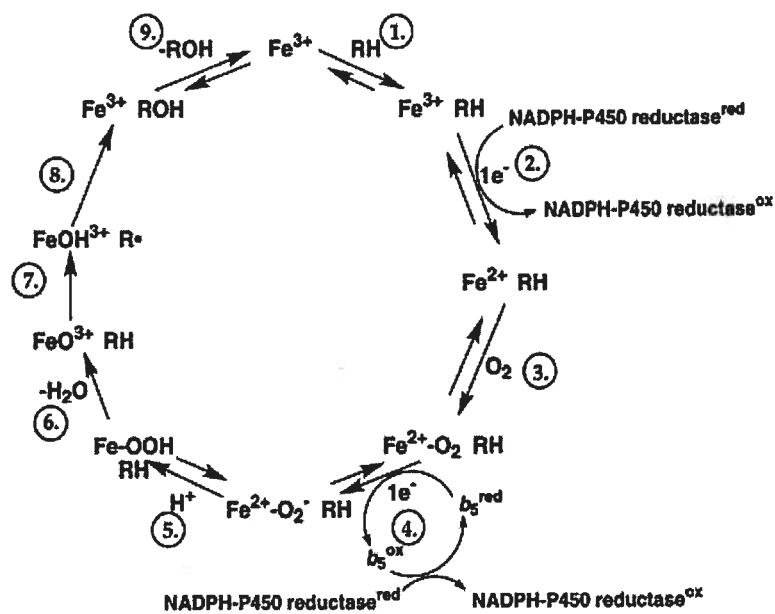
La NADPH:CYP réductase, dont la structure et les fonctions sont bien conservées chez les mammifères, joue un rôle clé dans ce transfert car les CYPs de classe II ne peuvent accepter leurs électrons par un autre mécanisme (Sevrioukova et Peterson, 1995; Sevrioukova et coll., 1999). Afin de permettre le fonctionnement optimal de certains CYPs, la participation d'une autre protéine accessoire, le cytochrome b_5 , est parfois requise (Schenkman et Jansson, 1999). Par exemple, l'activité catalytique des CYP3As humains est très dépendante du contenu en cytochrome b_5 (Yamazaki et coll., 1996; Hirota et coll., 2001). Dans ces circonstances, le cytochrome b_5 agit comme effecteur (activateur ou inhibiteur) des CYPs en fournissant le premier électron ou plus fréquemment, le deuxième électron au cycle catalytique. Le cytochrome b_5 servirait d'intermédiaire, soit à la NADPH:CYP réductase, soit à la cytochrome b_5 réductase (Schenkman et Jansson, 2003).

Il existe peu de données sur la structure quaternaire des CYPs. Selon certains modèles proposés, la NADPH:CYP réductase formerait un complexe hexamérique avec plusieurs CYPs (Tsuprun et coll., 1986; Myasoedova et Tsuprun, 1993; Myasoedova, 2000; Myasoedova et Magretova, 2001). La majeure partie du complexe serait située au niveau du cytosol, alors que les CYPs seraient enchâssés profondément dans la membrane lipidique où ils pourraient interagir avec les xénobiotiques à caractère lipophile. Des études utilisant différents mutants du CYP2B4 rapportent que les sites

de liaison de la NADPH:CYP réductase et du cytochrome b_5 seraient localisés dans la même région, où ils se chevaucheraient partiellement (Bridges et coll., 1998). L'environnement lipidique fourni par la membrane procurerait le support essentiel au bon fonctionnement du système et favoriserait les interactions entre les différents éléments faisant partie du complexe enzymatique. En effet, l'ancrage de la région *N*-terminale des CYPs à la membrane phospholipidique joue un rôle très important dans l'orientation adéquate de l'enzyme vers le cytosol et favorise l'interaction avec les différents partenaires redox (Dong et coll., 1996).

1.2.5 CYCLE CATALYTIQUE

Bien que la plupart des données proviennent d'études avec des CYPs bactériens solubles, les scientifiques s'entendent sur les étapes majeures du cycle catalytique du cytochrome P450 telles que représentées par le schéma de la Figure 3 (Lewis et Pratt, 1998; Guengerich, 2001). Bien entendu, ce schéma est une représentation simplifiée et ne tient pas compte d'éventuelles modifications conformationnelles de l'enzyme.



(tiré de Guengerich, 1999)

Figure 3. Cycle catalytique des cytochromes P450s.

Les grandes étapes comprennent :

1. La liaison du ligand à l'enzyme native au niveau de la région distale de la portion héminique.
2. Le transfert d'un électron de la flavoprotéine accessoire, la NADPH:CYP réductase, au fer ferrique (Fe^{3+}) au niveau de l'enzyme avec formation d'un complexe ferreux (Fe^{2+}) enzyme-substrat.
3. La formation d'un intermédiaire instable entre le complexe Fe^{2+} -substrat et l'oxygène moléculaire (O_2).
4. L'introduction d'un deuxième électron dans le cycle par l'intermédiaire de la NADPH-cytochrome P450 réductase ou, dans certains cas, du cytochrome b_5 .
5. L'ajout d'un proton au complexe.

6. L'ouverture du lien oxygène-oxygène avec formation d'une molécule d'eau et d'un complexe $(\text{FeO}_2)^{3+}$ pauvre en électron, à caractère très oxydant.
7. La réaction oxydoréductrice avec le substrat (abstraction simple d'un électron ou d'un hydrogène) ou la formation d'un complexe chimique.
8. La formation du produit.
9. La dissociation du complexe enzyme-produit; l'enzyme revient à l'état natif et disponible pour un nouveau cycle catalytique.

1.2.6 RÉACTIONS CATALYSÉES PAR LES CYTOCHROMES P450

Les cytochromes P450 ont pour rôle de catalyser les réactions de phase I de plusieurs substances endogènes ou de xénobiotiques (Parkinson, 1996). Le mécanisme implique différentes réactions radicalaires (abstraction simple d'un électron ou d'un atome) avec des liens affaiblis de la molécule ou la formation de complexes réactionnels avec les molécules présentant des liaisons π (Guengerich, 2001). Les cytochromes P450 catalysent une variété impressionnante de réactions d'oxydation comme l'hydroxylation, la déalkylation, la déhalogénéation, l'oxydation d'un hétéroatome (azote, soufre), d'oléfines ou de cycles aromatiques (Ortiz de Montellano, 1999). Bien que ce phénomène soit plus rare, certains cytochromes P450 ont aussi la particularité de métaboliser quelques entités chimiques par un procédé réducteur dans des conditions anaérobiques.

1.2.7 PRINCIPAUX CYPS HUMAINS ET DE RATS IMPLIQUÉS DANS LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS ET DES XÉNOBIOTIQUES

Chez l'homme et le rat, un nombre restreint d'isoformes est impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques, la plupart faisant partie des familles CYP1, CYP2, CYP3 ou CYP4A (Rendic et Di Carlo, 1997; Rendic, 2002). Le rôle physiologique de ces CYPs ne se limite cependant pas à la biotransformation des xénobiotiques. En

effet, plusieurs membres de ces familles contribuent à l'élimination et à la modification d'une multitude de composés endogènes. Par exemple, en plus de participer au métabolisme de certains médicaments (ex : clofibrate), les membres de la famille CYP4 sont impliqués principalement dans l' ω -hydroxylation de plusieurs acides gras et de leurs dérivés tels que les éicosanoïdes et les vitamines liposolubles (Rendic et Di Carlo, 1997). La distribution tissulaire des CYPs impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques est ubiquitaire (Tableau I). Par exemple, chez l'homme, ces CYPs sont prédominants dans le réticulum endoplasmique hépatique, mais on les retrouve dans des organes aussi différents que l'intestin, les poumons, les reins, le cerveau, la peau et le tissu olfactif (Rendic et Di Carlo, 1997).

La majeure partie des familles de cytochromes P450 exprimés chez les mammifères (ex : CYP5, CYP8, CYP11, CYP17, CYP19, CYP21, CYP24, CYP26, CYP27 et CYP51 chez l'homme) est consacrée à la biosynthèse et au catabolisme de produits endogènes spécifiques tels que les stéroïdes, les lipides et les acides biliaires (Guengerich, 1995a; Nebert et Russell, 2002). Ces enzymes possèdent une spécificité relativement élevée pour leur substrat; leur distribution tissulaire est plus spécifique et elles sont rarement impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques (Rendic et Di Carlo, 1997).

Tableau I. Principaux CYPs humains impliqués dans le métabolisme des médicaments.

Sous famille	Localisation chromosomale	CYP	Expression	Localisation(s) tissulaire(s) principale(s)
CYP1A	15q22-q24	1A1*	Inductible	Poumons, placenta
		1A2*	Constitutive	Foie (8-15 %)
CYP1B	2	1B1*	Inductible	Peau, glandes mammaires, utérus, prostate, tumeurs
CYP2A	19q13.1-q13.2	2A6*	Constitutive	Foie (5-12 %), nez
		2A7	Constitutive	Non fonctionnelle, foie
		2A13	Constitutive	Nez, foie
CYP2B	19q12-q13.2	2B6*	Constitutif/ Inductible ?	Foie (1-5 %), poumons
CYP2C	10q24.1	2C8*	Constitutive	Foie (1-12 %), reins
		2C9*	Constitutive	Foie (15-20 %), intestin
		2C18*	Constitutif	Foie (< 0,5 %)
		2C19*	Constitutif	Foie (< 5 %), intestin
CYP2D	22q13.1	2D6*	Constitutif	Foie (~ 2 %), duodénum
CYP2E	10q24.3-qter	2E1	Constitutif /inductible	Foie, poumons, placenta, peau, cerveau
CYP3A	7q22-qter	3A4*	Constitutif /inductible	Foie** (30-40 %), duodénum, placenta
		3A5*	Constitutif	Reins, foies**, duodénum, placenta, foie fœtal
		3A7*	Constitutif	Foie fœtal et adulte
		3A43	Constitutif	Prostate, testicule, foie

D'après Rendic et Di Carlo, 1997; Venkatakrisnan et coll., 2001 et Donato et Castell, 2003.

*Polymorphisme génétique identifié

** Quantité de CYP3A5 parfois plus importante que celle du CYP3A4 chez certains individus

Tableau II. Substrats-marqueurs et inhibiteurs sélectifs utilisés dans le phénotypage *in vitro* des CYPs hépatiques humains.

CYP	Substrats	Réactions	Inhibiteur(s) sélectif(s)
1A2	7-éthoxyrésorufine Caféine Phénacétine	<i>O</i> -dééthylation <i>N</i> -3-déméthylation <i>O</i> -dééthylation	Furafylline ^a
2A6	Coumarine	Hydroxylation	Méthoxalen ^{a,d} Coumarine ^c
2B6	7-benzoxyrésorufine S-méphénytoïne Bupropion	Débenzylation <i>N</i> -déméthylation Hydroxylation	Orphénadrine ^{a,d}
2C8	Paclitaxel	6 α -hydroxylation	Quercétine ^{c,d} Triméthoprim ^{c, d}
2C9	Tolbutamide S-warfarine Diclofenac	Méthyl-hydroxylation 7-hydroxylation 4'-hydroxylation	Sulphaphénazole ^c
2C19	S-méphénytoïne Oméprazole	4'-hydroxylation 4-hydroxylation	S-méphénytoïn ^{c,d} <i>N</i> -benzylirvanol
2D6	Débrisoquine Bufuralol Dextromethorphan	4-hydroxylation 1-hydroxylation <i>O</i> -déméthylation	Quinidine ^c Fluoxétine ^c Paroxétine ^c
2E1	Chlorzoxazone <i>p</i> -nitrophénol Aniline	6-hydroxylation 3-hydroxylation 4-hydroxylation	Diéthylthiocarbamate ^{a,d} 4-méthylpyrazole ^d
3A4	Testostérone Midazolam Érythromycine Nifédipine	6 β -hydroxylation 1-hydroxylation <i>N</i> -déméthylation Oxydation	Troléandomycine ^{a,b} Érythromycine ^a Gestodène ^a Kétoconazole ^{c,d}

D'après Clarke, 1998; Suzuki et coll., 2002 et Donato et Castell, 2003.

^a Inhibiteur irréversible (« mechanism based »); ^b Inhibiteur quasi-irréversible; ^c Inhibiteur réversible (compétitif ou mixte); ^d Sélectivité limitée

Tableau III. Substrats-marqueurs utilisés dans le phénotypage *in vitro* des CYPs hépatiques de rats.

Substrat	Réaction(s)	CYP(s)*
Testostérone	2 α -hydroxylation	2C11
	2 β -hydroxylation	3A1, 3A2
	6 β -hydroxylation	3A1, 2C13, 2A1, 3A2, 2C11
	7 α -hydroxylation	2A1, 2A2
	16 α -hydroxylation	2C11, 2B1/2, 2C7, 2C13
	16 β -hydroxylation	2B1/2, 3A1
Midazolam	4-Hydroxylation	3A1, 3A2
<i>p</i> -nitrophénol	Hydroxylation	2E1, 1A2, 3A1
Chlrozoxazone	6-hydroxylation	2E1, 1A2, 3A1
Tolbutamide	Méthyl-hydroxylation	2B1/2, 2C6
Diclofenac	Hydroxylation	2C6
Dextrométhorphan	<i>O</i> -déméthylation	2D1, 2D2
Bufuralol	1-hydroxylation	2D2, 2C6, 2C11
7-éthoxyrésorufine	Dééthylation	1A1/2, 2C6
Phénacétine	<i>O</i> -dééthylation	1A1/2, 2C6
7-pentoxyrésorufine*	Dépenthylation	2B1, 1A2

D'après Sonderfan et coll., 1987 et Kobayashi et coll., 2002.

*L'isoforme majeur catalysant la réaction est en **caractères gras**

1.2.7.1 Famille CYP1

1.2.7.1.1 CYP1A

La famille CYP1A comprend deux gènes distincts qui codent pour le CYP1A1 et le CYP1A2, deux protéines qui se retrouvent chez la plupart des mammifères (Nelson et coll., 1996). Chez l'homme, le gène codant pour ces deux isoformes est localisé sur le chromosome 15 où le *CYP1A1* et le *CYP1A2* sont séparés par seulement 25 kilobases (Ingelman-Sundberg, 2002).

1.2.7.1.1.1 CYP1A1

Le CYP1A1 est exprimé principalement au niveau extrahépatique (poumons, intestin) et est présent en très faible quantité dans le foie d'organismes non traité avec un inducteur des CYP1As (Ding et Kaminsky, 2003). Puisque son contenu hépatique est très faible, le CYP1A1 participe peu au métabolisme des médicaments. Cependant, des études *in vitro* chez l'homme et le rat et *in vivo* chez le rat montrent que le CYP1A1 est inductible et que sa contribution augmente de façon dramatique en présence de benzimidazoles et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques tels que le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), le benzo[*a*]pyrène, le 3-méthylcholanthrène ou la β -naphthoflavone (Whitlock, Jr., 1999; Krusekopf et coll., 2003a). Le mécanisme d'induction responsable de ce phénomène est très bien conservé à travers les espèces et contribue aux niveaux élevés de CYP1A humains pulmonaires ou intestinaux suite à une exposition prolongée à la fumée de cigarette ou à l'ingestion de viande cuite sur charbon de bois (Pelkonen et coll., 1998; Fontana et coll., 1999). Cette enzyme est impliquée dans l'activation de plusieurs toxines et d'agents carcinogènes (ex : hydrocarbures aromatiques, aflatoxine). Bien que son rôle dans l'apparition de certains cancers soit encore controversé, des études récentes suggèrent que le risque de cancer du poumon soit plus important chez les sujets

présentant un contenu en CYP1A1 pulmonaire important et homozygotes du CYP1A1*2 ou 3 (Taioli et coll., 2003; Vineis et coll., 2003).

1.2.7.1.1.2 CYP1A2

Bien qu'il présente une homologie de séquence de 68 % avec le CYP1A1, le CYP1A2 est exprimé de façon constitutive dans le foie humain et de rat. Chez l'homme, le CYP1A2 représente en moyenne 12,7 % du contenu total en CYPs hépatiques mesurés par immunoquantification (Shimada et coll., 1996).

Le CYP1A2 est responsable du métabolisme de plusieurs médicaments et xénobiotiques dont les alkoxyrésorufines, la phénacétine, le tacrine, la clozapine, l'olanzapine, la R-warfarine, la caféine et la théophylline (Rendic et Di Carlo, 1997; Clarke, 1998; Rendic, 2002). Parmi les inhibiteurs ayant une importance en clinique, on compte la furafylline, la fluvoxamine et les fluoroquinolones comme la ciprofloxacine et l'enoxacine (Gillum et coll., 1993; Jeppesen et coll., 1996; Kinzig-Schippers et coll., 1999; Raaska et Neuvonen, 2000). La furafylline est souvent utilisée comme inhibiteur spécifique du CYP1A2 *in vitro* (Clarke, 1998). La liaison de substrats ou d'inhibiteurs au site actif du CYP1A2 serait dépendante de plusieurs facteurs dont l'hydrophobicité, la dimension de la molécule, les liens hydrogène et les interactions π - π avec certains résidus acides aminés de la protéine (Lewis et coll., 1999c; Lewis et coll., 2002).

Chez l'homme, l'expression du CYP1A2 est aussi induite *in vitro* et *in vivo* par les hydrocarbures aromatiques suite à l'ingestion de légumes verts (contenant des 3-méthyl-indoles) ou à la prise de contraceptifs oraux (Pelkonen et coll., 1998; Shih et coll., 1999; Lampe et coll., 2000; Krusekopf et coll., 2003a). L'induction du CYP1A2 par l'oméprazole observée *in vitro* ne serait pas présente aux doses thérapeutiques utilisées chez l'homme (Rost et coll., 1994; Andersson et coll., 1998).

1.2.7.1.2 CYP1B (ou CYP1B1)

Tout comme le CYP1A1, le CYP1B1 est exprimé principalement au niveau extrahépatique (peau, glandes mammaires, utérus, prostate) (Ding et Kaminsky, 2003). Chez le rat et chez l'homme, le CYP1B1 est présent dans les tissus stéroïdogènes et dans certaines tumeurs du sein ou de la prostate (Walker et coll., 1995; Murray et coll., 1997). Il catalyse entre autres la 4-hydroxylation de l'estradiol (Murray et coll., 2001) et aurait un rôle important dans le développement physiologique, son abolition étant associée à certains déficits congénitaux chez les souris ne possédant pas le gène *Cyp1b1* (Stoilov et coll., 2001). Tout comme le CYP1A1, le CYP1B1 est induit en présence de benzimidazoles et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques tels que le TCDD, le benzo[*a*]pyrène, le 3-méthylcholanthrène ou la β -naphthoflavone (Murray et coll., 2001; Krusekopf et coll., 2003a).

1.2.7.2 Famille CYP2

La famille des CYP2 est la plus grande, la plus complexe et la plus diversifiée des CYPs chez les mammifères. Elle comprend plusieurs sous-familles, incluant le CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D et CYP2E (Nelson et coll., 1996). Alors que le rôle de ces cinq premières sous-familles est bien établi dans le métabolisme des médicaments chez l'homme et le rat, les sous-familles CYP2F, CYP2G, CYP2J, CYP2R, CYP2S, CYP2T, CYP2U ou CYP2W sont souvent associées à des pseudogènes et possèdent peu de représentants impliqués de façon significative dans le métabolisme des médicaments (Ingelman-Sundberg, 2001). Contrairement aux CYP2A-E, les membres de ces dernières sous-familles sont principalement exprimés au niveau extrahépatique (Ding et Kaminsky, 2003)

1.2.7.2.1 CYP2A

Chez le rat, on retrouve le CYP2A1, le CYP2A2 et le CYP2A3. Le CYP2A1 et le CYP2A2 sont principalement exprimés au niveau du foie et montrent une homologie de séquence en acides aminés d'environ 88 % (Gonzalez et coll., 1989). Alors que le CYP2A1 est dominant chez la femelle, le mâle exprime le CYP2A2 de façon exclusive (Jansson et coll., 1985; Waxman et coll., 1985). Pour sa part, le CYP2A3 est principalement exprimé dans les poumons et montre 71 et 73 % d'homologie avec le CYP2A1 et le CYP2A2, respectivement (Gonzalez et coll., 1989). Le CYP2A1 et le CYP2A2 participent entre autres à la 7 α hydroxylation de la testostérone (Nagata et coll., 1987).

Chez l'homme, le gène codant pour le CYP2A se retrouve sur le chromosome 19 (Hoffman et coll., 2001). Trois isoformes fonctionnels ont été décrits jusqu'à maintenant, le CYP2A6, le CYP2A7 et le CYP2A13 (Nelson et coll., 1996). Le CYP2A6 a un rôle mineur dans le métabolisme des médicaments et constitue en moyenne moins de 4 % du contenu total en CYPs hépatiques mesurés par immunoquantification. Il se retrouve aussi en petite quantité dans la muqueuse nasale et dans les cellules épithéliales bronchiques (Ding et Kaminsky, 2003). Le CYP2A13 est principalement présent dans les poumons (Su et coll., 2000). Bien que la protéine soit exprimable dans les vecteurs cellulaires, le CYP2A7 n'a pas de substrat connu (Hoffman et coll., 2001).

Plusieurs polymorphismes génétiques ont été identifiés avec le CYP2A6, ceux-ci étant attribuables à des allèles défectueux (Raunio et coll., 2001). L'allèle CYP2A6*4 est présent chez près de 20 % de la population asiatique et chez environ 1 % de la population caucasienne et est caractérisé par une délétion complète du gène (Xu et coll., 2002). Ainsi, les personnes présentant l'allèle CYP2A6*4 possèdent un phénotype lent pour le métabolisme de la coumarine et de la nicotine (Inoue et coll., 2000). Certains individus portant cette variante auraient une dépendance moins

marquée à la nicotine provenant de la cigarette (Tyndale et coll., 1999b; Sellers et coll., 2000).

Chez la plupart des mammifères, les CYP2As ont une activité catalytique importante vis-à-vis des 3-cétostéroïdes et de certains composés exogènes (par exemple, les coumarines) ou pro-carcinogènes tels que l'aflatoxine et les nitrosamines (Gonzalez et coll., 1989). Le CYP2A6 est une coumarine-7-hydroxylase qui participe aussi au métabolisme de la nicotine (Pelkonen et coll., 2000). En comparaison, la coumarine est un pauvre substrat du CYP2A13 (Su et coll., 2000). Contrairement au 8-méthoxypsoralène, la pilocarpine et le menthoflurane sont des inhibiteurs peu sélectifs de l'activité associée au CYP2A6 (Zhang et coll., 2001). Il y a très peu d'études portant sur l'induction du CYP2A6 humain. Cependant, *in vitro*, l'ARN_m du CYP2A6 est fortement induit en présence de rifampine dans les hépatocytes humains en culture (Rae et coll., 2001).

La sélectivité de substrat du CYP2A6 est peu connue et mal définie. De récentes études de modélisation et de relations structure-activité ont montré que la liaison de substrats ou d'inhibiteurs au site actif du CYP2A6 est principalement dépendante de l'hydrophobicité et de liens hydrogène entre la molécule et certains résidus acides aminés de la protéine (Lewis et coll., 1999a; Lewis, 2002).

1.2.7.2.2 CYP2B

Cette sous-famille a été étudiée de façon exhaustive chez le rat, principalement en raison de son inductibilité en présence de phénobarbital (Ronis et Ingelman-Sundberg, 1999). Le rat possède trois gènes de cette sous-famille impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (ex : *CYP2B1*, *CYP2B2* et *CYP2B3*), les plus souvent étudiés étant le *CYP2B1* et *CYP2B2*. Bien que présents dans plusieurs tissus dont le foie, leur expression constitutive est très faible et il est difficile de mesurer l'activité enzymatique lorsque l'enzyme n'est pas induite ou purifiée (Henderson et Wolf,

1992). Ils catalysent entre autres la 16β -hydroxylation de la testosérone et la déalkylation de la pentoxyrésorufine (Sonderfan et coll., 1987; Kobayashi et coll., 2002). Le CYP2B1 est plus efficace que le CYP2B2 pour métaboliser ces substrats (Guengerich, 1997). Le CYP2B3 n'est pas inductible par le phénobarbital et ne catalyse aucune des réactions effectuées par les autres CYP2Bs (Jean et coll., 1994).

Chez l'homme, le gène du *CYP2B6* est retrouvé sur le chromosome 19, à proximité des gènes du *CYP2A* et du *CYP2F* (Hoffman et coll., 2001). Le CYP2B6 est principalement présent au niveau du foie, mais est aussi présent en faible quantité dans les poumons (Mimura et coll., 1993; Ding et Kaminsky, 2003). Son contenu hépatique est très variable, pouvant aller de 0,3 à 82 pmol/mg protéines (Shimada et coll., 1994; Yamazaki et coll., 1997; Rodrigues, 1999).

Le CYP2B6 participe à l'hydroxylation du bupropion et contribue de façon significative à la *N*-déméthylation de la *S*-méphénitoïne et au métabolisme du *S*-méphobarbital, de l'ifosphamide, du cyclophosphamide et du propofol (Ekins et Wrighton, 1999; Faucette et coll., 2000). Bien que l'orphénadrine et le diéthylthiocarbamate inhibent efficacement le CYP2B6, il n'existe aucun inhibiteur spécifique à cette enzyme (Ekins et coll., 1997). Le CYP2B6 est induit par plusieurs molécules participant à l'induction des CYP3As comme le phénobarbital, l'hyperforine et la rifampine (Moore et coll., 2000; Goodwin et coll., 2001).

Tout comme le CYP2A6, la sélectivité du CYP2B6 est peu connue et mal définie. D'après certaines études structure-activité, les substrats et les inhibiteurs du CYP2B6 partageraient tous une tendance à former et à accepter des liens hydrogène avec les acides aminés composant le site actif de l'enzyme (Lewis et coll., 1999b; Lewis et coll., 2002)

1.2.7.2.3 CYP2C

Chez les mammifères, la sous-famille des CYP2Cs possède le plus grand éventail d'isoformes de tous les CYP2 (Nelson et coll., 1996). À lui seul, le rat possède plus de sept isoformes dont les CYP2C6, CYP2C7, CYP2C11, CYP2C12, CYP2C13 et CYP2C22. Leur régulation est fortement influencée par l'âge et le sexe de l'animal (Bandiera et coll., 1986; Matsumoto et coll., 1986; Yoshioka et coll., 1987; Zaphiropoulos et coll., 1988a; Zaphiropoulos et coll., 1988b). Principalement exprimées au niveau hépatique, ces enzymes constituent la majeure partie du contenu total en CYP chez le rat mâle (Oinonen et Lindros, 1998). Par exemple, le CYP2C11 constitue plus de 50 % du contenu total en CYP hépatique (Nedelcheva et Gut, 1994).

Chez l'homme, la sous-famille CYP2C est composée d'au moins quatre membres dont le CYP2C8, le CYP2C9, le CYP2C18 et le CYP2C19 (Nelson et coll., 1996). Les membres de cette sous-famille partagent le même gène et présentent une homologie de séquence oscillant entre 80 et 95 %. Bien que ces enzymes soient exprimées principalement au niveau hépatique, de faibles quantités ont pu être identifiées au niveau extra-hépatique, en particulier dans l'intestin (Zhang et coll., 1999a). Lorsque mesurés par immunoquantification, les CYP2Cs constituent plus de 20 % du contenu total en CYPs hépatiques humains, deuxièmes derrière les CYP3As (Shimada et coll., 1994). De même, la proximité de leurs éléments de régulation pourrait expliquer pourquoi les CYP2Cs sont souvent activés par les mêmes inducteurs. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le contenu en CYP2C8, 2C9 et 2C19 est augmenté en présence de rifampine (Pelkonen et coll., 1998; Gerbal-Chaloin et coll., 2001).

1.2.7.2.3.1 CYP2C8

Le rôle du CYP2C8 dans le métabolisme des médicaments n'est pas encore très bien défini, tout comme son contenu total, qui peut varier entre 1 et 12 % des CYPs totaux

selon les études (Forrester et coll., 1992; Inoue et coll., 1997; Rodrigues, 1999). Bien que l'activité associée au CYP2C8 soit sujette au polymorphisme, l'importance clinique de celui-ci reste à démontrer (Dai et coll., 2001; Bahadur et coll., 2002).

Plusieurs études suggèrent qu'il y a un chevauchement important entre les substrats et inhibiteurs du CYP3A4 et ceux du CYP2C8 (Ong et coll., 2000). Le CYP2C8 joue un rôle majeur dans le métabolisme du taxol, des thiazolidinediones, de la chloroquine et de l'amodiaquine (Baldwin et coll., 1999; Yamazaki et coll., 1999; Dai et coll., 2001; Li et coll., 2002; Projean et coll., 2003). Son activité est inhibée *in vitro* par la quercétine, le trimétoprime, les thiazolidinediones et plusieurs antifongiques azolés tels le kétoconazole et le miconazole (Rahman et coll., 1994; Ong et coll., 2000; Wen et coll., 2002; Sahi et coll., 2003).

1.2.7.2.3.2 CYP2C9

Le CYP2C9 constitue le CYP2C le plus abondant du foie (Inoue et coll., 1997; Rodrigues, 1999). L'activité associée au CYP2C9 est aussi sujette au polymorphisme avec au moins deux variantes alléliques identifiées (CYP2C9*2 et *3) (Rettie et coll., 1994; Sullivan-Klose et coll., 1996). Attribuable à la présence de l'allèle CYP2C9*3, le phénotype métaboliseur lent est très peu fréquent, mais peut avoir un impact sur les substrats du CYP2C9 ayant une fenêtre thérapeutique étroite comme la S-warfarine, la phénytoïne et certains anti-diabétiques (Kidd et coll., 1999; Goldstein, 2001; Niemi et coll., 2002; Shon et coll., 2002; Scordo et coll., 2002).

Le CYP2C9 est impliqué dans le métabolisme d'une grande variété de molécules comme la S-warfarine, le Δ^9 -tétrahydrocannabinol, la phénytoïne, le diazépam, le losartan, le célécoxib et plusieurs anti-inflammatoires non-stéroïdiens (ex : flurbiprofène, diclofénac, ibuprofène, etc.) (Lee et coll., 2002). Le sulphaphénazole et plusieurs autres sulfamidés sont des inhibiteurs puissants du CYP2C9 *in vitro* et *in vivo* (Newton et coll., 1995; Pelkonen et coll., 1998).

La liaison de ces composés au site enzymatique serait principalement due à l'interaction entre un substituant acide de la molécule et un résidu basique de la protéine situé près de la région héminique. De plus, des liens hydrogène et des interactions π - π consoliderait la liaison (Lewis et coll., 2002; Lewis, 2003).

1.2.7.2.3.3 CYP2C18

Chez l'homme, le CYP2C18 est exprimé en très faible quantité (<0,5 % du contenu total hépatique en CYPs) (Inoue et coll., 1997). Bien qu'il participe au métabolisme du diazépam et de l'imipramine *in vitro*, son importance clinique reste à déterminer (Venkatakrishnan et coll., 2001).

1.2.7.2.3.4 CYP2C19

Bien que le contenu hépatique en CYP2C19 soit largement inférieur à celui du CYP2C9, il participe au métabolisme de plusieurs médicaments en clinique (Inoue et coll., 1997; Rodrigues, 1999). Par exemple, le CYP2C19, qui est aussi exprimé de façon polymorphique, est responsable de la 4-hydroxylation de la *S*-méphénitoïne (Hall et coll., 1987). La prévalence du phénotype lent varie de façon considérable selon l'origine ethnique/géographique (Goldstein et coll., 1997). En effet, moins de 5 % de la population caucasienne exprime le phénotype métaboliseur lent alors que 12 à 20 % des Asiatiques présentent ce phénotype (Goldstein et coll., 1997; Xie et coll., 1999). Au moins dix allèles différents ont été décrits jusqu'à maintenant, avec au moins deux allèles nuls (*CYP2C19*2* et *CYP2C19*3*). Ces allèles qui constituent ensemble 99 % de tous les allèles défectueux observés chez les Asiatiques et 87 % de ceux obtenus chez les Caucasiens (Goldstein, 2001).

Le CYP2C19 contribue à l'élimination des inhibiteurs de la pompe à proton (ex : oméprazole, pantoprazole, lansoprazole), du diazépam, du citalopram, du proguanil et

de l'amitryptiline (Desta et coll., 2002; Wilkinson, 2002). Le CYP2C19 est inhibé par la fluvoxamine, le fluconazole et la ticlopidine (Desta et coll., 2002). Bien que le *N*-3-benzylrivanol semble être prometteur, il n'y pas vraiment d'inhibiteurs spécifiques du CYP2C19 disponibles, la *S*-méphénytoïne étant souvent utilisée comme inhibiteur compétitif (Clarke, 1998; Suzuki et coll., 2002).

Contrairement au CYP2C9, le profil de liaison et de sélectivité des substrats ou inhibiteurs du CYP2C19 est plus difficile à cerner en raison de leurs différences physico-chimiques et structurales (Clarke et Jones, 2002). Cependant, ces molécules pourraient toutes former et accepter des liens hydrogène avec des acides aminés complémentaires composant le site actif du CYP2C19 (Lewis et coll., 2002). La faible spécificité relative de cette enzyme et sa similitude avec les autres CYP2Cs expliquent probablement pourquoi plusieurs substrats métabolisés par le CYP2C9 le sont aussi par le CYP2C19.

1.2.7.2.4 CYP2D

Chez le rat, il existe six gènes appartenant à la famille CYP2D, incluant les *CYP2D1*, *2D2*, *2D3*, *2D4* et *2D18* (Matsunaga et coll., 1990). Les membres de cette famille sont principalement présents dans le foie, les reins et le cerveau (Nedelcheva et Gut, 1994; Hiroi et coll., 1998; Tyndale et coll., 1999a). Bien que certaines réactions soient spécifiques à certains isoformes, il existe habituellement un chevauchement important au niveau des substrats catalysés par les CYP2Ds de rat (Hiroi et coll., 2002). De façon générale, les CYP2Ds hépatiques de rat catalysent les mêmes réactions que le CYP2D6 humain (Hiroi et coll., 2002; Kobayashi et coll., 2002). En accord avec ces observations, le rat Dark Agouti, une sous-espèce caractérisée par une déficience en CYP2D1 et CYP2D2, présente un phénotype lent pour les substrats du CYP2D6 (Matsunaga et coll., 1989; Yamamoto et coll., 1998).

Chez l'homme, l'isoforme le plus important est le CYP2D6 et le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome 22 (Nelson et coll., 1996). Le CYP2D6 est principalement localisé dans le foie où il représente en moyenne 1,5 % du contenu total en CYPs hépatiques humains mesurés par à l'aide d'anticorps spécifiques (Shimada et coll., 1994).

Possédant une expression polymorphique où près de 8 à 10 % de la population caucasienne portent le phénotype métaboliseur lent, le CYP2D6 a fait l'objet de recherches soutenues (Bertilsson, 1995). Grâce à l'utilisation de sondes métaboliques telles que la débrisoquine ou le dextrométhorphan, plusieurs équipes ont mis en évidence d'autres sous-populations comme celles des métaboliseurs intermédiaires et des métaboliseurs ultrarapides (Dahl et coll., 1995; Ingelman-Sundberg et coll., 1999; Bertilsson et coll., 2002). Aujourd'hui, il est reconnu que la prévalence de ces phénotypes varie de façon considérable selon les ethnies (Ingelman-Sundberg, 2001). Les bases génétiques du polymorphisme associé au CYP2D6 sont bien établies et près de 48 mutations, résultant en une cinquantaine d'allèles, ont été identifiées jusqu'à maintenant (Meyer et Zanger, 1997; Marez et coll., 1997). Les homozygotes du *CYP2D6*4* et *CYP2D6*5* présentent le phénotype métaboliseur lent (Ingelman-Sundberg et coll., 1999). Pour leur part, les porteurs des allèles *CYP2D6*10* et *CYP2D6*17* montrent une activité réduite, sans pour autant avoir un phénotype métaboliseur lent. Ces quatre allèles représentent, ensemble, près de 95 % de toutes les variantes alléliques défectueuses du CYP2D6 (Marez et coll., 1997). Enfin, certains individus présentent une duplication de leur gène et une amplification pouvant aller jusqu'à 13 copies (*CYP2D6*2XN*, où N représente le nombre de gènes) et sont associés au phénotype métaboliseur ultra-rapide (Dahl et coll., 1995; Marez et coll., 1997).

Bien qu'il représente une faible proportion du contenu hépatique, le CYP2D6 est partiellement ou entièrement responsable du métabolisme de près de 25 % de tous les médicaments composant l'arsenal thérapeutique (Clarke et Jones, 2002). Ces

molécules sont principalement utilisées en pharmacologie cardiovasculaire et du système nerveux central comme la thioridazine, la désipramine, la nortriptyline, la paroxétine, la venlafaxine, la codéine, le dextrométhorphan, le tramadol, le métoprolol, l'encaïnone, le flécaïnone, la propofène et la mexéline (Rendic et Di Carlo, 1997; Bertilsson et coll., 2002; Rendic, 2002). Ces molécules possèdent pour la plupart un index thérapeutique étroit et les modifications importantes de leur métabolisme peuvent conduire à un échec thérapeutique ou à des effets secondaires importants. Plusieurs médicaments basiques tels la fluoxétine, la paroxétine, la terbinafine, la ticlopidine et la quinidine inhibent efficacement le CYP2D6 (Newton et coll., 1995; Pelkonen et coll., 1998; Clarke, 1998). Contrairement à plusieurs autres CYPs humains, le CYP2D6 ne serait pas inductible (Ingelman-Sundberg, 2001).

La plupart des substrats/inhibiteurs du CYP2D6 contiennent un azote basique ($pK_a > 8$) qui est ionisé au pH physiologique. L'interaction ionique entre l'azote protoné de la molécule avec un résidu aspartate favoriserait la liaison (Smith et coll., 1998; Lewis, 2000). Si les conditions nécessaires à la liaison ionique sont respectées, l'affinité de la molécule dépendra alors essentiellement des interactions hydrophiles/lipophiles avec les acides aminés du site catalytique (Lewis et coll., 2002). Enfin, la présence d'un site accepteur de lien hydrogène augmenterait l'affinité et, par conséquent, le potentiel inhibiteur de la molécule.

1.2.7.2.5 CYP2E

Le CYP2E1 a été purifié chez l'homme et le rat. La structure primaire de l'apoprotéine présente une homologie de séquence de près de 80 % entre les deux espèces et laisse suggérer un rôle physiologique commun (Gonzalez, 1988). En accord avec cette observation, des études impliquant des souris déficientes en *Cyp2E1* suggèrent que le CYP2E1 aurait un rôle dans la gluconéogenèse à partir de corps cétoniques, spécialement en période de jeûne (Bondoc et coll., 1999). Chez l'homme, le CYP2E1 est présent dans plusieurs tissus dont le foie, où il représente en

moyenne 6,6 % du contenu total en CYPs humains (Carriere et coll., 1996; Shimada et coll., 1996).

Bien qu'il soit impliqué dans le métabolisme de certains médicaments comme la chlorzoxazone, l'acétaminophène ou les anesthésiques généraux, le CYP2E1 participe essentiellement à la biotransformation d'acides gras ou de petites molécules toxiques comme l'éthanol, l'acétone ou l'aniline (Tanaka et coll., 2000). Le disulfiram et son principal métabolite, le diéthylthiocarbamate, sont des inhibiteurs puissants, mais peu spécifiques, de cette enzyme (Newton et coll., 1995; Clarke, 1998). Le CYP2E1 est inductible lorsque mis en présence d'isoniazide ou de solvants organiques comme l'éthanol ou l'acétone (Donato et Castell, 2003).

1.2.7.3 Famille CYP3

1.2.7.3.1 CYP3A

Chez le rat, les CYP3As sont représentés par le CYP3A1, le CYP3A2, le CYP3A9, le CYP3A18 et le CYP3A23 (Nelson et coll., 1996; Robertson et coll., 1998). Tout comme les membres des CYP2C, les CYP3As de rat sont présents au niveau du foie et leur expression subit une influence importante de l'âge et du sexe de l'animal (Yamazoe et coll., 1986; Gonzalez et coll., 1986; Robertson et coll., 1998). Ils catalysent la biotransformation de plusieurs hormones sexuelles comme la testostérone (la 6 β hydroxylation) (Sonderfan et coll., 1987; Xue et coll., 2003) et l'hydroxylation du midazolam (Kobayashi et coll., 2002). Les CYP3As de rat (CYP3A1/2) sont inductibles et leur contenu hépatique augmente de façon significative après exposition au prégénolone 16 α -carbonitrile (PCN), à la troléandomycine ou au clomitrazole (Hedlund et coll., 2001). Bien qu'elle soit un bon inducteur des CYPs chez l'homme, la rifampine n'induit pas le CYP3A1/2 chez le rat (Moore et Kliewer, 2000). Le CYP3A9 est induit par l'éthylnyloestradiol (Jager et coll., 1999).

Chez l'homme, quatre membres de la sous-famille CYP3A ont été décrits jusqu'à présent: les CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 et CYP3A43 (Gellner et coll., 2001).

1.2.7.3.1.1 CYP3A4 et CYP3A5 humains

Le CYP3A4 et le CYP3A5 sont les membres les plus importants de la sous-famille CYP3A chez l'homme adulte. Principalement présents au niveau du foie et de la muqueuse du petit intestin, ils y constituent de 30 à 70 % du contenu total en CYPs (Shen et coll., 1997; Wilkinson, 2002). Contrairement au CYP3A4, le CYP3A5 est aussi retrouvé au niveau du rein et dans le foie fœtal (Haehner et coll., 1996; de Wildt et coll., 1999). L'expression du CYP3A4 et du CYP3A5 est très variable dans les microsomes préparés à partir de tissus hépatiques ou intestinaux humains (Zhang et coll., 1999a; Shimada et coll., 1994). Par exemple, le contenu hépatique en CYP3A5 peut osciller entre 6 et 99 % du contenu hépatique total en CYP3A (Lamba et coll., 2002).

Alors que le rôle du polymorphisme ne semble pas avoir un impact majeur sur l'expression constitutive du CYP3A4, l'expression du CYP3A5 est clairement polymorphique et varie de façon considérable selon l'ethnie. Par exemple, on retrouve le CYP3A5 hépatique chez 10 à 20 % des Caucasiens, 33 % des Japonais et 55 % des Afro-Américains (Lamba et coll., 2002). La principale cause de cette expression polymorphique est l'allèle *CYP3A5*3* qui est présent chez près de 85 à 95 % des Caucasiens et de 43 à 73 % des Afro-Américains. Les porteurs homozygotes de cet allèle présentent de très faibles quantités de CYP3A5 tant au niveau hépatique qu'intestinal (Kuehl et coll., 2001; Hustert et coll., 2001). Chez les sujets présentant l'allèle fonctionnel *CYP3A5*1*, le CYP3A5 correspond à plus de 50 % du contenu hépatique et jéjunal en CYP3A (Lin et coll., 2002).

1.2.7.3.1.2 CYP3A7

Le CYP3A7 est présent principalement dans le tissu fœtal, le placenta et l'endomètre (Schuetz et coll., 1993; Ring et coll., 1999). Bien que l'expression du CYP3A7 diminue rapidement après la naissance, des études ont montré que le foie de certains adultes présentait encore de faibles quantités de la protéine (de Wildt et coll., 1999; Tateishi et coll., 1999). Cette observation pourrait avoir une base génétique puisque les adultes exprimant les plus hauts niveaux de CYP3A7 hépatiques étaient pour la plupart porteurs des allèles *CYP3A7*1B* ou *CYP3A7*1C* (Burk et coll., 2002).

1.2.7.3.1.3 CYP3A43

Le dernier membre de la sous-famille, le CYP3A43, a été cloné récemment (Gellner et coll., 2001). En raison de la faible quantité d'ARN_m présent dans le foie ou au niveau extra-hépatique (prostate, testicules), le CYP3A43 ne devrait pas contribuer de façon significative au métabolisme des médicaments (Westlind et coll., 2001).

1.2.7.3.1.4 Les substrats des CYP3As humains

Bien qu'il existe des exemples où une distinction importante est observée (ex : érythromycine, quinidine), la plupart des substrats du CYP3A4 sont aussi des substrats du CYP3A5 (Thummel et Wilkinson, 1998). Leur faible spécificité et leur importance quantitative expliquent probablement pourquoi le CYP3A4 et le CYP3A5 contribuent au métabolisme de près de 50 % des médicaments composant l'arsenal thérapeutique (Clarke et Jones, 2002). Le tableau IV présente une liste non exhaustive des substrats et des inhibiteurs des CYP3As humains.

1.2.7.3.1.5 Sélectivité des substrats et des inhibiteurs des CYP3As humains

Les CYP3As humains, en particulier le CYP3A4, semblent métaboliser de nombreux substrats à la condition qu'ils soient lipophiles. En effet, la réaction semble être dictée par la facilité de l'enzyme à faire abstraction d'un hydrogène dans le cas d'une C-hydroxylation ou d'un électron dans le cas d'une N-déalkylation (Smith et coll., 1998; Clarke et Jones, 2002).

Selon les modèles proposés, le site actif des CYP3As serait très large et composé essentiellement de résidus hydrophobes (aromatiques ou non), neutres et de quelques résidus polaires (Roussel et coll., 2000). Les interactions avec le substrat seraient dictées principalement par les forces lipophiliques, quelques liens hydrogène et la capacité du substrat à expulser une molécule d'eau du site actif (Smith et coll., 1998). Étant faibles et peu spécifiques, les interactions avec les acides aminés de l'enzyme permettraient une certaine liberté de mouvement au substrat. Puisque ce dernier pouvait adopter plusieurs positions dans le site catalytique, les CYP3As forment souvent plus d'un produit à partir d'un même substrat.

La taille du site actif pourrait aussi expliquer la capacité de CYP3A à accueillir plusieurs ligands de manière homotropique ou hétérotropique au niveau de leur site actif (Tang et Stearns, 2001; He et coll., 2003). Ce phénomène pourrait être responsable de la cinétique atypique et du manque d'uniformité en matière d'interactions médicamenteuses observées avec les substrats des CYP3As (Korzekwa et coll., 1998; Kenworthy et coll., 2001).

1.2.7.3.1.6 Inducteurs des CYP3As humains

Les CYP3As sont des enzymes inductibles. Plusieurs molécules dont la rifampine, le phénobarbital et la dexaméthazone, ont la capacité d'induire ces enzymes *in vitro*

et/ou *in vivo* (Pelkonen et coll., 1998; Pascussi et coll., 2003). De plus, il est intéressant de constater que les gènes des CYP3As humains sont activés de façon différentielle par les benzimidazoles (ex : oméprazole, lansoprazole) et les extraits de millepertuis *in vitro* (Krusekopf et coll., 2003b). Selon cette étude, seul le CYP3A4 est induit en présence de ces molécules alors que l'expression du CYP3A5, du CYP3A7 et du CYP3A43 est diminuée ou demeure tout simplement inchangée.

1.2.7.4 Famille CYP4

Les membres de la sous-famille CYP4A sont les représentants les plus importants de cette famille. Chez le rat et l'homme, les membres de cette sous-famille sont exprimés principalement au niveau hépatique et rénal (Gonzalez, 1988). Ces enzymes catalysent l' ω -hydroxylation de l'acide laurique. Chez le rat, les CYP4As sont induits par les fibrates et d'autres agents capables d'induire une prolifération des péroxisomes hépatiques (Oinonen et Lindros, 1998). Il n'y a aucun inhibiteur connu de ces enzymes.

Tableau IV. Liste non-exhaustive de substrats, inhibiteurs et inducteurs des CYP3As humains utilisés en clinique.

Substrats			
Système nerveux central		Immuno-suppresseurs	Cardiovasculaire
Triazolam	Méthadone	Tacrolimus	Nifédipine et congénères
Midazolam	Zolpidem	Cyclosporine	Vérapamil
Buspirone	Sertraline	Sirolimus	Diltiazem
Trazodone	Citalopram		Quinidine
Alfentanil	Clozapine		Statines (ex : simvastatine)
Halopéridol	Diazépam		
Autres			
Sildenafil	Paclitaxel	Astémizole	Dapsone
Quinine	Tamoxifène	Terbinafine	Anti-rétroviraux (ex : indinavir)
Inhibiteurs			
Ketoconazole		Érythromycine	Vérapamil
Itraconazole		Clarithromycine	Diltiazem
Fluconazole		Néfazodone	Mibéfrasil
Anti-réoviraux		Jus de pamplemousse	
Inducteurs			
Rifampine		Névirapine	Millepertuis (Hyperforine)
Phénobarbital		Efavirenz	Oméprazole ?

D'après Flockhart, 2003.

1.3 FACTEURS MODULANT L'ACTIVITÉ DES CYPs CHEZ L'HOMME ET LE RAT

1.3.1 FACTEURS GÉNÉTIQUES

1.3.1.1 Polymorphisme génétique

Une partie importante de la variabilité inter-individuelle pharmacocinétique observée chez l'homme et le rat provient du polymorphisme génétique d'enzymes de biotransformation. À cet égard, l'expression polymorphique des CYPs conduit souvent à une réduction ou à une abolition complète de l'activité enzymatique et, à de très rares occasions, à une augmentation de celle-ci. Bien que le polymorphisme génétique ait été observé pour certains CYPs chez le rat, ce dernier a été beaucoup plus étudié chez l'homme (Tableau V).

1.3.1.2 Dichotomie sexuelle

Contrairement à l'homme, il existe une dichotomie sexuelle prédominante chez le rat. Ces différences entre mâles et femelles se manifestent principalement chez le rat adulte et sont prédéterminées de façon précoce par les gonades lors du développement (Morgan et coll., 1985). En effet, les hormones sexuelles entraîneraient une libération distincte de l'hormone de croissance (GH), qui à son tour conduirait à une expression des CYPs différente entre le mâle et la femelle (Waxman et coll., 1985; Hedlund et coll., 2001). Ceci explique pourquoi certains CYPs comme le CYP2A2, le CYP2C11 et le CYP3A2 sont spécifiques pour le rat mâle, alors que le CYP2C12 est spécifique pour le rat femelle (Tableau VI) (Waxman et coll., 1985).

Tableau V. Principaux cytochromes P450 humains polymorphiques.

CYP	Allèles majeurs	Conséquences	Fréquence allélique (%)	
			Caucasiens	Orientaux
2A6	CYP2A6*2	Enzyme inactive	1-3	0
	CYP2A6*4	Pas d'enzyme	1	15
	CYP2A6*5	Enzyme défectueuse	0	1
2C9	CYP2C9*2	↓ affinité CYP	8-13	0
	CYP2C9*3	réductase Altération de la spécificité de substrat	7-9	2-3
2C19	CYP2C19*2	Enzyme inactive	13	23-32
	CYP2C19*3	Enzyme inactive	0	6-10
2D6	CYP2D6*2xN	Activité augmentée	1-5	0-2
	CYP2D6*4	Enzyme inactive	12-21	1
	CYP2D6*5	Pas d'enzyme	4-6	6
	CYP2D6*10	Enzyme instable	4-6	50
	CYP2D6*17	↓ affinité pour le substrat	0	Africains, 34
3A5	CYP3A5*3	Pas d'enzyme	85-95	Afro- Américains, 43-70

D'après Ingelman-Sundberg, 2001 et Khuel et coll., 2001.

Tableau VI. CYPs sexuellement différenciés chez le rat.

Mâle		Femelle	
<i>CYP(s) Spécifique(s)</i>		<i>CYP(s) Spécifique(s)</i>	
CYP2A2	CYP3A2	CYP2C12	
CYP2C11	CYP3A18		
CYP2C13	CYP4A2		
CYP2C22			
<i>CYP(s) Dominant(s)</i>		<i>CYP(s) Dominant(s)</i>	
CYP2B1		CYP1A2	CYP2E1
CYP2B2		CYP2A1	CYP3A9
CYP3A1		CYP2C7	

D'après Oinonen et Lindros, 1998 et Hedlund et coll., 2001.

1.3.2 FACTEURS ÉPIGÉNÉTIQUES

Bien qu'il soit encore considéré comme étant la source majeure des réponses imprévisibles observées en clinique lors de traitements médicamenteux, le polymorphisme demeure une modification invariable que le patient possède dans son bagage génétique. Avec la connaissance des enzymes participant au métabolisme des médicaments et l'avènement de tests génétiques permettant l'évaluation du génotype, l'impact du polymorphisme sur la pharmacocinétique est de plus en plus prévisible (Ingelman-Sundberg et coll., 1999). En revanche, les facteurs épigénétiques sont difficiles à contrôler car ils sont variables dans le temps et la plupart du temps occasionnels. Ces facteurs incluent le développement, les modifications hormonales, la diète, l'exposition à des xénobiotiques (incluant les médicaments) et certains facteurs physiopathologiques (Morgan et coll., 1998).

1.3.2.1 Facteurs physiologiques: nutrition, hormones et âge

1.3.2.1.1 Facteurs nutritionnels

La diète peut avoir une influence importante sur l'expression de certains CYPs. Par exemple, le CYP3A4 intestinal est fortement inhibé en présence de jus de pamplemousse (Ameer et Weintraub, 1997). D'autres CYPs, comme les CYP1As, sont induits après la consommation de viande cuite sur charbon de bois ou la consommation de légumes comme le brocoli ou le chou-fleur (Rendic et Di Carlo, 1997). Chez le rat, une augmentation du contenu en lipides dans la diète peut entraîner une augmentation des niveaux hépatiques en CYP2B, 3A et 2A1 (Guengerich, 1995b; Ioannides, 1999). Enfin, à long terme, un régime riche en glucides peut conduire à une diminution de l'activité des CYPs autant chez l'homme que chez le rat (Guengerich, 1995b).

1.3.2.1.2 Facteurs liés au vieillissement

Chez l'homme et chez le rat, il existe des variations qualitatives et quantitatives des CYPs au cours du développement. Par exemple, chez l'homme, le CYP3A7 disparaît presque totalement à l'âge adulte, alors que le CYP3A4 est très faible à la naissance (de Wildt et coll., 1999). Le rat montre une diminution graduelle de ses fonctions métaboliques avec l'âge (Birbaum, 1993) alors qu'il n'y a pas ou peu de modifications de la concentration en CYPs liées au vieillissement chez l'homme.

1.3.2.1.3 Facteurs hormonaux

Il y a peu d'études évaluant l'effet de modifications hormonales sur les CYPs hépatiques humains. Des phénomènes physiologiques comme le cycle menstruel semble avoir peu d'impact sur le contenu en CYP1A2, 2C19 et 3A4 chez la femme (Zaigler et coll., 2000; Kim et coll., 2002). Chez le rat, les hormones telles que

l'insuline, le glucagon, les hormones thyroïdiennes, la GH et les glucocorticoïdes ont tous un impact sur les CYPs. Ainsi, l'expression des CYPs sera très variable selon la condition physiologique de l'animal et selon les concentrations relatives de ces enzymes.

1.3.2.2 Facteurs environnementaux et pharmaco-toxicologiques

Indépendamment de leur provenance, les xénobiotiques ont tous la capacité d'altérer le métabolisme et la pharmacocinétique des substrats des CYPs. Alors que certains agissent directement au niveau du site catalytique de l'enzyme, d'autres ont une action sur les voies de transcription ou sur les mécanismes posttranscriptionnels et posttraductionnels, modifiant le contenu enzymatique au niveau tissulaire. Un rappel a été ajouté à l'Annexe 1 de cette thèse dans le but de présenter les paramètres de cinétique enzymatique qui seront utilisés tout au cours de cette thèse.

1.3.2.2.1 Induction

L'induction enzymatique, comme tous phénomènes intervenant au niveau de la synthèse protéique, est un phénomène plus ou moins lent qui engendre principalement une modification de la vitesse maximale (V_{max}) de l'enzyme (augmentation dans ce cas particulier). La résultante est une augmentation de la clairance intrinsèque (CL_{int}). Il existe au moins trois mécanismes d'induction des CYPs: l'activation transcriptionnelle par l'entremise de récepteurs nucléaires, l'activation posttranscriptionnelle par stabilisation de l'ARN_m et enfin l'activation posttraductionnelle par inhibition des voies de dégradation des CYPs (Tableau VII).

Chez le rat et l'homme, l'induction du CYP1A1, tout comme celle du CYP1A2 et du CYP1B1 apparaît suite à la liaison de l'inducteur au récepteur hydrocarbure aromatique (Ah) (Gonzalez et Fernandez-Salguero, 1998; Whitlock, Jr., 1999; Ma, 2001). Jusqu'à tout récemment, les chercheurs s'entendaient pour dire que seuls les

CYP1As étaient induit par l'entremise de récepteur nucléaire. Cependant, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, il est maintenant reconnu que l'induction des CYP2Bs et des CYP3As requiert, la plupart du temps, la participation de récepteurs hormonaux nucléaires orphelins tels que le « constitutive androstane receptor » (CAR), le « pregnane-X-receptor » (PXR) et le « peroxisome proliferator activation receptor » (PPAR) (Tableau VII) (Waxman, 1999; Ronis et Ingelman-Sundberg, 1999; Maglich et coll., 2003; Moore et coll., 2003). Tous ces récepteurs nucléaires nécessitent la participation d'un partenaire nucléaire auquel ils se coupleront afin de pouvoir agir à titre d'effecteur au niveau gène. Par exemple, le PPAR α , le PXR et le CAR se lient au « retinoid-X-receptor » RXR (Waxman, 1999; Yoshinari et coll., 2001).

D'un autre côté, le mécanisme d'induction causé par l'éthanol et les cétones semble médié par un mécanisme ne requérant pas de récepteurs nucléaires (Tableau VII). En effet, la régulation du CYP2E1 se ferait principalement par voie posttranscriptionnelle et au niveau traductionnel (Ronis et Ingelman-Sundberg, 1999). De plus, l'induction des CYP3A1/2 par la troléandomycine et le clomitrazole serait aussi le résultat d'une stabilisation posttranscriptionnelle et posttraductionnel (Guengerich, 1999; Hedlund et coll., 2001). Ce phénomène subviendrait suite à l'inhibition des mécanismes de dégradation de la protéine ou de l'ARN_m.

1.3.2.2.2 Inhibition

L'inhibition enzymatique est un phénomène rapide qui se produit la plupart du temps au site d'action de l'enzyme. Les mécanismes d'inhibition sont divers, allant de réversibles à mixtes, à quasi-irréversibles ou à irréversibles (inhibiteurs de type « mechanism-based ») (Tableau VIII) (Lin et Lu, 1998). Alors que le premier mécanisme entraîne une augmentation de la constante de Michaelis-Mentens (K_m) les deux autres, qui nécessitent l'exposition préalable de l'inhibiteur à l'enzyme,

entraînent une chute du V_{\max} , en diminuant le nombre d'enzymes disponibles. La résultante est donc une diminution de la CL_{int} .

Tableau VII. Mécanismes d'induction des CYPs.

Inducteur(s)	Récepteur nucléaire	Mécanisme	CYP H: humain; R: rat
Hydrocarbures aromatiques	AhR	Activation transcriptionnelle	H: 1A1, 1A2, 1B1 R: 1A1, 1A2, 1B1
Phénobarbital	CAR	Activation transcriptionnelle	H: 2B6, (3A4, 2C) R: 2B1/2
PCN Dexaméthazone (Haute dose) Rifampine	PXR	Activation transcriptionnelle	H: 3A, 2B6 R: 3A, 2B
Clofibrate	PPAR α	Activation transcriptionnelle	H,R : 4A
Éthanol	Aucun	Stabilisation enzymatique	H,R: 2E1
Clomitrazole Troléandomycine	Aucun	et/ou de l'ARN $_m$	R: 3A1/2

D'après Fuhr, 2000 et Donato et Castell, 2003.

Tableau VIII. Mécanisme d'inhibition des CYPs .

Type d'inhibition	Mécanisme		Inhibiteur type
Réversible compétitive ou mixte	<i>Compétition avec le substrat au site actif</i>	Interaction avec la protéine	S-méphénytoïne
		Liaison à l'atome de fer	Cyanure, monoxyde de carbone et d'azote
		Liaison de coordination à l'atome de fer et interaction avec la protéine	Kétoconazole Sulphaphénazole
Quasi- irréversible (plus rare)		Incapacité du substrat à atteindre le site actif. La molécule est un substrat de l'enzyme	Troléandomycine Orphénadrine Gestodène
Irréversible	<i>Formation d'un métabolite réactif qui forme une liaison covalente avec des acides aminés de la protéine</i>	Inactivation de l'enzyme. La molécule est un substrat de l'enzyme	Troléandomycine Furafylline Gestodène Oléfines OH-bergamotine Péroxydes Péroxynitrites

D'après Lin et Lu, 1998.

1.3.2.3 Facteurs physiopathologiques

Plusieurs pathologies peuvent avoir un impact sur le contenu en CYPs chez l'homme et le rat. Par exemple, chez le rat, l'administration de streptozotocine entraîne un état semblable à celui observé chez les patients souffrant de diabète de type I. Chez le rat, cet état pathologique provoque une augmentation du contenu hépatique en CYP1A2, CYP2A1, CYP2B1, CYP2C7, CYP2E1 et CYP4A (Cheng et Morgan, 2001).

Des altérations physiopathologiques sont aussi observées chez l'homme. Chez le patient présentant une cirrhose biliaire (insuffisance hépatique), le contenu hépatique en CYP2C, CYP3A et CYP1A est diminué alors que celui en CYP2E1 demeure inchangé (Bastien et coll., 2000). Dans un modèle d'insuffisance rénale chronique, le contenu en CYPs totaux était aussi diminué chez le rat (Leblond et coll., 2001). Par exemple, chez les patients insuffisants cardiaques, le contenu hépatique en CYP2C19 et le CYP1A2 est diminué de façon significative (Frye et coll., 2002). Chez l'homme obèse, l'activité liée au CYP3A4 est réduite alors que celle associée au CYP2E1 est augmentée (Cheng et Morgan, 2001).

Enfin, il est reconnu que l'inflammation peut avoir un impact sur l'activité et le contenu en CYPs *in vivo* et *in vitro* chez le rat et l'homme (Morgan, 1997). Ceci fera l'objet de la section III de ce chapitre.

1.4 IMPACT DE LA MODIFICATION DE L'ACTIVITÉ DES CYPs SUR LA PHARMACOLOGIE DES MÉDICAMENTS CHEZ L'HOMME ET LE RAT

Chez l'homme ou le rat, la variabilité de réponse aux médicaments peut être de nature pharmacodynamique. À titre d'exemples, mentionnons les phénomènes de tolérance observés avec certains médicaments comme les β -bloqueurs (Nebert et Weber, 1990). Dans la plupart des cas, cependant, l'origine de ces variations est essentiellement pharmacocinétique. En effet, des modifications de l'élimination, de la biodisponibilité ou de la distribution peuvent conduire à des altérations des concentrations plasmatiques et ainsi influencer à la fois l'intensité, la durée et la rapidité de l'effet pharmacologique (Figure 4). De par leur localisation privilégiée, les CYPs jouent un rôle important dans le métabolisme, l'élimination ou même l'activation des médicaments. Indépendamment de leur mode de fonctionnement, les

facteurs qui modulent l'activité des CYPs affecteront leurs propriétés enzymatiques (V_{\max} et/ou K_m) et du même coup les propriétés pharmacocinétiques de leur substrat.

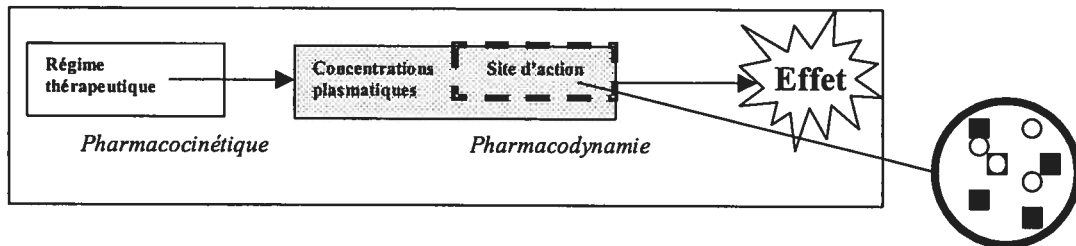


Figure 4. Représentation simplifiée de la relation entre le régime thérapeutique, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie.

2 L'INFLAMMATION ET LA DOULEUR INFLAMMATOIRE

2.1 DÉFINITIONS

L'inflammation est un processus caractéristique des tissus vascularisés au cours duquel le plasma et les leucocytes du sang s'accumulent au site d'une lésion dans le but de circonscrire son étendue, d'éliminer l'agent causal et les cellules détruites et, enfin, de participer au processus de réparation (Cotran et coll., 1999). La réaction inflammatoire est responsable du maintien des fonctions vitales et du contrôle des mécanismes de défense de l'hôte au cours de cette période de stress. Elle est classiquement divisée en deux formes : aiguë et chronique (Moshage, 1997).

L'inflammation aiguë est une réponse non spécifique et stéréotypée. Elle peut durer de quelques minutes à quelques jours. L'inflammation chronique est, quant à elle, moins uniforme et fait largement appel à des mécanismes plus spécifiques de défense comme l'immunité cellulaire. La réaction inflammatoire chronique peut durer des semaines, voire des mois ou des années (Cotran et coll., 1999). Les manifestations cliniques de la réaction inflammatoire aiguë ou chronique peuvent être locales (vasodilatation locale, exsudation plasmatique et afflux local de cellules inflammatoires) ou systémiques (signes généraux comme la fièvre, production hépatique des protéines de la phase aiguë). Le résultat de la réaction inflammatoire est, de façon générale, bénéfique pour l'hôte. En revanche, celle-ci devient problématique lorsqu'elle détruit davantage de tissu que l'agent agresseur ne le ferait, ou bien lorsqu'elle est déclenchée inutilement, sans agression extérieure, suite à une altération de ces mécanismes de régulation. C'est le cas, par exemple, des maladies inflammatoires dégénératives telles que l'arthrite rhumatoïde.

2.2 LA RÉACTION INFLAMMATOIRE LOCALE

2.2.1 LA PHASE D'INITIATION (OU VASCULO-PLASMATIQUE)

La réponse inflammatoire locale est caractérisée par une séquence d'événements complexes (Salmon et Emery, 1991; Cotran et coll., 1999). Quatre signes cliniques cardinaux caractérisent la réaction inflammatoire locale : rougeur (érythème), œdème (tumor), chaleur et douleur. Elle débute par une phase d'initiation qui fait suite à l'agression d'origine exogène (plaie, brûlure, agents chimiques, agents infectieux) ou endogène. Cette phase implique la mise en place et l'activation d'effecteurs primaires (cellules endothéliales et médiateurs plasmatiques) qui dépendent principalement de la nature du facteur déclenchant. Parmi ceux-ci, notons :

- Les plaquettes (adhésion, agrégation, dégranulation, médiateurs)
- Les éléments du système de contact et libération des kinines (médiateurs vasoactifs et nociceptifs)
- Les cellules endothéliales (molécules de surface, médiateurs)
- Les systèmes de la coagulation (formation de caillot de fibrine).
- La fibrinolyse (dissolution du caillot et production de plasmine qui conduit à l'activation du complément)

En favorisant la libération de facteurs vasoactifs (vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, œdème par exsudation plasmatique), de facteurs chimiotactiques et l'expression de molécules d'adhérence à la surface de l'endothélium des capillaires, cette étape permet l'entrée et le recrutement des cellules inflammatoires circulantes au site affecté.

2.2.2 LA PHASE D'AMPLIFICATION (OU CELLULAIRE)

Suite à l'étape d'initiation, la réaction inflammatoire se développe avec la migration et l'implantation (mobilisation, margination, diapédèse) de différents types de cellules au sein du site d'inflammation. Ce phénomène est possible grâce à l'action concertée de facteurs chimiotactiques et de molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules sanguines circulantes et sur les autres surfaces de contact (endothélium vasculaire et matrice extracellulaire). Les cellules recrutées (neutrophiles, éosinophiles, macrophages/monocytes, lymphocytes) ou déjà présentes (mastocytes) sont sensibles aux nombreux messages que leur transmettent leur environnement et répondent à ces messages grâce à l'expression constitutive ou induite d'une multitude de récepteurs de surface. Elles interagissent localement avec différents médiateurs libérés au site inflammatoire (cytokines, chémokines, facteurs du complément, médiateurs lipidiques).

L'intégration et le décodage de ces signaux chimiques, caractéristiques de la phase d'amplification, conduisent à la survie, à l'apoptose ou à la nécrose cellulaire; à la phagocytose de micro-organismes, de débris cellulaires ou à la sécrétion de produits préformés tels que des protéases et des agents toxiques comme les radicaux libres. L'activation des cellules recrutées entraîne aussi la production de chémokines et de cytokines proinflammatoires. Celles-ci, par leurs actions autocrines ou paracrines, favorisent le maintien et l'amplification de la réponse inflammatoire.

2.2.3 LA PHASE DE RÉOLUTION ET DE RÉPARATION

Enfin, une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé suit la phase d'amplification. La réponse inflammatoire est limitée dans le temps grâce à la mise en jeu de systèmes de contrôle de la phase d'amplification (cytokines antiinflammatoires, récepteurs solubles de cytokines, anti-protéases, anti-radicaux libres). L'action complémentaire de cellules (macrophages, fibroblastes) et

de nouveaux médiateurs (facteurs de croissance, cytokines antiinflammatoires) participe au remodelage du tissu et à sa néovascularisation. La nature du facteur déclenchant et l'efficacité des systèmes de contrôle et de réparation détermineront l'évolution du processus inflammatoire.

Ces événements mettent en jeu différents systèmes d'adaptation et impliquent de multiples médiateurs. La nature du développement de chacune de ces trois phases et la nature des effecteurs primaires et secondaires impliqués (cellules résidentes et recrutées; médiateurs préformés et néoformés) conditionnent le profil d'expression clinique et biologique de la réponse inflammatoire (aiguë ou chronique, locale ou systémique, protectrice ou délétère).

2.3 LA RÉACTION INFLAMMATOIRE SYSTÉMIQUE

L'activation des monocytes/macrophages et des cellules non inflammatoires peut aussi contribuer à la mise en place de la réaction systémique en favorisant la production de médiateurs inflammatoires (Emery et Salmon, 1991). Les médiateurs libérés (ex : interleukine (IL)-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)) se distribuent dans l'organisme en empruntant la circulation sanguine par laquelle ils peuvent atteindre leurs récepteurs présents au niveau des tissus (foie, cerveau) ou des cellules cibles où ils moduleront l'expression de certains gènes (Fey et Fuller, 1987; Baumann et Gauldie, 1994). L'activation de ces derniers peut se manifester par de la fièvre, de l'hyperleucocytose, des modifications endocriniennes associées à la hausse des concentrations plasmatiques en ACTH, cortisol, adrénaline et autres, un changement du métabolisme des lipides et des glucides, une augmentation du catabolisme des protéines (au niveau musculaire), un transfert d'acides aminés des muscles au foie et par la modification du profil des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (PPAs) (Emery et Salmon, 1991; Moshage, 1997).

2.3.1 LES PROTÉINES DE LA PHASE AIGUË DE L'INFLAMMATION

Le foie, l'une des principales cibles des médiateurs inflammatoires répond à une variété de facteurs, ce qui se traduit, entre autres, par la synthèse d'une multitude de protéines plasmatiques (ex: α -1-glycoprotéine (AGP)) appelées collectivement les PPA positives (PPA(+)) (Baumann et Gauldie, 1994; Moshage, 1997). Elles remplissent des fonctions variées comme la neutralisation des protéases lysosomiques, la captation de déchets cellulaires plus ou moins toxiques (ion superoxyde, cholestérol, fer), la participation au contrôle de la réaction inflammatoire et la favorisation de la cicatrisation (Doré, 1994).

Les PPA(+)*s* peuvent être séparées en deux classes selon les médiateurs favorisant leur synthèse (Baumann et Gauldie, 1994; Moshage, 1997). Les PPA(+)*s* de type I incluent l'AGP, les facteurs du complément, l'amyloïde sérique de type A, la protéine C-réactive (humain), l'haptoglobine (rat) et les hémoplexines alors que les PPA(+)*s* de type II incluent les trois chaînes du fibrinogène, l'haptoglobine (humain), l' α 1-antichymotrypsine, l' α 1-antitrypsine, l' α 2-antiplasmine et l' α 2-macroglobuline (rat).

Bien que le rôle de l'AGP ne soit pas complètement défini, elle se distingue par ses propriétés antithrombiques (Moshage, 1997) et certains effets immunomodulateurs (Moshage, 1997; Fournier et coll., 2000). L'AGP s'avère d'ailleurs un marqueur de choix en clinique pour suivre l'évolution de certaines maladies inflammatoires et évaluer la progression de leurs traitements (Doré, 1994). Grâce à son caractère acide, elle se lie de façon préférentielle aux médicaments basiques (MacKichan, 1984; Israili et Dayton, 2001). En condition normale, la concentration d'AGP (0,5-1,5 g/L) est de 30 fois inférieure à celle de l'albumine chez l'homme (Ciba-Geigy, 1984). Ainsi, sa capacité de liaison est faible. Cependant, dans le cas d'une atteinte inflammatoire, ses niveaux plasmatiques augmentent avec l'intensité des dommages observés (Piafsky et coll., 1978). Dans cette situation, la liaison à l'AGP peut devenir

aussi importante que celle à l'albumine pour les médicaments s'y liant de façon préférentielle.

En revanche, les concentrations plasmatiques d'autres protéines sont diminuées lors de l'inflammation, d'où leur désignation de PPA_s négatives (PPA(-)_s). Ceci s'explique principalement par une biosynthèse diminuée ou qui ne compense pas leur dégradation ou leur transfert vers la zone inflammée (Ramadori et Christ, 1999); c'est le cas, notamment, de l'albumine et de la transferrine (Jusko et Gretch, 1976 ; Cavaillon, 1993). La diminution de leur production favoriserait, entre autre, le maintien de la pression oncotique. De surcroît, certaines études animales *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la synthèse hépatique d'albumine peut aussi être diminuée dans le but de permettre au foie de déployer la machinerie transcriptionnelle nécessaire à la synthèse des PPA(+)_s (Ramadori et Christ, 1999).

2.4 LES MÉDIATEURS INFLAMMATOIRES

Les médiateurs inflammatoires jouent un rôle important à chacune des étapes de la réponse inflammatoire (initiation, amplification, entretien ou résolution, réparation). Ils sont présents dans le plasma à titre de précurseurs (ex : enzymes inactives) et dans plusieurs types de cellules (ex : leucocytes, plaquettes, cellules endothéliales et mastocytes) où ils sont séquestrés à l'intérieur de vésicules (préformés) ou synthétisés *de novo* (néoformés).

Les médiateurs préformés, rapidement disponibles, peuvent être activés dans le plasma ou être libérés en totalité par les cellules ou les plaquettes après stimulation. Ils apportent un effet rapide et immédiat. À titre d'exemple, citons les amines vasoactives et chimiotactiques (ex : histamine, sérotonine) et les protéases à sérines plasmatiques [ex : protéases du complément, protéase de la voie des kinines (kallicroïne) et les facteurs de la coagulation (ex : plasmine, Facteur XII)]. Pour leur part, les métalloprotéases (ex : MMP) ou les protéases à sérine cellulaires (ex :

élastase) interviennent un peu plus tard dans le processus (Cotran et coll., 1999). Certaines sont plutôt néoformées, dans les cellules ou le plasma, après stimulation directe par le stimulus inflammatoire ou par un effecteur primaire ou secondaire (ex : kinines, cytokines, médiateurs lipidiques, le « platelet activating factor », les prostaglandines, les thromboxanes et les radicaux libres oxygénés ou nitrés) (Cotran et coll., 1999). La présente section insistera principalement sur certaines cytokines pro-inflammatoires et le monoxyde d'azote.

2.4.1 LES CYTOKINES

Il y a plusieurs classes de cytokines incluant les chémokines, les interleukines (IL), les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et les interférons (IFN). Les monocytes/macrophages sont les sources majeures de ces cytokines mais d'autres cellules peuvent également participer à leur production (les neutrophiles, les mastocytes, les cellules endothéliales). Ces cellules sont à la fois des émetteurs et des récepteurs de signaux dépendant des chémokines et des cytokines.

Les cytokines et les chémokines ont la possibilité d'agir sur la croissance, la différenciation, la migration et l'activation des cellules inflammatoires. Ces effets peuvent s'exercer à proximité du site inflammatoire (action autocrine ou paracrine = réaction inflammatoire locale) ou à distance (action endocrine = fièvre, production hépatique des PPA(+)^s). Pour une cellule donnée, une boucle autocrine d'activation peut s'ajouter aux effets paracrines des médiateurs libérés par les cellules voisines recrutées et/ou activées. Les capacités de redondance, de pléiotropisme et d'actions en cascade expliquent les effets multiples de ces médiateurs (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1993; Cavaillon, 1993).

De façon générale, les cytokines possèdent des propriétés à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Dinarello, 1997b; Kulmatycki et Jamali, 2001). À cause de

leur rôle dans la mise en place des effets locaux et systémiques de l'inflammation, seuls les aspects concernant les IL-1s, l'IL-6 et le TNF- α seront discutés.

2.4.1.1 Le TNF- α et l'IL-1 β

Le TNF- α est une cytokine puissante qui exerce divers effets en stimulant une variété de cellules (Bazzoni et Beutler, 1996). Les précurseurs membranaires et cytoplasmiques du TNF- α possèdent déjà des propriétés pro-inflammatoires, mais la forme sécrétée, plus puissante, exerce la majeure partie des effets autocrines et paracrines (Decoster et coll., 1995). Le TNF- α mature est une protéine soluble d'environ 17 kD composée de trois sous-unités identiques. Cette protéine est principalement produite par les monocytes/macrophages en réponse à un stress inflammatoire/infectieux, mais aussi par les lymphocytes, les cellules de Kupffer, les mastocytes et les fibroblastes (Vilcek et Lee, 1991). Le TNF- α se lie à deux types de récepteurs, le p55 et le p75, qui font partie d'une même famille de récepteurs de surface de type immunoglobuline (Bazzoni et Beutler, 1996). Il contribue entre autres à la phase d'initiation de l'inflammation en stimulant l'expression des molécules d'adhésion à la surface des fibroblastes (Le et Vilcek, 1987; Cavaillon, 1993).

Tout comme pour le TNF- α , les macrophages/monocytes sont les principaux producteurs d'IL-1s. Ces cytokines sont aussi produites par les cellules endothéliales, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés (Dinarello, 2000). Les IL-1s sont des agents chimiotactiques pour les monocytes et les neutrophiles. Les IL-1s sont tout d'abord synthétisées sous forme d'un précurseur cytoplasmique (30 kD) qui, lorsque scindé, libère l'IL-1 α ou l'IL-1 β (14-15 kD) (March et coll., 1985). Tant que les cellules restent intactes, l'IL-1 α mature reste intracellulaire alors que l'IL-1 β est sécrétée. Les deux IL-1s agissent sur les mêmes récepteurs et ont essentiellement le même profil pharmacologique (Dinarello, 1997a). Ces récepteurs de type I (80 kD) et type II (60-68kD) font partie d'une famille de récepteurs de surface de type

immunoglobuline (Dinarello, 1992). Seuls les récepteurs de type I sont capables de transmettre des signaux cellulaires (Oldenburg et coll., 1995).

Les gènes codant pour le TNF- α et les IL-1s sont activés par les mêmes signaux (Dinarello, 1997b). Le TNF- α et les IL-1s agissent sur les cellules de façon synergique et favorisent la sécrétion de cytokines de phase II comme l'IL-6 (Vanden Berghe et coll., 2000). Que ce soit via une stimulation directe ou non, ces cytokines sont responsables, entre autres, de la formation de médiateurs lipidiques et de la libération de métalloprotéases et de radicaux libres (Dinarello, 2000; Choy et Panayi, 2001). Le TNF- α et les IL-1s jouent un rôle central dans les processus inflammatoires locaux et systémiques. Ils sont responsables, entre autres, de la fièvre, de la fatigue, de l'inappétence, de l'adhésion intercellulaire et de la migration des cellules immunitaires, de la production des PPA(+), d'enzymes protéolytiques et de l'angiogénèse (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1993; Baumann et Gauldie, 1994).

2.4.1.2 L'IL-6

Sous l'influence de l'IL-1 β et du TNF α , de certains virus ou de LPS, l'IL-6 est produite par un grand nombre de cellules (Vanden Berghe et coll., 2000). Ceci inclut les monocytes/macrophages et les lymphocytes T, mais aussi des cellules non immunitaires comme les fibroblastes et les cellules endothéliales (Wong et coll., 1988; Van Snick, 1990). L'IL-6 est une protéine glycosylée de 22 à 27 kDa qui se lie à un récepteur (IL-6R) composé d'une sous-unité IL-6Ra et de deux sous-unités β gp-130. Ensemble, ils constituent le complexe actif ligand-récepteur (Van Snick, 1990; Kishimoto et coll., 1995; Hirano, 1998). L'IL-6 est le principal inducteur de la synthèse des PPA(+), (Cavaillon et Haeffner-Cavaillon, 1993). L'IL-6, reconnue comme étant un faible stimulateur de production des cytokines, favorise la production de l'ACTH et, le cas échéant, de glucocorticoïdes (Wong et Clark, 1988). L'IL-6 est

un agent pyrogène qui, de pair avec l'IL-1 β et le TNF- α , altère le centre de la thermorégulation corporelle (Luheshi et coll., 1997).

2.4.1.3 Voie de signalisation des récepteurs de cytokines

Puisqu'une discussion détaillée des voies de signalisation des cytokines n'est pas l'objet principal de cette thèse, un résumé simplifié insistant sur les événements clés de celles-ci sera présenté dans cette section. Il facilitera la compréhension des autres sections et de la discussion.

L'activation des récepteurs associés aux IL-1s ou au TNF- α initie la conversion de la sphingomyéline membranaire en céramide via la sphingomyélinase (Kishimoto et coll., 1994; Kolesnick et Golde, 1994; Dinarello, 1997a). Par la suite, les protéines kinases activées par ce phénomène empruntent plusieurs voies de signalisation conduisant ultimement à l'activation et à la translocation nucléaire du facteur AP-1 (activating protein-1; hétérodimère c-jun/c-fos) et du facteur nucléaire NF- κ B. Le NF- κ B est activé et translocalisé au noyau après phosphorylation et dégradation de la sous-unité inhibitrice I κ B. Les IL-1s activent aussi la voie des « mitogen activated kinases » (MAP)-kinase et, ultimement, le facteur de transcription « CCAAT/Enhancer Binding Protein β » (NF-IL-6 ou C/EBP β). À titre d'exemple, plusieurs gènes associés aux PPA de type I contiennent des éléments de réponse à NF- κ B, AP-1 et NF-IL-6 au niveau de leur promoteur (Kishimoto et coll., 1994; Kolesnick et Golde, 1994; Dinarello, 1997a).

L'activation du complexe de récepteurs-IL-6 (IL-6R) stimule les tyrosines kinases de type « janus activating kinase » (JAK) (Wegenka et coll., 1993; Kishimoto et coll., 1994; Hirano, 1998). Subséquemment, ces protéines kinases activées phosphorylent des résidus tyrosine présents sur des protéines de type « signal transducers and activators of transcription » (STAT). Ceci conduit à leur homo et hétérodimérisation

et leur translocation nucléaire. Tout comme les IL-1s, la formation du complexe IL-6R active aussi la voie des MAP-kinases. Cette voie relie donc les voies effectrices des récepteurs des IL-1s et de l'IL-6. À titre d'exemple, plusieurs gènes associés aux PPA de type II contiennent des éléments de réponse aux dimères STATs et à NF-IL-6 au niveau de leur promoteur (Hirano, 1998).

2.4.2 LE MONOXYDE D'AZOTE (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est un composé inorganique et gazeux dont les fonctions prédominantes sont celles d'un messenger et d'une molécule effectrice (Singh et Evans, 1997). Chez les mammifères, le NO est synthétisé par une famille d'enzymes désignées sous le nom de « nitric oxyde synthase » (NOS). Sa biosynthèse est catalysée par un des trois isoformes NOS: NOSI (NOS neurone ou nNOS), NOSIII (NOS endothéliale ou eNOS) ou NOSII (NOS inductible ou iNOS) (Knowles, 1996). La forme induite est directement impliquée dans les phénomènes inflammatoires et son activité est indépendante du calcium.

Le iNOS est présente dans plusieurs types de cellules et de tissus comme les macrophages, les chondrocytes, les cellules de Kupffer, les hépatocytes et les neutrophiles (Stuehr et Griffith, 1992). Le iNOS est induit en réponse à une variété importante de stimuli, principalement les endotoxines (ex : LPS) et les médiateurs proinflammatoires endogènes (Abramson et coll., 2001). La résistance aux bactéries ou aux parasites est souvent attribuable à cette synthèse massive de NO formé grâce à l'induction du iNOS par ces médiateurs (ex: IL-1, TNF- α , LPS) (MacMicking et coll., 1997). Très réactif, le NO réagit avec l'oxygène ou avec des intermédiaires réactifs de l'oxygène pour générer plusieurs intermédiaires azotés ou oxygénés à caractère très oxydant. Ceci explique la plupart des effets toxiques attribuables au NO lors de l'oxydation, la nitrosation et la nitration désignées, respectivement, sous le nom de stress oxydatif, nitrosatif et nitratif (MacMicking et coll., 1997). En fonction de l'étendue de ces réactions et de leur contrôle, leurs effets pourront être bénéfiques

ou délétères. Lorsque produit en faible quantité, le NO agit principalement comme messager et antioxydant (Liaudet et coll., 2000). La toxicité du NO provient principalement de la quantité importante formée et de la présence d'espèces réactives formées à partir de l'oxygène (ex: peroxydes, anion superoxyde). Les quantités de NO formées suite à l'activation du iNOS sont suffisamment importantes pour pouvoir être mesurées indirectement par la formation de produits de dégradation comme les nitrates et les nitrites.

Parmi les médiateurs endogènes stimulant la production de NO, on compte les cytokines proinflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IFN- γ (MacMicking et coll., 1997; Bingham, III, 2002). Ces derniers activent aussi l'expression génique de iNOS. Bien que d'autres voies de signalisation puissent être impliquées, l'augmentation de la transcription du iNOS se produit principalement par les voies de signalisation des cytokines se liant aux récepteurs des IL-1s et du TNF- α .

2.5 MODÈLES D'INFLAMMATION

2.5.1 MODÈLES DE RÉACTION INFLAMMATOIRE LOCALE AIGÜE ET CHRONIQUE

Chez l'animal, l'administration sous-cutanée d'agents irritants « stériles » provoque une réaction inflammatoire locale soutenue pouvant évoluer vers un état inflammatoire aigu. À ce titre, l'injection sous-cutanée de térébenthine représente un modèle classique d'inflammation locale avec répercussions systémiques. Suite à son administration chez le lapin, une lésion tissulaire locale caractéristique s'installe et évolue en l'espace de 24 à 48 heures, vers des manifestations systémiques telles que la présence des PPA(+)*s* (Bleau et coll., 2000). Bien que l'IL-1 β et le TNF- α puissent être détectés dans le plasma ou le sérum suite à l'administration de térébenthine à des

rats, les niveaux plasmatiques d'IL-6 sont en général plus élevés que ces deux cytokines (Luheshi et coll., 1997).

Chez l'homme, une des conséquences majeures des désordres inflammatoires est la mise en place de conditions inflammatoires chroniques comme l'arthrite. Chez le rat, l'injection intra-plantaire ou intra-articulaire d'Adjuvant Complet de Freund (ACF), une préparation huileuse contenant des fragments de mycobactéries (*M. butyricum* ou *M. tuberculosis*) inactivés par la chaleur, entraîne une réaction inflammatoire locale soutenue pouvant évoluer, en l'espace de deux semaines, vers un état inflammatoire chronique ressemblant à celui observé chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Carlson et Jacobson, 1999). Ce modèle, longtemps utilisé pour caractériser le mode d'action de certains agents anti-inflammatoires ou anti-rhumatoïdes, présente aussi des niveaux importants de cytokines et de chémokines dans la circulation (Szekanecz et coll., 2000), des répercussions systémiques comme la présence des PPA ou des signes cliniques comme l'augmentation de la vitesse de sédimentation des plaquettes (Lewis et coll., 1998b).

2.5.2 MODÈLES DE RÉACTION INFLAMMATOIRE SYSTÉMIQUE

L'exemple le plus représentatif d'une réaction inflammatoire systémique est probablement celle causée par l'administration d'un stimulus infectieux comme l'endotoxine d'*Escherichia coli* (mieux connue sous le nom LPS) à des animaux. Le LPS stimule directement les cellules comme les monocytes/macrophages présents au niveau sanguin et dans les tissus bien vascularisés. Cette activation cellulaire est le résultat, entre autres, de la formation du complexe LPS-LBP (LBP pour « LPS binding protein ») (Schumann et Zweigner, 1999). Le LBP est un récepteur exprimé à la surface des monocytes et des cellules de Kupffer, mais on le retrouve aussi au niveau de cellules non immunitaires comme les hépatocytes. L'interaction entre le récepteur et son ligand aboutit à la synthèse massive de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β et TNF- α et déclenche une multitude de mécanismes adaptatifs. Le

TNF α et l'IL-1 β stimulent leur propre libération, celle de l'IL-6, de l'INF- γ et activent une quantité impressionnante d'enzymes et de synthétases provenant des cellules inflammatoires ou environnantes.

Dans ces circonstances, la réaction peut évoluer vers une réponse inflammatoire généralisée sévère. Elle se traduit par de la fièvre importante, une production massive de PPA(+)*s* et peut conduire à des manifestations systémiques graves menant au choc septique (Ramadori et Christ, 1999). Le LPS a aussi la capacité d'activer directement les cellules de Kupffer présentes dans le foie et une réaction inflammatoire « locale » est observée au voisinage des hépatocytes, ce qui n'est pas le cas lors d'une inflammation locale à un site éloigné du foie. En raison de la redondance d'effets des cytokines et de la quantité massive de médiateurs présents, la présence de l'IL-6 n'est pas indispensable à la production de PPA(+)*s* dans ce modèle (Morgan, 1997).

2.6 MANIFESTATION CLINIQUE ASSOCIÉE À L'INFLAMMATION : LA DOULEUR

2.6.1 DÉFINITIONS ET TYPES DE DOULEUR

Plusieurs processus sont associés à la douleur : la nociception, la perception de la douleur et une multitude de conséquences secondaires telles que la souffrance, l'anxiété ou même la dépression (Loeser et Melzack, 1999). La nociception peut être définie comme étant la détection d'un stimulus nocif par l'organisme et la transmission subséquente de l'information encodée vers le cerveau; elle n'enclenche pas nécessairement de la douleur (Julius et Basbaum, 2001). La douleur est représentée par le processus de perception qui survient en réponse à la nociception. De façon générale, la douleur est séparée en trois grandes catégories: la douleur aiguë, la douleur chronique et la douleur intermittente (Ashburn et Staats, 1999). Les origines de la douleur chronique sont multiples, pouvant être inflammatoires, neuropathiques ou cancéreuses. La douleur chronique est habituellement déclenchée

par une blessure ou un état pathologique mais peut également être perpétuée par des facteurs autres que ceux qui la causent.

2.6.2 PHYSIOLOGIE DE LA DOULEUR

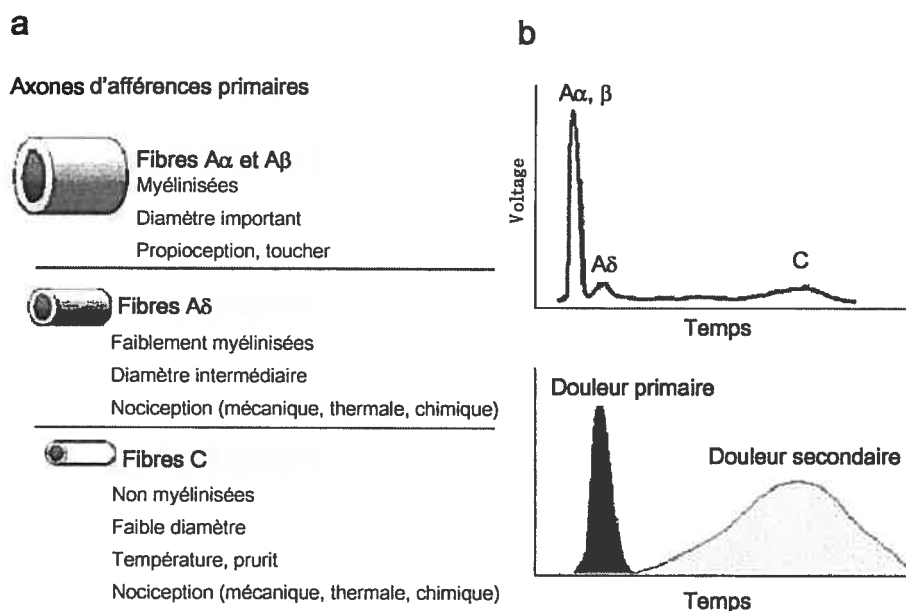
La douleur aiguë représente une réponse physiologique normale qui a pour fonction de protéger l'organisme afin d'éviter des lésions tissulaires (Hunt et Mantyh, 2001). Habituellement, les signes et symptômes émanant de tissus normaux exposés à un stimulus de haute intensité reflètent bien l'intensité, la localisation et la synchronisation du stimulus initial.

Les tissus cutanés ou somatiques profonds sont innervés par des neurones afférents primaires qui synapsent avec des neurones de second ordre dans la corne dorsale de la moelle épinière. Anatomiquement, il y a deux grands groupes de fibres sensorielles : les fibres C non-myélinisées de faible diamètre et les fibres A myélinisées (Basbaum et Jessell, 2000). Ces dernières peuvent à leur tour être divisées en deux sous-populations qui répondent ou non à une stimulation nocive (Snider et McMahon, 1998). Les fibres de fort diamètre ($A\alpha$ et $A\beta$) sont impliquées principalement dans la détection de stimuli non nocifs (toucher, proprioception) alors qu'une bonne partie des fibres de faible diamètre ($A\delta$ faiblement myélinisées et C) sont nociceptives (Schaible et Grubb, 1993). De façon traditionnelle, les fibres $A\delta$ sont associées à la transmission de la douleur vive et aiguë alors que les fibres C évoquent plutôt une réponse faible, retardée et diffuse (Figure 5) (Basbaum et Jessell, 2000).

Par l'entremise de leurs terminaisons nerveuses libres, les fibres exprimant les nocicepteurs répondent à une variété de stimuli nocifs intenses (thermiques, chimiques ou mécaniques) et diffèrent de celles exprimant des récepteurs détectant des stimuli inoffensifs de faible intensité (ex : fibres $A\beta$) sur plusieurs aspects (Julius et Basbaum, 2001). Par exemple, les fibres nociceptives répondent aux stimuli de façon peu spécifique [polymodale (surtout les fibres C) ou non] avec un degré

variable de sensibilité alors que les fibres $A\beta$ sont très sensibles, spécifiques et s'adaptent rapidement à l'intensité du stimulus (Cesare et McNaughton, 1997).

Les afférences terminales des fibres sensorielles convertissent les stimuli nocifs en activité électrique. Les potentiels d'action qui en résultent sont conduits jusqu'à la corne dorsale de la moelle épinière où l'information est transférée à d'autres neurones présents à l'intérieur de structures spécifiques (ex : substantia gelatinosa). Ces structures sont le point de relais entre les voies spinales et supraspinales ascendantes et descendantes (Melzack et Wall, 1965). En condition normale, les fibres nociceptives ($A\delta$ ou C) utilisent un neurotransmetteur excitateur, le glutamate, pour acheminer le message nocif de la périphérie à la moelle épinière.



(Adaptée de Julius et Basbaum, 2000)

Figure 5. Description des fibres sensorielles $A\alpha/\beta$, $A\delta$ et C (a), représentation graphique simplifiée de leur vitesse de conduction et de leur rôle dans la transmission de la douleur (b).

Cette information sensorielle provenant de stimuli nocifs est alors relayée aux structures supraspinales incluant le thalamus et le système limbique par les voies spinothalamiques et spinobrachiales (Scholz et Woolf, 2002). De puissants contrôles internes sont présents à plusieurs niveaux, comme le démontrent les systèmes de modulation des voies descendantes (Basbaum et Jessell, 2000). Les voies descendantes ont aussi la capacité de moduler la transmission du signal nociceptif par des effets inhibiteurs ou facilitateurs (Urban et Gebhart, 1999b).

2.6.3 LA DOULEUR INFLAMMATOIRE

Bien que la douleur aiguë disparaisse généralement peu de temps après l'événement douloureux, cet état peut rapidement dégénérer en douleur persistante, voire même chronique (Carr et Goudas, 1999). Ceci s'explique principalement soit par des modifications (posttraductionnelles et prétranscriptionnelles) du fonctionnement des fibres nociceptives en présence d'un stimulus violent et délétère (ex : blessure avec lésion), soit par un stimulus intense et persistant (ex : inflammation locale) (Scholz et Woolf, 2002). Ces événements découlent d'une propriété du système nerveux central, la neuroplasticité, qui lui permet de modifier et d'adapter ses fonctions face à une condition physiopathologique donnée (Coderre et coll., 1993).

En présence de ces conditions physiopathologiques, la douleur peut alors survenir en l'absence d'un stimulus externe, la réponse au stimulus nociceptif peut être exagérée (hyperalgésie) ou un stimulus habituellement inoffensif peut produire de la douleur (allodynie) (Basbaum et Woolf, 1999; Basbaum et Jessell, 2000). Ces réponses sont le résultat soit de la diminution du seuil de tolérance des nocicepteurs (sensibilisation périphérique), soit d'une exagération (ou d'une déformation) du signal transmis à la moelle épinière (sensibilisation centrale). Ces « exagérations » de la nociception déclenchent une multitude de comportements adaptatifs comme la diminution de la

mobilité ou l'évitement dans le but de favoriser la guérison (Urban et Gebhart, 1999a).

2.6.3.1 Sensibilisation périphérique associée à l'inflammation

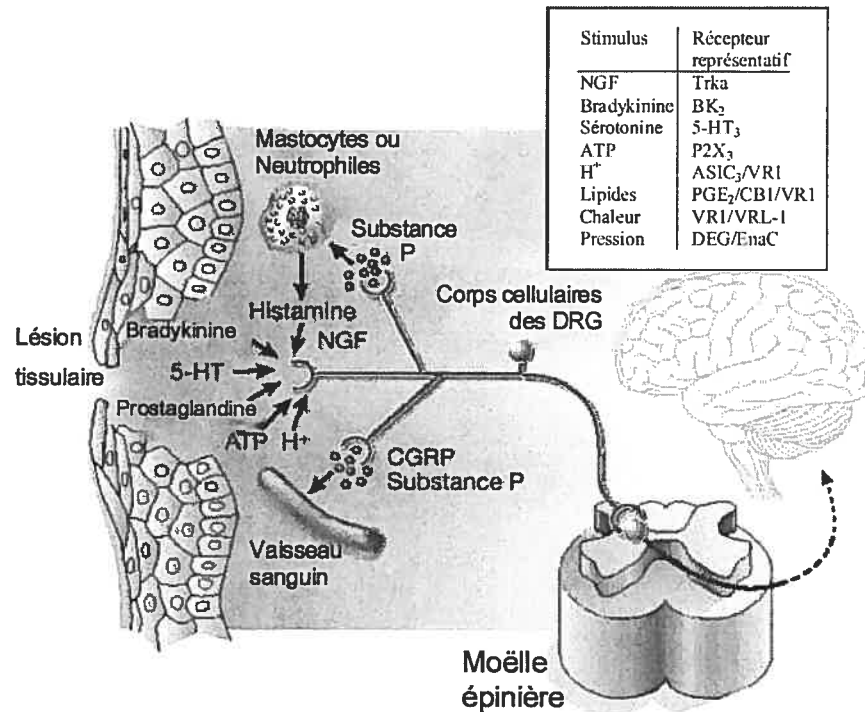
Lors d'un événement inflammatoire (blessure, pathologie ou fonctionnement anormal d'un organe), l'atteinte tissulaire initie une réponse immunitaire locale soutenue par de multiples médiateurs sécrétés par les cellules environnantes (cellules immunitaires, fibroblastes, tissus vasculaires) (Figure 6). Les terminaisons nerveuses sont alors en contact avec une « soupe inflammatoire » composée de différents médiateurs inflammatoires (bradykinine, histamine, prostaglandines), d'ions algésiants (H^+ et K^+), de cytokines, de peptides, d'amines, de purines et de facteurs de croissance (Boddeke, 2001; Schaible et coll., 2002).

Dès les premiers instants de l'événement inflammatoire, une partie de ces médiateurs sensibilisent et activent directement les récepteurs présents au niveau des terminaisons nerveuses, déclenchant une douleur spontanée. D'autres agissent indirectement par l'intermédiaire de cellules inflammatoires qui vont sécréter à leur tour des produits algésiants (Kidd et Urban, 2001). Un événement propre à la douleur inflammatoire, la sensibilisation du système nerveux somatosensoriel, est déclenché par un autre groupe de médiateurs qui fonctionnent de concert afin d'activer les voies de signalisation de la douleur jusqu'à la guérison complète du tissu. Ces modifications sont plus lentes et persistent plus longtemps. Elles requièrent des processus comme le transport rétrograde du signal vers le corps cellulaire, l'activation des cascades de transduction du signal, des changements transcriptionnels et le transport orthograde des protéines vers les terminaisons centrales et périphériques (Scholz et Woolf, 2002). Enfin, l'exposition à ces médiateurs biochimiques entraîne l'activation de certaines fibres dites « dormantes », qui ne participent habituellement pas à la nociception. Ces fibres changent alors de phénotype pour permettre la transmission de la douleur (Loeser et Melzack, 1999).

Suite à leur activation, les fibres nociceptives peuvent aussi libérer des neurotransmetteurs et des peptides (ex : substance P, CGRP et ATP) à partir de leurs terminaisons périphériques et centrales. De par leur fonctionnement, ces substances contribuent à la production de la « soupe inflammatoire » périphérique en favorisant la sécrétion de molécules à partir des cellules non neuronales environnantes et des tissus vascularisés, un phénomène reconnu comme étant l'inflammation neurogénique (Basbaum et Jessell, 2000).

2.6.3.2 Sensibilisation centrale associée à l'inflammation

Bien que l'hypersensibilité résultant d'un stimulus inflammatoire soit largement associée à la sensibilisation périphérique, d'autres mécanismes sont aussi impliqués. En effet, l'activation persistante et répétitive des fibres afférentes primaires peut produire des changements importants au niveau des fonctions et de l'activité des neurones recevant l'*input* au niveau de la corne dorsale. Ceci peut débiter rapidement par une modification post-traductionnelle dépendante de l'activité ou de la migration de récepteurs ou de canaux ioniques vers la surface des terminaisons nerveuses.



(Adaptée de Julius et Basbaum, 2000)

Figure 6. Schématisation représentant les principaux médiateurs inflammatoires impliqués dans la sensibilisation périphérique et neurogénique.

Dans certains cas, la sensibilisation centrale peut être soutenue par des changements transcriptionnels ou par l'inactivation de répresseurs cellulaires. Enfin, comme au niveau périphérique, la réaction immunitaire engendrée par l'activation des cellules immunitaires centrales (cellules gliales) peut augmenter la nociception en favorisant la sécrétion de cytokines (Watkins et coll., 2001).

2.6.4 MODÈLES DE DOULEUR INFLAMMATOIRE PERSISTANTE OU CHRONIQUE UTILISANT L'ADJUVANT COMPLET DE FREUND (ACF)

Plusieurs tests comportementaux peuvent être utilisés en laboratoire pour décrire l'activité antinociceptive de nouvelles entités chimiques. Nous pouvons citer à titre d'exemple le temps de retrait de la patte ou de la queue d'un animal suite à l'application d'une pression, de chaleur ou de froid (Yaksh, 1999). Cependant, ces modèles qualifient souvent une douleur de type aiguë puisqu'ils ne mettent pas en évidence d'hyperalgésie, d'allodynie ou d'hyperesthésie, habituellement présentes chez les patients souffrants de douleurs inflammatoires persistantes ou chroniques (Besson, 1999). Des modèles de douleur inflammatoire plus appropriés sont donc nécessaires afin d'évaluer l'efficacité de ces nouvelles entités chimiques destinées à soulager la douleur chronique.

Parmi les modèles de douleur inflammatoire chronique disponibles, notons l'hyperalgésie induite par l'injection d'ACF dans la région plantaire de la patte arrière d'un rat. Ce modèle est une variante courte du modèle d'arthrite induite par l'ACF présenté précédemment dans la section 2.5.1 (Millan et coll., 1988; Iadarola et coll., 1988; Woolf et coll., 1997). La réaction inflammatoire locale suivant l'administration d'ACF favorise la libération de médiateurs chimiques algésiants qui, éventuellement, altéreront la fonction de fibres nociceptives (et donc les nocicepteurs) et intensifieront ainsi la sensation de douleur.

Dans ce modèle, les rats reçoivent une injection intraplantaire d'ACF (50-100 μ g) dans la patte. En l'espace de quelques heures, l'animal développe une hyperalgésie persistante qui pourra être réduite ou éliminée par l'administration judicieuse d'analgésiques ou d'agents antalgiques (Fraser et coll., 2000a). Les animaux sont testés (mesure de la pression nécessaire au retrait de la patte inflammée) sur une période oscillant entre 24 et 72 heures suivant l'administration d'ACF. Cette période

de temps est suffisante pour créer un état hyperalgésique mesurable et stable (Yonehara et coll., 1997).

3 L'INFLAMMATION ET LES CYTOCHROMES P450

3.1 EFFET DE L'INFLAMMATION SUR LE MÉTABOLISME ET LA PHARMACOCINÉTIQUE DES MÉDICAMENTS CHEZ L'HOMME ET LE RAT

Les premiers signes d'une interaction entre le système immunitaire et la pharmacocinétique (et la pharmacodynamie) d'un médicament ont été rapportés en 1953. Des rats ayant reçu du bleu de trypan, un dépresseur du système réticulo-endothélial, montraient des temps de sommeil prolongés suite à l'administration de phénobarbital (Beck et Whitehouse, 1974). D'autres études utilisant des stimuli inflammatoires différents ont montré le même phénomène. Par exemple, une augmentation du temps de sommeil était aussi observée dans le modèle d'arthrite induite par l'ACF après l'administration de pentobarbital (Beck et Whitehouse, 1974).

Bien qu'un lien entre la diminution du métabolisme microsomal et l'augmentation du temps de sommeil ait déjà été établi à cette époque, les bases pharmacocinétiques des modifications observées chez le rat souffrant d'arthrite induite par l'ACF n'ont été mises en évidence que beaucoup plus tard avec des médicaments comme la cyclosporine et le propranolol (Bishop et coll., 1981; Pollock et coll., 1989; Piquette-Miller et Jamali, 1993). Le Tableau IX présente une liste d'études pharmacocinétiques effectuées sur des modèles inflammatoires ou infectieux chez le rat. Ce tableau montre que différents stimuli inflammatoires (térébenthine, ACF ou le LPS) entraînent les mêmes modifications pharmacocinétiques chez le rat comme une diminution de la clairance (CL) et du volume de distribution (V) et une augmentation de la biodisponibilité orale (F_{oral}). Puisque la majeure partie des médicaments étudiés sont des bases faibles principalement éliminées par métabolisme hépatique, les causes les plus probables de ces changements pharmacocinétiques sont des modifications de

leur liaison aux protéines plasmatiques (PPAs, AGPs) et de leur métabolisme hépatique.

Tableau IX. Impact de l'inflammation sur la pharmacocinétique (PK) de divers médicaments chez le rat.

Stimulus	Médicament	E _H *	AGP	Paramètres PKs				Références
				f _u	CL	V	F _{oral}	
Térében.	Propranolol	E	Oui	↓	↓	↓	↑	(Belpaire et coll., 1989)
	Lénisétron	E	Oui	↓	↓	↓	--	(Jauregizar et coll., 2001)
	Tamsulolin	E	Oui	↓	↓	↓	↑	(Matsushima et coll., 2000)
	Metoprolol	E	Oui	↔	↓	↔	↑	(Belpaire et coll., 1989)
	Antipyrine	B	Non	↔	↓	↔	↑	(Belpaire et coll., 1989)
ACF	Cyclosporine	I		--	↓	↔	--	(Pollock et coll., 1989)
	Propranolol	E	Oui	--	↓↔	↓↔	↑	(Bishop et coll., 1981; Piquette-Miller et Jamali, 1993)
	HCQ	I	Oui	↓	↓	↓	--	(Emami et coll., 1998)
LPS	CHZ	I	Non	↔	↓	↔	--	(Rockich et Blouin, 1999)
	Vérapamil	E	Oui	↓	↓	↓	↑	(Laethem et coll., 1994)
	Propranolol	E	Oui	↓	↓	↓	↑	

*E_H: coefficient d'extraction hépatique → E: élevé; I: intermédiaire; F: faible

AGP: liaison à l'AGP

CHZ: Chlorzoxazone; HCQ: hydroxychloroquine; Térében : térébenthine

Ces observations peuvent être mises en parallèle avec des données cliniques obtenues chez l'homme. Chez des sujets volontaires, l'administration de LPS conduit à une diminution de la clairance de l'antipyrine, de l'hexobarbital et de la théophylline (Shedlofsky et coll., 1994; Shedlofsky et coll., 1997). De plus, bien que les modifications semblent moins dramatiques que chez le rat, la pharmacocinétique de plusieurs médicaments comme le vérapamil ou le propranolol est altérée chez les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn (Schneider et coll., 1981; Schneider et Bishop, 1982; Mayo et coll., 2000). Ainsi, l'humain pourrait présenter des modifications pharmacocinétiques similaires au rat lors d'infections ou de maladies inflammatoires.

3.2 MODÈLES ANIMAUX D'INFLAMMATION ET D'INFECTION ET IMPACT SUR LES CYPs

3.2.1 STIMULATION DES MACROPHAGES PÉRITONÉAUX

L'injection intra-péritonéale de cérite, de sulfate de barium ou de kaolin, particules irritantes qui stimulent les macrophages péritonéaux, entraîne une diminution du contenu total en CYP dans les microsomes de rats (Sewer et coll., 1997).

3.2.2 INFLAMMATION LOCALISÉE AU NIVEAU D'UN SITE AUTRE QUE LE FOIE

Chez le rat et le lapin, une chute importante du contenu total en CYPs est observée en l'espace de 24 à 48 heures suivant l'administration sous-cutanée de térébenthine dans la région dorsale (Morgan, 1989; El Kadi et Du Souich, 1998). Cette diminution a des répercussions sur le métabolisme du propranolol, de la tolbutamide et de la lidocaïne (Chindavijak et coll., 1988; Parent et coll., 1992). De même, le métabolisme du propranolol est diminué dans les microsomes de foie de rats préparés 14 jours après

l'administration d'ACF (Piquette-Miller et Jamali, 1993). Enfin, les travaux de Toda et coll. (1994) ont noté une diminution de plus de 75 % de la quantité totale de CYPs et de l'activité de l'aminopyrine *N*-déméthylase dans les microsomes de foie de rats traités avec une dose unique d'ACF 14 jours plus tôt.

3.2.3 INFECTIONS BACTÉRIENNES ET PARASITAIRES

Les travaux portant sur l'infection par différentes souches bactériennes ou l'administration de toxines bactériennes indiquent que le métabolisme catalysé par les CYPs est sévèrement compromis lors d'une infection bactérienne (Renton, 2001). À cet égard, le LPS et l'exotoxine (hémolysine) de *Listeria monocytogenes* ont été les plus étudiés, et semblent entraîner à la fois une réduction des quantités et de l'activité des CYPs dans les microsomes hépatiques (Morgan, 1997). Enfin, la pneumonie à *Actinobacillus pleuropneumoniae* et l'administration de LPS diminuent l'activité des CYPs dans les microsomes de foie de porcs (Monshouwer et coll., 1995a; Monshouwer et coll., 1995b; Monshouwer et coll., 1996a).

Ces modifications ne se limitent pas aux infections bactériennes puisqu'une grande variété d'infections parasitaires entraîne également une diminution du métabolisme hépatique chez l'animal. L'infection à *Plasmodium berghei*, responsable d'une forme de paludisme chez les rongeurs, cause aussi une diminution progressive du métabolisme microsomal de plusieurs substrats des CYPs dont le métronidazole et la caféine (Kokwaro et coll., 1993; Uhl et coll., 1999).

3.2.4 L'INFECTION VIRALE ET LES INDUCTEURS D'INTERFÉRON

Les études portant sur les virus de l'hépatite, l'influenza et le virus de l'encéphalomyocardite montrent qu'ils possèdent tous la capacité de diminuer le contenu et l'activité des CYPs (Renton, 2001). L'interféron et les inducteurs de l'interféron, à l'instar d'une infection virale, sont également reconnus pour réduire le

contenu hépatique en CYPs et l'activité des CYPs dans des modèles animaux (Renton et Mannering, 1976).

3.3 EFFETS DE L'INFLAMMATION ET DE L'INFECTION SUR LES CYPs INDIVIDUELS

L'ensemble des études présentées chez l'homme et l'animal suggère que l'état inflammatoire ou infectieux conduit à une altération de la biotransformation et de l'élimination des médicaments occasionnée par une modification de l'activité et du contenu total en CYPs. Ces approches ont cependant le désavantage d'être peu spécifiques et peu informatives quant aux isoformes affectés. Au contraire, des méthodes de phénotypage plus spécifiques telles que les sondes métaboliques, les anticorps spécifiques et la quantification d'ARN_m sont des techniques beaucoup plus informatives qui ont permis de mettre en évidence des tendances intéressantes.

Tout d'abord, indépendamment du stimulus inflammatoire ou infectieux initial, la diminution de l'activité catalytique d'un isoforme spécifique est souvent accompagnée ou précédée d'une diminution de son contenu hépatique ou de son ARN_m. Ces résultats ont été observés dans quelques études où diverses espèces ont été traitées avec des stimuli aussi différents que le LPS, la térébenthine, la carraghénine et les irritants péritonéaux (Tableau X) (Morgan, 1997).

En général, la quantité totale en CYPs mesurée par spectroscopie est moins affectée que l'expression des CYPs mesurés individuellement (Morgan, 1989; Sewer et coll., 1996; Morgan, 1997). Bien qu'une diminution de l'expression et de l'activité métabolique de ces derniers soit la plupart du temps observée, il existe plusieurs exemples où l'administration d'agents pro-inflammatoires n'affecte pas certains CYPs et, à quelques rares occasions, en induit d'autres (Tableau X). Bien que toutes les conditions expérimentales présentées dans le Tableau X montrent des effets similaires sur les CYPs hépatiques, chacune de celles-ci présentent des différences

autant au niveau qualitatif que quantitatif. Par exemple, l'étendue des modifications obtenues après l'administration de LPS est beaucoup plus importante et plus rapide que celle qui fait suite à l'administration de cérite ou de térébenthine (Sewer et coll., 1997). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'administration de LPS entraîne une multitude de changements physiopathologiques qui ne correspondent pas à ceux observés chez les animaux traités avec de la térébenthine ou avec des irritants péritonéaux (Moshage, 1997; Ramadori et Christ, 1999). En effet, les médiateurs inflammatoires et la réaction systémique observée diffèrent de façon importante entre ces modèles (voir Section II de ce Chapitre). Ainsi, il semble que le type d'inflammation confère une certaine sélectivité quant à l'effet observé au niveau des CYPs hépatiques.

L'intensité des modifications peut aussi varier en fonction de l'espèce animale utilisée, du temps écoulé après l'administration du stimulus inflammatoire (phase aiguë ou chronique), de la dose administrée, de l'intensité de la réponse inflammatoire, de la nature du stimulus, de l'isoforme visé et des mesures à l'état basal ou induit (Morgan, 1997). L'interprétation des résultats obtenus par différentes études devient alors très compliquée, voire même impossible à comparer si leurs conditions expérimentales diffèrent. Ceci montre la nature complexe et multifactorielle des mécanismes engendrés par les phénomènes inflammatoires ou infectieux.

Tableau X. Effet de l'administration de différents stimuli inflammatoires sur l'ARN_m, le contenu total ou spécifique des CYPs (ou leur activité correspondante).

Stimulus	Espèce	CYPs individuels		Références
		ARN _m	Protéine ou Activité associée	
LPS	Rat	↓ CYP2C6, 2C7, 2C11, 2E1, 3A2, 2B1/2 (induits)	↓ CYPs totaux, CYP1A, 2B1/2 (constitutif et induit), 2C11, 2C12, 3A2 ↓↔ CYP2E1	Morgan, 1993; Sewer et coll., 1996; Khatsenko et Kikkawa, 1997; Ferrari et coll. 2001; Li-Master et al., 2002;
		↑ 4A1, 4A2, 4A3	↑ 4A1/2, 4A3 ↑ ω-hydroxylase	
	Souris	↓ Cyp2B9/10, 2B9 (induits)	↓ CYPs totaux, Cyp2B9/10, 2B9 (induits)	Li-Master et al., 2001
	Lapin		↓ CYPs totaux, CYP1A, 2E1 et activités associées	Saitoh et coll., 1999
Térébenthine	Rat	↓ CYP2C11	↓ CYPs totaux, CYP2C11, 2C12	Morgan, 1989; Wright et Morgan, 1990 Bleau et al., 2000
	Lapin		↓ CYPs totaux, CYP1A1/2, 3A6	
Carraghénine	Rat		↓ CYPs totaux, CYP2B, 2D, 2E1, 3A et activités associées	Muntané et coll., 1995
Irritants péritonéaux (célite)	Rat	↓ CYP2C11 ↔ CYP2E1, 3A2	↓ CYPs totaux, CYP2C11 ↔ CYP2E1, 3A2	Sewer et al., 1996
		↑ 4A1, 4A2, 4A3	↑ 4A1/2, 4A3	

3.4 EFFETS DES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES SUR LES CYPs

Plusieurs données expérimentales montrent l'implication des facteurs pro-inflammatoires présents dans la circulation sanguine pour expliquer la diminution du contenu en CYPs hépatiques. Par exemple, on observe que l'incubation d'hépatocytes de lapin en présence de sérum de lapins traités avec de la térébenthine entraîne une chute du contenu total en CYPs. Ceci n'est pas le cas avec des hépatocytes de lapin incubés avec du plasma de lapins non traités (El Kadi et coll., 1997). Des conclusions similaires ont été obtenues avec des hépatocytes de souris incubés en présence de plasma de souris traitées avec du LPS (Ghezzi et coll., 1986).

Les travaux de Bleau et coll. (2001 et 2003) ont permis d'attribuer les modifications observées dans les hépatocytes de lapins traités avec du plasma de lapin ayant reçu de la térébenthine, à une fraction sérique dont le poids moléculaire correspond à celui des cytokines plasmatiques (~ 20 kD). Chez le rat et la souris, la chute de l'expression et de l'activité des CYPs suite à l'administration d'agents infectieux ou inflammatoires peut être mimée par l'administration de cytokines purifiées telles que l'IL-1- α , IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α (Tableau XI) (Poüs et coll., 1990; Ferrari et coll., 1993; Morgan et coll., 1994; Nadin et coll., 1995; Morgan, 1997; Kihara et coll., 1998). Ces études suggèrent que chacun des CYPs individuels répond de façon différente aux cytokines.

L'interprétation des résultats obtenus après injection de cytokines *in vivo* demeure difficile puisque ces agents possèdent des propriétés pharmacocinétiques différentes et sont caractérisés par une multitude d'effets indirects ou redondants. Par exemple, les cytokines agissent sur l'axe hypothalamohypophysaire, ce qui entraîne une altération de la sécrétion des glucocorticoïdes, des hormones thyroïdiennes ou de la GH qui ont aussi le pouvoir de contrôler l'expression des CYPs, du moins chez le rat (Morgan, 1997). L'utilisation de cellules hépatiques en culture offre la possibilité

d'étudier directement l'effet d'hormones, de cytokines ou d'autres médiateurs de l'inflammation sur l'expression et l'activité des CYPs. *In vitro*, l'incubation d'hépatocytes humains ou de rats en présence de cytokines telles que l'IL-6, l'IL-1 β , le TNF- α ou les INFs conduit à une diminution du contenu total en CYPs et du contenu de certains isoformes et de l'ARN_m correspondant à certains CYPs (Morgan, 1991; Wright et Morgan, 1991; Chen et coll., 1995b; Abdel-Razzak et coll., 1995; Muntane-Relat et coll., 1995; Carlson et Billings, 1996). Chez le rat, les données obtenues *in vitro* reflètent assez bien les résultats *in vivo* et suggèrent une diminution sélective de l'expression constitutive de certains CYPs ainsi que de leur niveau d'ARN_m.

La suppression des ARN_m associés aux CYP1a2, CYP2a5 et CYP3a11 engendrée par l'administration de térébenthine est complètement abolie chez les souris déficientes en IL-6 (Siewert et coll., 2000). Bien que n'ayant pas été évaluée de façon systématique, plusieurs études suggèrent que le profil plasmatique et/ou hépatique des cytokines produit par différents états infectieux ou inflammatoires est variable. Ainsi, d'autres études ont montré que ni l'élimination du gène de l'IL-6, ni celle des récepteurs p55 ou p75 du TNF- α n'arrivent à abolir complètement, ni même partiellement dans certains cas, l'effet produit par le LPS sur les CYPs suggérant la contribution d'autres médiateurs que le TNF- α ou l'IL-6, possiblement l'IL-1 β (Warren et coll., 1999; Siewert et coll., 2000).

Tableau XI. Effet des cytokines sur l'expression des CYPs hépatiques de rats après administration *in vivo* à l'animal ou après incubation avec des hépatocytes.

Cytokine	Étude	CYPs (individuels ou totaux)		Références
		ARN _m	Protéine ou Activité associée	
IL-1 α	<i>In vivo</i>	↓ CYP1A2, 2C11,2C12, 2E1	↓ CYPs totaux, CYP1A2, 2E1, 2C11, 3A2	(Morgan et coll., 1994)
IL-1 β	<i>In vivo</i>		↓ CYPs totaux, CYP2C6, 2C11, 2C12, 2C13, 2E1, 3A2 ↔ CYP2A, 2B, 2C11, 4A1	(Pous et coll., 1990; Wright et Morgan, 1991; Kihara et coll., 1998)
	<i>In vitro</i>	↓ CYP2C11, 2C12	↓ CYP1A2, 2B1/2, 2C11, 2C12, 3A2	(Wright et Morgan, 1991; Chen et coll., 1995a; Carlson et Billings, 1996)
IL-6	<i>In vivo</i>	↓ CYP2C11, 2E1 ↔ CYP3A2	↓ CYPs totaux, CYP2C11 ↔ CYP2E1,3A2	(Morgan et coll., 1994)
	<i>In vitro</i>	↓ CYP2C11, 2C12	↓ CYP2B1/2, 2C11, 2C12, 3A2	(Wright et Morgan, 1991; Carlson et Billings, 1996)
TNF α	<i>In vivo</i>	↓ CYP2C11, 3A2	↓ CYP totaux, CYP2C11 et 3A2 et activités associées	(Pous et coll., 1990; Nadin et coll., 1995)
	<i>In vitro</i>		↓ CYP2B1/2 et 3A2; ↓↔ CYP2C11 ↔ CYP1A2	(Chen et coll., 1995b; Carlson et Billings, 1996)
IFN γ			↔ CYP1A2, 2B1/2, 2C11, 3A2	(Chen et coll., 1995b; Carlson et Billings, 1996)

3.5 MÉCANISME DE SUPPRESSION DES CYPs EN CONDITIONS INFLAMMATOIRES

Les hépatocytes en culture peuvent rarement reproduire l'expression stable des CYPs à un niveau approchant celui du foie *in vivo*. De plus, bien que ces systèmes puissent montrer qu'un isoforme particulier peut être affecté par une cytokine, la réponse peut être différente de celle observée dans les hépatocytes *in vivo*. En revanche, les études utilisant des systèmes *in vitro* (hépatocytes en culture ou les vecteurs d'expression) permettent d'élucider les mécanismes de modification de l'expression des CYPs. La Figure 7 présente un schéma résumant cette section basée essentiellement sur les connaissances actuelles. Il est évident que plusieurs de ces mécanismes restent hypothétiques.

3.5.1 MÉCANISMES PRÉ-TRADUCTIONNELS DE RÉGULATION DES CYPs

La régulation négative des CYPs par les cytokines ou les stimuli inflammatoires débute habituellement par une diminution des ARN_m correspondant à ces enzymes (Morgan, 1997). Le degré de diminution de la transcription est souvent suffisant pour expliquer la baisse de la quantité de protéine ou d'activité enzymatique mesurée. Ceci implique que le mécanisme principal de régulation suppressive aurait une origine prétraductionnelle.

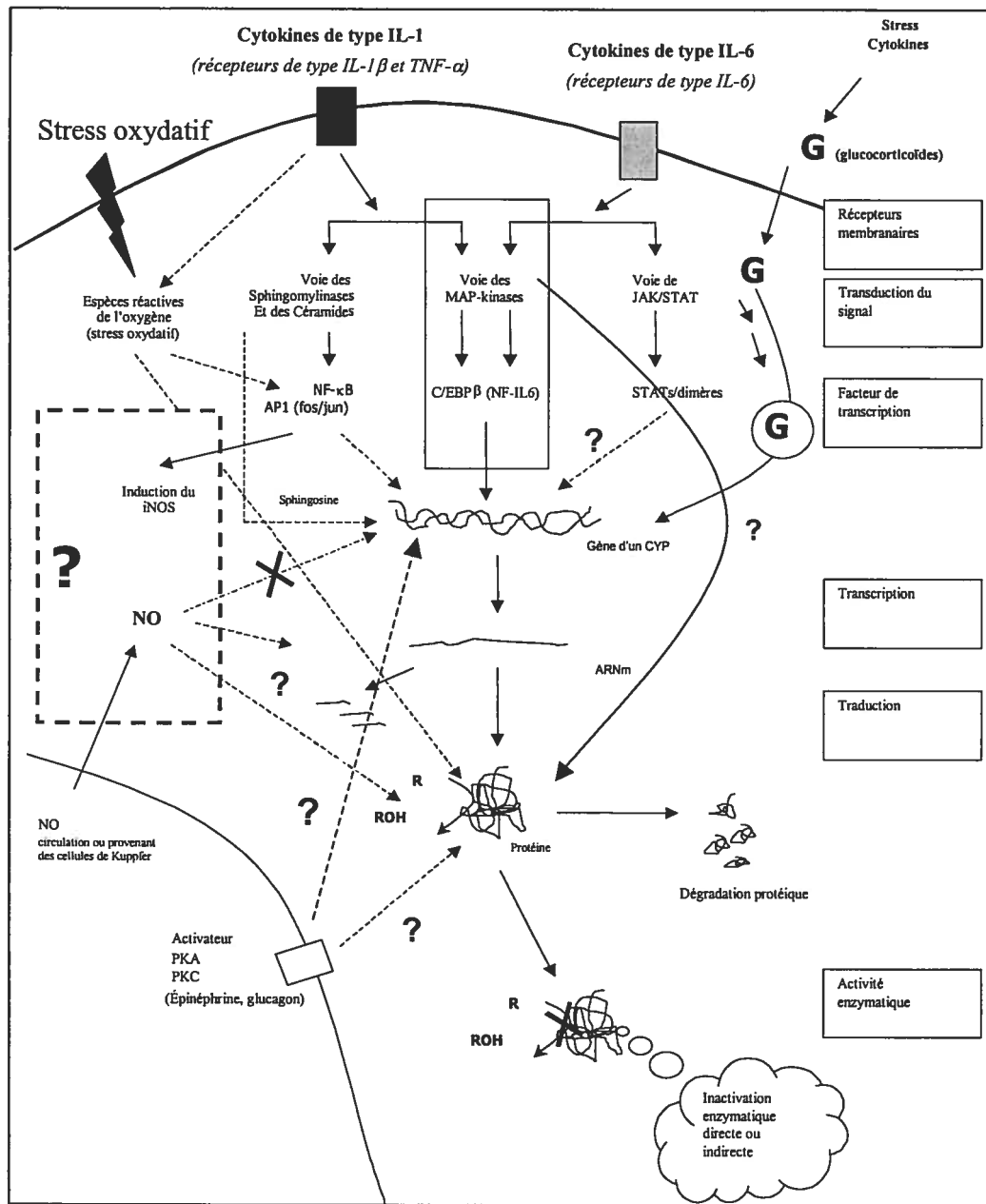


Figure 7. Schéma représentant la complexité des mécanismes prétraductionnels ou posttraductionnels de suppression de l'expression et de l'activité des CYPs en conditions inflammatoires.

3.5.1.1 Au niveau transcriptionnel

3.5.1.1.1 Cytokines pro-inflammatoires

En raison du rôle des cytokines dans la chute du contenu en CYPs, les mécanismes impliquant ces dernières et leurs voies de signalisation ont été les plus étudiés jusqu'à maintenant. Ces voies sont très complexes, impliquent plusieurs messagers secondaires et sont souvent redondantes, ce qui complique l'interprétation des résultats observés dans la littérature. Bien que le nombre d'études soit très limité, la contribution de facteurs de transcription activés par les cytokines explique sûrement la diversité des réponses observées avec chacun des CYPs.

Ainsi, le CYP2C11 présente un élément de liaison pour NF- κ B, un facteur reconnu pour être activé par l'IL-1 β et le TNF- α (Iber et coll., 2000). L'activation du NF- κ B par l'IL-1 β inhibe la liaison des éléments de transcription génique et par conséquent la synthèse du CYP2C11. Cependant, rien n'indique que le NF- κ B soit impliqué dans le contrôle de l'expression d'autres CYPs, puisque jusqu'à maintenant, la région de liaison au NF- κ B n'a été identifiée que sur le promoteur du gène associé au CYP2C11 (Iber et coll., 2000). Parmi les messagers activés par l'IL-1 et pouvant activer le NF- κ B, seules les céramides formées à partir des sphingomyélinases ont montré une activité sur le CYP2C11 (Figure 7) (Chen et coll., 1995a; Morgan et coll., 1996).

Il semble qu'*in vitro*, des voies de signalisation multiples impliquant une ou plusieurs cytokines soient requises pour permettre une inhibition comparable à celle obtenue *in vivo* après l'injection de cytokines ou d'agents proinflammatoires. En raison de leur rôle dans l'induction des PPA par les cytokines proinflammatoires, les protéines de la famille JAK (STATs) et MAP kinases (C/EBPs) représentent des voies supplémentaires de transduction des signaux cellulaires (Figure 7) (Moshage, 1997;

Morgan, 1997). Des facteurs de transcription tels que les dimères de STAT ont été proposés pour l'inactivation des CYPs par IL-6 et l'INF γ (Morgan, 1997). Cependant, bien que l'IL-6 soit reconnue pour activer les membres des familles STATs et C/EBPs, des études *in vitro* suggèrent que seule la voie des C/EBPs, et plus précisément le C/EBP β -LIP, soit impliquée dans la suppression génique du CYP3A4 humain (Jover et coll., 2002).

Selon Morel et Barouki (1998), la suppression du CYP1A1 par le TNF- α se ferait par l'entremise d'AP-1. *In vitro*, dans les hépatocytes de souris et *in vivo*, chez le rat, d'autres facteurs nucléaires activateurs comme le « hepatocyte nuclear factor 1 α » (HFN-1 α) voient leurs quantités diminuées en présence de LPS ou de cytokines (Roe et coll., 2001; Hakkola et coll., 2003). Cette diminution est elle-même associée à une réduction de la transcription du CYP2E1.

Enfin, un autre élément de régulation inhibiteur, *c-myc*, activé en présence d'IL-2, provoquerait indirectement une chute importante du CYP2C11 et du CYP3A2 dans les hépatocytes de rat (Tinel et coll., 1999). Ce mécanisme pourrait toujours prévaloir dans les hépatocytes lorsque ceux-ci sont mis en présence de cytokines proinflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α , car celles-ci ont le pouvoir d'activer *c-myc*. *In vitro*, la suppression des CYPs par les IFNs est complètement abolie en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique, suggérant que cette cytokine nécessite la synthèse de protéines, qui sont vraisemblablement des facteurs de transcription (Moochhala et Renton, 1991).

3.5.1.1.2 Autres voies et éléments de régulation

Bien qu'elles soient reconnues à titre de médiateurs clés de la répression génique des CYPs, les cytokines ne sont pas les seuls responsables de ce phénomène. En effet, d'autres mécanismes plus ou moins indépendants agissent de concert avec les

cytokines dans le but de contribuer à la suppression des CYPs. Par exemple, en étudiant l'induction des CYP4As chez le rat Fischer 344, il a été suggéré que le récepteur PPAR α serait induit suite à l'administration de LPS (Sewer et coll., 1997). Ce récepteur nucléaire agit notamment à titre d'agent régulateur du catabolisme des acides gras en réponse au jeûne et au stress. Chez des souris n'exprimant pas le facteur nucléaire PPAR α , il a été montré que le PPAR α est responsable de l'induction des Cyp4as engendrée par le LPS, mais qu'il est aussi impliqué dans la suppression de l'ARN_m du Cyp2a5, du Cyp2c29 et du Cyp3a11 (Barclay et coll., 1999). En effet, son absence prévient partiellement la diminution de leur contenu dans le foie de souris ayant reçu une dose de LPS.

Les glucocorticoïdes sont produits lors d'une réaction de stress ou d'une atteinte inflammatoire. Les glucocorticoïdes pourraient aussi être impliqués, puisque des doses de dexaméthazone (correspondant à des doses de stress) réduisent l'expression du CYP2C11 de façon importante (Iber et coll., 1997; Iber et coll., 1999). Cependant, le mécanisme par lequel la dexamétasone provoque une diminution de l'expression génique du CYP2C11 demeure encore inconnu. Le glucagon et l'épinéphrine (aussi augmentés en situation de stress et d'inflammation) provoquent une augmentation d'AMPc et une augmentation subséquente de l'activité des PKA qui à leur tour entraînent une suppression de l'ARN_m du CYP2C11 (Iber et coll., 2001).

Quelques études suggèrent aussi un rôle pour les radicaux libres provenant de l'oxygène (ex : peroxydes, anion superoxyde) et produits lors de l'état inflammatoire pour expliquer la suppression génique de certains CYPs (Morel et Barouki, 1998; El Kadi et coll., 2000; Barouki et Morel, 2001). En effet, le stress oxydatif entraîne une diminution du contenu en ARM_m du CYP1A1 et du CYP1A2 dans les hépatocytes isolés de rat (Barker et coll., 1994). Dans les hépatocytes humains incubés en présence de TNF- α , la diminution de synthèse du CYP1A1 serait liée à la sensibilité d'un facteur nucléaire (NF-1) au stress oxydatif engendré par le TNF- α (Morel et Barouki, 1998). En accord avec ces découvertes, l'incubation d'hépatocytes de lapins

normaux en présence de sérum de lapins traités avec de la térébenthine provoque une chute du contenu en CYPs totaux, du métabolisme de la théophylline et une augmentation de la peroxydation des lipides (El Kadi et coll., 1997). La chute du contenu en CYPs hépatiques totaux est abolie en présence d'agents anti-oxydants.

3.5.1.2 Au niveau posttranscriptionnel

Wright et Morgan ont été les premiers à mettre en évidence la suppression complète de la transcription génique du CYP2C11 suite à un traitement avec de la térébenthine ou du LPS (Wright et Morgan, 1990). Ces derniers notèrent cependant qu'un arrêt instantané de la transcription ne pouvait expliquer à lui seul la chute extrêmement rapide du contenu en ARN_m observée chez les rats traités avec le LPS (~ 10 % de la valeur du contrôle après 12 heures) puisque la demi-vie de l'ARN_m correspondant au CYP2C11 est d'environ 9,8 heures dans les hépatocytes de rat (Morgan, 1989). Ainsi, un processus supplémentaire par lequel le contenu en ARN_m diminue devait exister. En réponse à cette hypothèse, Delaporte et Renton (1997) ont montré que les inducteurs d'IFN causaient une diminution de la transcription génique et une augmentation de la dégradation de l'ARN_m du CYP1A1 *in vivo*. En conséquence, ces études suggèrent que les pertes additives de transcription et l'augmentation de la dégradation d'ARN_m pourraient, ensemble, contribuer à la chute importante du contenu de certains isoformes.

3.5.2 MÉCANISMES POSTTRADUCTIONNELS DE RÉGULATION DES CYPs

Bien que le degré de diminution de la transcription soit souvent suffisant pour expliquer la baisse de la quantité de protéines, il existe certaines situations spécifiques où la diminution du contenu protéique ou de l'activité enzymatique n'est pas associée à une chute proportionnelle du contenu en ARN_m et/ou en protéine. Par exemple, chez le rat traité avec du LPS, la chute du contenu en CYP2C12 est trop rapide pour

être expliquée uniquement par une diminution du contenu en ARN_m (Wright et Morgan, 1990). Plusieurs mécanismes théoriques ont été proposés pour expliquer ces modifications posttraductionnelles comme la dégradation accrue de la protéine ou l'inactivation directe ou indirecte de l'activité catalytique de la protéine. Par exemple, l'administration d'un inducteur d'IFN favorise la dégradation des CYPs pour une courte période. Cependant, cette période est suivie d'une étape de stabilisation (Gooderham et Mannering, 1986).

3.5.3 CHUTE DU CONTENU EN CYPs HÉPATIQUES ET MONOXYDE D'AZOTE

Plusieurs études ont suggéré que le NO formé localement dans les hépatocytes ou dans les cellules de Kupffer contribuerait directement ou indirectement à la suppression du contenu et de l'activité des CYPs hépatiques suite à l'activation du iNOS en réponse à un stimulus inflammatoire systémique comme le LPS (Khatsenko et Kikkawa, 1997; Khatsenko et coll., 1997; Khatsenko, 1998). Ce sujet a fait l'objet de plusieurs revues de littérature et continue à susciter un intérêt certain pour les chercheurs impliqués dans le domaine (Morgan, 1997; Iber et coll., 1999; Cheng et Morgan, 2001; Morgan, 2001; Renton, 2001; Morgan et coll., 2002). Puisque son action sur les CYPs est identifiée à des mécanismes à la fois pré et posttraductionnels et en raison des controverses entourant ces derniers, le NO et ses effets sur les CYPs sont traités séparément.

Le rôle du NO dans l'inhibition de l'activité des CYPs est bien connu. Cette petite molécule a la capacité de se lier aux hémoprotéines et est capable d'inhiber les CYPs (Wink et coll., 1993). En effet, le NO, les peroxy-nitrites et les donneurs de NO ont tous montré une capacité à inhiber l'activité catalytique associée au CYPs dans les microsomes de foie. L'inhibition se produirait à la fois de façon réversible (liaison à l'hème) et de façon irréversible au niveau de résidus protéiques du site actif des CYPs (Wink et coll., 1993). En accord avec ces observations, les inhibiteurs de NOS

atténuent ou bloquent complètement la chute de certaines activités dépendantes des CYPs dans les hépatocytes humains (Donato et coll., 1997) et de rat en culture (Stadler et coll., 1994; Osawa et coll., 1995) et chez le rat *in vivo* (Khatsenko et Kikkawa, 1997; Khatsenko et coll., 1997; Khatsenko, 1998). Une telle inhibition sera dépendante, d'une part, de la sensibilité des CYPs et, d'autre part, du type de réaction inflammatoire capable fournir une quantité appréciable de NO au niveau hépatique (Morgan, 1997; Sewer et coll., 1997).

Alors qu'un premier mécanisme posttraductionnel est bien accepté, d'autres plus controversés proposent la contribution du NO dans la répression génique ou encore dans la modification de la stabilité de la protéine via la nitration d'une tyrosine, la S-nitrosylation ou l'oxydation des thiols par les peroxy-nitrites formés à partir du NO (Khatsenko et Kikkawa, 1997; Roberts et coll., 1998; Liaudet et coll., 2000; Morgan et coll., 2002). Ces mécanismes conduiraient ainsi à une diminution de l'activité enzymatique. Théoriquement, le NO produit via le iNOS pourrait entraîner l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la répression génique des CYPs. En accord avec cette proposition, des chercheurs ont montré que les inhibiteurs des NOS (N(G)-nitro L-arginine methyl ester et aminoguanidine), atténuaient de façon significative la chute de l'activité et/ou du contenu en protéine et/ou en ARN_m des CYP1A, CYP2B, CYP2C11 et CYP3A hépatiques engendré par l'administration de LPS à des rats (Khatsenko et Kikkawa, 1997; Khatsenko et coll., 1997; Khatsenko, 1998). D'autres résultats obtenus avec des hépatocytes de rats traités avec des doses importantes de LPS, montrent que, à court terme, le contenu et l'activité inducible du CYP2B1/2 (et non l'ARN_m) sont rapidement diminués et que cette diminution dépend du NO (Ferrari et coll., 2001). Ceci laisse supposer qu'à court terme, les processus de dégradation du CYP2B1/2 sont particulièrement sensibles aux modifications des concentrations du NO.

Chez le rat ou dans les hépatocytes de rats traités avec du LPS, la diminution du contenu en ARN_m et en protéine de certains CYPs (CYP3A2, CYP2E1 et CYP2C11)

n'est pas affectée par l'administration d'inhibiteurs des NOS (Sewer et Morgan, 1998; Sewer et Morgan, 1997). En accord avec ces données, la chute de l'ARN_m et du contenu spécifique en Cyp2b, Cyp3a, Cyp2e1 et Cyp2c engendrée par l'administration de LPS n'est pas affectée chez les souris n'exprimant pas le iNOS (Sewer et coll., 1998; Li-Masters et Morgan, 2002). *In vitro*, dans les hépatocytes de porc, une inhibition complète des NOS n'a eu aucun effet sur la chute du contenu en CYPs en réponse à l'IL-1 β , au TNF- α ou à l'IL-6 (Monshouwer et coll., 1996b). À la lumière de ces résultats, il devient de plus en plus apparent que la répression génique et la chute du contenu spécifique de la plupart des familles de CYPs (à l'exception peut-être des CYP2Bs) soit indépendante du NO chez les rongeurs traités avec le LPS (Sewer et Morgan, 1998; Sewer et Morgan, 1997; Sewer et coll., 1998).

4 LES AGONISTES DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES

4.1 HISTORIQUE ET DÉFINITIONS

L'opium est reconnu depuis des milliers d'années pour ses propriétés euphorisantes et sa capacité à soulager la douleur. Son utilisation remonte à plus de 5000 ans avant J.C. alors que les Sumériens cultivaient le pavot et l'extrayaient à des fins médicinales et religieuses. La morphine, un alcaloïde naturel contenu dans cet extrait, est le principal responsable de ces effets. Le terme « opiacé » désigne principalement les molécules provenant de l'opium comme la morphine et la codéine. Pour sa part, le terme « opioïde » est plus large et s'applique à tout agoniste ou antagoniste des récepteurs opioïdes, tels que les dérivés de l'opium, les dérivés non peptidiques semi-synthétiques, les dérivés non peptidiques synthétiques, les composés endogènes et les peptides synthétiques.

4.2 LES PRINCIPAUX RÉCEPTEURS OPIOÏDES

4.2.1 CLASSIFICATION

On considère aujourd'hui qu'il existe au moins trois types de récepteurs opioïdiques : μ (mu), κ (kappa) et δ (delta), que l'on retrouve chez la plupart des mammifères comme l'homme, le rat et la souris (Piros et coll., 1996; Bovill, 1997). La classification des récepteurs opioïdes a subi de multiples changements au cours des dernières décennies (Dhawan et coll., 1996). Désignés initialement par les lettres μ , κ et δ , ces récepteurs ont été rebaptisés par les abréviations MOR, KOR et DOR, suite à leur clonage par les biologistes moléculaires (Tableau XII). Dans le but d'adapter la nomenclature aux progrès de la biologie moléculaire, les recommandations de l'International Union of Pharmacology (IUPHAR) proposent que les récepteurs μ , κ et δ soient maintenant appelés OP₃, OP₂ et OP₁. Cependant,

puisque cette dernière nomenclature des récepteurs opioïdes demeure controversée, cette thèse conservera la nomenclature pharmacologique classique.

Tableau XII. Nomenclature des récepteurs opioïdes.

Pharmacologique	Biologique*	IUPHAR**
δ	DOR	OP ₁
κ	KOR	OP ₂
μ	MOR	OP ₃

* DOR : d pour canal déférent; KOR : k pour kétacyclazocine; MOR : m pour morphine

** IUPHAR : classification selon l'ordre chronologique de clonage.

4.2.2 DESCRIPTION ET MÉCANISME D'ACTION CELLULAIRE

Les trois récepteurs opioïdes, clonés au début des années 90, présentent une structure protéique hautement homologue et une organisation génomique quasi-identique (Kieffer, 1995). Ces observations suggèrent qu'ils ont évolué à partir d'ancêtres communs. Les récepteurs opioïdes font partie de la grande famille des récepteurs membranaires couplés aux protéines G et partagent un mécanisme de transmission du signal pharmacologique très similaire (Piros et coll., 1996; Bovill, 1997). En plus d'être couplés de façon négative à l'adénylate cyclase (diminution d'AMPc), ces récepteurs favorisent l'ouverture des canaux potassiques et bloquent les canaux calciques de type N (Kieffer, 1995; Satoh et Minami, 1995; Connor et Christie, 1999; Sanchez-Blazquez et coll., 2001). Schématiquement, l'action des agonistes opioïdiques endogènes ou exogènes sur leurs récepteurs se traduit par une hyperpolarisation membranaire qui tend à inhiber les fonctions cellulaires. Ce mécanisme d'action est responsable de leur action inhibitrice sur l'excitabilité neuronale et notamment sur la transmission des messages nociceptifs.

4.2.3 DISTRIBUTION TISSULAIRE

Les récepteurs opioïdes et leurs ligands endogènes sont présents au niveau de régions clés du système nerveux, ce qui leur permet, entre autres, de moduler la transmission et la perception de la douleur. Bien que la plupart des données actuelles proviennent d'études effectuées chez l'animal, les agonistes opioïdes ont un site d'action principalement spinal et supraspinal (Mansour et coll., 1995). Au niveau supraspinal, les récepteurs opioïdes μ , δ et κ et leurs ligands endogènes sont retrouvés dans plusieurs régions du cerveau dont la substance grise péri-aqueducale, le locus coeruleus, la substance noire, le bulbe rachidien, le cortex cérébral, le système limbique et le thalamus (Yoburn et coll., 1991; George et coll., 1994; Mansour et coll., 1995; Sim et Childers, 1997; Peckys et Landwehrmeyer, 1999; Xia et Haddad, 2001).

Les récepteurs opioïdes et leurs ligands endogènes sont aussi présents au niveau spinal. Dans la moelle épinière, la plus haute densité de récepteurs opiacés est retrouvée au niveau des *laminae* I et II et au niveau de la *substantia gelatinosa* de la corne dorsale. Les récepteurs μ et κ sont présents dans les couches superficielles, en particulier dans la *substantia gelatinosa*, où se terminent la plupart des fibres afférentes périphériques de faible diamètre qui transmettent les messages nociceptifs. En revanche, les récepteurs δ se retrouvent non seulement dans les couches superficielles de la corne dorsale mais aussi dans les couches profondes et au niveau la corne ventrale (Besse et coll., 1990; Mansour et coll., 1995). De façon générale, ce sont les récepteurs μ qui sont les plus abondants dans la moelle épinière, du moins chez les rongeurs. Ces récepteurs sont présents autant au niveau pré-synaptique que post-synaptique et jouent un rôle important dans le contrôle de la transmission d'influx nocif provenant des afférences périphériques (Abbadie et coll., 2002).

De récentes études évoquent également une action périphérique des récepteurs opiacés (Stein et coll., 2001). En effet, des récepteurs opioïdes (μ , δ et κ) ont été

retrouvés au niveau du système nerveux périphérique chez plusieurs espèces animales incluant le rat (Stein, 2003). De plus, plusieurs études démontrent que les récepteurs opioïdes et leurs ligands sont exprimés par différentes cellules immunitaires (McCarthy et coll., 2001).

4.2.4 LIGANDS ENDOGÈNES

Les récepteurs opioïdes sont la cible de neuropeptides dérivés de trois précurseurs protéiques distincts, la pro-enképhaline, la pro-dynorphine et la pro-opiomélanocortine (Akil et coll., 1998). Ces peptides sont synthétisés, d'une part, directement par des cellules exprimant le récepteur ou, d'autre part, par des cellules dont les terminaisons se retrouvent à proximité des fibres contenant ces récepteurs (ex : interneurons, projections neuronales, etc.). La maturation de la pro-enképhaline et de la pro-dynorphine conduit à l'expression d'une multitude de copies d'enképhalines (Met et Leu-enképhaline) et de dynorphines. En plus d'autres peptides biologiquement actifs (ex : ACTH), le gène codant pour la pro-opiomélanocortine conduit à la formation de β -endorphine (Vaccarino et Kastin, 2000). Bien qu'ils soient structurellement différents, ces peptides montrent un motif commun au niveau N-terminal –Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu – indispensable à l'activation des récepteurs opioïdes (Akil et coll., 1998). Des données récentes suggèrent la présence d'une autre classe de peptides, les endomorphines (Tyr-Pro-Trp/Phe-Phe-NH₂), qui se lieraient de façon spécifique au récepteur μ (Zadina et coll., 1997). Comme les endomorphines, la β -endorphine et les enképhalines exerceraient aussi leurs actions via le récepteur μ (Vaccarino et Kastin, 2000). Le récepteur δ intervient aussi dans les effets associés aux enképhalines et, possiblement, à la β -endorphine. Pour leur part, les récepteurs κ sont impliqués majoritairement dans l'action pharmacologique des dynorphines.

4.2.5 EFFETS PHARMACOLOGIQUES ASSOCIÉS À L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES

Bien que les récepteurs opioïdes possèdent quelques caractéristiques pharmacologiques qui se chevauchent, ils peuvent être distingués par certaines de leurs fonctions physiologiques. En effet, des études pharmacologiques chez les animaux de laboratoire, notamment chez les souris n'exprimant pas le gène d'un ou plusieurs récepteurs opioïdes, ont permis de mettre en évidence le rôle des trois récepteurs dans la douleur et leur potentiel thérapeutique pour d'autres indications cliniques (Kieffer, 1999; Filliol et coll., 2000; Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2002; Kieffer et Gaveriaux-Ruff, 2002). Le Tableau XIII présente les principales réponses pharmacologiques associées à l'activation des récepteurs μ , δ et κ suite à l'administration d'agonistes jugés spécifiques.

4.2.6 RÔLE DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES DANS LE CONTRÔLE DE LA DOULEUR D'ORIGINE INFLAMMATOIRE

Lors de la réaction inflammatoire, les médiateurs libérés par les cellules immunitaires favoriseraient la synthèse endogène des ligands et des récepteurs opioïdes et activeraient leur migration (rétrograde et antérograde) à l'intérieur des fibres nociceptives cutanées au niveau du site inflammé (Stein, 2003). Par exemple, chez le rat, il a été démontré qu'il y a une augmentation de la synthèse du récepteur δ et une présence accrue au niveau des terminaisons axonales des fibres nociceptives spinales, 72 heures après l'administration d'une dose unique d'ACF (Cahill et coll., 2003).

Tableau XIII. Principaux effets (+ : positifs; - : négatifs) des agonistes des récepteurs opioïdes.

Récepteurs	Réponses pharmacologiques
μ	<p>+ : Analgésie</p> <p>- : Dépression respiratoire, myosis, euphorie, réduction de la motilité gastro-intestinale, sédation, tolérance et dépendance physique</p>
κ	<p>+ : Analgésie</p> <p>- : Sédation, myosis, dysphorie</p>
δ^*	<p>+ : Analgésie, anxiolytique et anti-dépresseur</p> <p>- : Hyperactivité, convulsion et tolérance</p>

D'après Gaveriaux-Ruff et Kieffer, 2002.

Les réponses pharmacologiques **en caractères gras** représentent les effets les plus caractéristiques du récepteur donné.

4.3 LIGANDS SYNTHÉTIQUES DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES

4.3.1 DIFFÉRENTS TYPES DE LIGANDS SYNTHÉTIQUES DES RÉCEPTEURS OPIOÏDES

Les ligands synthétiques des récepteurs opioïdes peuvent être séparés en deux grandes catégories: les ligands peptidiques et les ligands non peptidiques (Tableau XIV). Les ligands peptidiques sont pour la plupart très sélectifs. Ceci s'explique principalement par le fait qu'ils sont des analogues de structure des ligands endogènes ou qu'ils ont été synthétisés suite à des études de modélisation de ces

récepteurs (Schiller, 1991; Schiller et coll., 1993). Cependant, l'utilisation de ces peptides à titre d'agent thérapeutique est souvent impossible par voie systémique ou orale, principalement en raison de leurs propriétés pharmacocinétiques désavantageuses (ex : demi-vie plasmatique courte, efflux actif, instabilité en milieu acide) qui rendent leur passage au niveau de leur site d'action très difficile (Chen et Pollack, 1997; Gentry et coll., 1999; Dagenais et coll., 2001). Par conséquent, les agonistes peptidiques synthétiques sont souvent administrés au niveau de leur site d'action (ex : au niveau central) afin d'engendrer la réponse pharmacologique désirée. De par leur grande sélectivité, ces composés sont souvent peu toxiques, même après administration intrathécale ou intracérébroventriculaire (Hruby et Agnes, 1999). Malheureusement, leur synthèse complexe et coûteuse décourage souvent les investisseurs et justifie rarement leur utilisation clinique. Pour cette raison, l'utilisation des peptides synthétiques est souvent réservée pour la caractérisation mécanistique des récepteurs opioïdes *in vitro* et *in vivo* dans un contexte préclinique.

En revanche, les ligands non peptidiques des récepteurs opioïdes possèdent des propriétés physico-chimiques leur permettant d'avoir un potentiel thérapeutique et économique important (Silverman, 1992). En effet, ces molécules sont souvent moins coûteuses à synthétiser que les peptides et peuvent être compatibles avec une administration systémique ou orale lorsque leur structure est optimisée. Pour ce faire, une molécule chef de file est le point de départ nécessaire et la structure du pharmacophore de la série se doit d'être caractérisée. Les propriétés physico-chimiques de la molécule doivent être modifiées sans altérer le pharmacophore dans le but d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques ou de moduler les propriétés pharmacodynamiques. L'optimisation de la structure permettra aussi d'améliorer le profil toxicologique de la molécule.

Tableau XIV. Liste (non exhaustive) de ligands des récepteurs opioïdes.

	Ligands sélectifs		Ligands non sélectifs	
	<i>Agonistes</i>	<i>Antagonistes</i>	<i>Agonistes</i>	<i>Antagonistes</i>
μ	DAMGO* Morphine Méthadone Fentanyl	CTOP*	Levorphanol Étorphine	Naloxone Naltrexone
κ	U50, 448 Dynorphin A	Nor-BNI	Levorphanol Etorphine Butorphanol	Naloxone Naltrexone
δ	DPDPE* Deltorphin II* SNC80 TAN-67	Naltrindole TIPP ψ *	Levorphanol Etorphine	Naloxone Naltrexone

(Resine et Pasternak, 1996)

* Ligand peptidique;

Les composés **en caractères gras** sont utilisés dans un contexte clinique.

4.3.2 LIGANDS SYNTHÉTIQUES NON PEPTIDIQUES DES RÉCEPTEURS μ : L'EXEMPLE DE LA MORPHINE

La morphine (Figure 8; poids moléculaire: 285 da) est le principe actif majeur de l'opium. Isolée en 1806 par Sertürner, elle fut synthétisée en 1952 par Gates et Tschudi (Glare et Walsh, 1991). Elle demeure encore aujourd'hui le traitement de choix pour le soulagement de la douleur modérée à sévère (Gutstein et Akil, 2001). L'utilisation de la morphine est favorisée par ses formulations variées et ses propriétés pharmacologiques puissantes et bien caractérisées (Foley, 2003).

4.3.2.1 Structure et propriétés physico-chimiques de la morphine

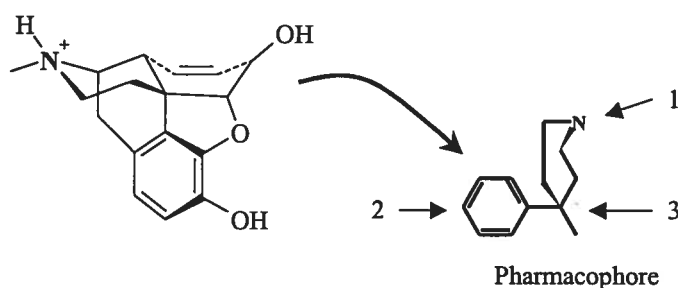


Figure 8. Structure chimique de la morphine et représentation de son pharmacophore (en caractère gras; voir description section 4.3.2.2).

La morphine possède une structure pentacyclique caractérisée par un noyau phénothène relié par un lien époxyde sur lequel est greffé un cycle pipéridine (Figure 8). Elle possède à la fois une fonction acide phénolique et une fonction amine tertiaire. La morphine est essentiellement basique (pKa amine tertiaire: 9,85) et se présente sous forme cationique à pH physiologique. Dans ces conditions, plus de 76% de la molécule se présentent sous forme ionisée. Bien que liposoluble, la morphine est une molécule relativement polaire qui se distribue plus ou moins facilement dans les lipides ($\log P$ (octanol/eau) = 0,76). La morphine possède cinq centres chiraux et seule la forme levogyre de la molécule est active. Ces différentes propriétés ont une influence majeure sur les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la morphine.

4.3.2.2 Le pharmacophore de la morphine et des morphinomimétiques

Résultat de plusieurs années de recherche dans le domaine des relations structure-activité des analgésiques et antagonistes opioïdes (Silverman, 1992), le pharmacophore de la morphine est maintenant bien défini (Figure 8):

1. Un atome d'azote protoné à pH physiologique qui a la capacité d'interagir avec le site anionique du récepteur
2. Un cycle aromatique séparé de trois atomes de carbone de l'azote
3. Un carbone quaternaire en position 1 du cycle aromatique

La morphine et tous les morphinomimétiques partagent ce squelette de base pour pouvoir se lier aux récepteurs opioïdes et produire une action analgésique. Bien que la morphine ait la capacité de se lier à tous les récepteurs opioïdes, elle possède beaucoup plus d'affinité pour le récepteur μ (Raffa et coll., 1992). Chez l'homme, la totalité des ligands opioïdes disponibles en clinique possèdent ce pharmacophore (Gutstein et Akil, 2001). Bien que la plupart de ces molécules (agonistes ou antagonistes) se lient principalement aux récepteurs μ , il existe quelques exceptions pour des composés mixtes (c.-à-d. à la fois agonistes/antagonistes) qui activent le récepteur μ ou antagonisent les récepteurs μ ou κ (Gutstein et Akil, 2001).

4.3.2.3 Propriétés pharmacocinétiques de la morphine chez l'homme et le rat

De façon générale, les effets pharmacodynamiques de la morphine sont similaires entre l'homme et le rat. Il existe cependant, chez le rat, des différences au niveau des effets secondaires (ex : rigidité à forte dose) ou au niveau de l'efficacité mitigée de la molécule après une administration orale (Milnes et coll., 1996). Cependant, il existe des différences pharmacocinétiques marquées entre les deux espèces. Le Tableau XV présente les paramètres pharmacocinétiques de la morphine chez l'homme et le rat

4.3.2.3.1 Biodisponibilité orale et absorption

Lorsque la morphine est administrée par voie orale au rat ou à l'homme, une fraction importante de la dose n'atteint pas la circulation systémique. En effet, la

1. Un atome d'azote protoné à pH physiologique qui a la capacité d'interagir avec le site anionique du récepteur
2. Un cycle aromatique séparé de trois atomes de carbone de l'azote
3. Un carbone quaternaire en position 1 du cycle aromatique

La morphine et tous les morphinomimétiques partagent ce squelette de base pour pouvoir se lier aux récepteurs opioïdes et produire une action analgésique. Bien que la morphine ait la capacité de se lier à tous les récepteurs opioïdes, elle possède beaucoup plus d'affinité pour le récepteur μ (Raffa et coll., 1992). Chez l'homme, la totalité des ligands opioïdes disponibles en clinique possèdent ce pharmacophore (Gutstein et Akil, 2001). Bien que la plupart de ces molécules (agonistes ou antagonistes) se lient principalement aux récepteurs μ , il existe quelques exceptions pour des composés mixtes (c.-à-d. à la fois agonistes/antagonistes) qui activent le récepteur μ ou antagonisent les récepteurs μ ou κ (Gutstein et Akil, 2001).

4.3.2.3 Propriétés pharmacocinétiques de la morphine chez l'homme et le rat

De façon générale, les effets pharmacodynamiques de la morphine sont similaires entre l'homme et le rat. Il existe cependant, chez le rat, des différences au niveau des effets secondaires (ex : rigidité à forte dose) ou au niveau de l'efficacité mitigée de la molécule après une administration orale (Milnes et coll., 1996). De plus, des différences pharmacocinétiques marquées entre les deux espèces sont observées. Le Tableau XV présente les paramètres pharmacocinétiques de la morphine chez l'homme et le rat

4.3.2.3.1 Biodisponibilité orale et absorption

Lorsque la morphine est administrée par voie orale au rat ou à l'homme, une fraction importante de la dose n'atteint pas la circulation systémique. En effet, la

biodisponibilité orale de la morphine est variable et oscille entre 20 à 50 % chez l'homme et chez le rat (Iwamoto et Klaassen, 1977; Baillie et coll., 1989; Osborne et coll., 1990; Westerling et coll., 1993). Bien que sa biodisponibilité soit plutôt faible, la morphine est rapidement et complètement absorbée après une administration orale chez l'homme et le rat (Brunk et Delle, 1974; Walsh et Levine, 1975; Iwamoto et Klaassen, 1977; Hasselstrom et coll., 1991; Hasselstrom et Sawe, 1993).

Tableau XV. Paramètres pharmacocinétiques moyens de la morphine chez l'homme et le rat.

Paramètres pharmacocinétiques	Homme	Rat
CL (L/hr/kg)	1,1-1,4	♂ : 4,0-6,2 ♀ : 2,2-2,3
V (L/kg)	2,1-4,0	10.6
Q _{ex} (%)	~ 10,0	♂ : ~ 20.0 ♀ : ~ 25.0
F _{orale} (%)	20-47	21
t _{max, oral} (h)	0,3-1.0*	~ 1.0*
Fraction libre (f _u)	0,8-0,9	0,7-0,9
Ratio sang-plasma	1,1	1,3

D'après Milne et coll., 1996 et Stuart-Haris, 2000.

* Solution orale

4.3.2.3.2 Distribution

Des études effectuées à partir de plusieurs espèces animales (rat et chien) montrent qu'après une administration intraveineuse, la morphine se distribue principalement

dans les organes bien perfusés comme les poumons, les reins, le foie, la rate, le cerveau et les muscles (Woods, 1954). D'un point de vue pharmacocinétique, le Tableau XV montre que le volume de distribution (V_z) de la morphine est plutôt élevé chez l'homme et chez le rat (Sawe et coll., 1981; Sawe et coll., 1985; Hasselstrom et coll., 1990; Osborne et coll., 1990; Westerling et coll., 1993).

Indépendamment de l'espèce, la morphine se lie faiblement aux protéines plasmatiques (Tableau XV) (Olsen, 1975; Judis, 1977; Patwardhan et coll., 1981; Mistry et Houston, 1987; Poyhia et coll., 1991; Milne et coll., 1992; Stain et coll., 1995). *In vitro*, la morphine est principalement liée à l'albumine et possède une faible affinité pour l'AGP (Olsen, 1975; Leow et coll., 1993). Le rapport des concentrations dans le plasma et dans le sang total est proche ou légèrement supérieur à 1 (Patwardhan et coll., 1981; Mazoit et coll., 1987; Mistry et Houston, 1987).

4.3.2.3.3 Élimination

Chez l'homme, la clairance systémique de la morphine est élevée et la clairance rénale contribue à moins de 10 % de la clairance totale (Tableau XV) (Milne et coll., 1996; Murthy et coll., 2002). En assumant un ratio sang-plasma de 1,1, sa clairance sanguine totale est égale ou supérieure au débit hépatique ($\sim 1,2$ L/h/kg; Obach, 1999). La clairance non-rénale, en l'occurrence le métabolisme hépatique, constitue donc la voie d'élimination majeure de la morphine chez l'homme (Milne et coll., 1996).

En accord avec les données obtenues chez l'homme, la clairance systémique de la morphine est élevée chez le rat, sa clairance sanguine étant la plupart du temps supérieure au débit hépatique (Tableau XV) (Mistry et Houston, 1987; Bhargava et coll., 1991; Horton et Pollack, 1991; Gardmark et coll., 1993). Contrairement à l'homme, il existe une différence marquée de clairance chez les rats mâles et femelles. En effet, la clairance de la morphine est presque deux fois inférieure chez le

rat femelle par rapport au rat mâle (Mistry et Houston, 1987; Horton et Pollack, 1991). L'origine de cette différence se situe au niveau du métabolisme hépatique puisque des études sur des perfusions de foie *in situ* de rat montrent que le coefficient d'extraction hépatique et la formation de normorphine dans le foie de mâles sont supérieurs à ceux obtenus chez le rat femelle (Rush et coll., 1983; Evans et Shanahan, 1995; Hasselstrom et Sawe, 1993).

Des études chez le rat et chez l'homme proposent la présence d'une troisième phase d'élimination, plus lente, qui serait le résultat de la libération de la morphine d'un compartiment profond et qui augmenterait son temps de résidence dans l'organisme (Hasselstrom et Sawe, 1993; Hasselstrom et coll., 1996). La circulation entérohépatique pourrait expliquer ce phénomène puisque la morphine libérée au niveau intestinal est éventuellement réabsorbée et entraîne une augmentation de son temps de résidence (Walsh et Levine, 1975; Dahlstrom et Paalzow, 1978; Ouellet et Pollack, 1995).

4.3.2.3.4 Métabolisme et profil d'excrétion de la morphine et de ses métabolites chez l'homme et le rat

Bien que certaines études *in vitro* suggèrent que des organes tels que les reins et le petit intestin pourraient contribuer à la biotransformation de la morphine, le foie demeure le site de métabolisme principal chez l'homme et le rat (Milne et coll., 1996). En raison de ses propriétés physico-chimiques (groupement phénolique libre et groupement alcool allylique libre), le métabolisme de la morphine est principalement dépendant des enzymes de phase II (ex : glucuroconjugaison, sulfoconjugaison) et des enzymes de phase I (CYPs) (Figure 9). Chez l'homme, indépendamment de la voie d'administration, la morphine est excrétée principalement dans les urines sous forme de métabolites (> 70 %). Moins de 10 % de la dose est retrouvée sous forme inchangée (Sawe, 1986). Chez le rat, seulement 40 % de la dose est retrouvée dans les urines après une administration sous-cutanée et moins de 20 %

de la dose est retrouvée sous forme inchangée après 24 heures (Oguri et coll., 1970; Yeh et coll., 1977b).

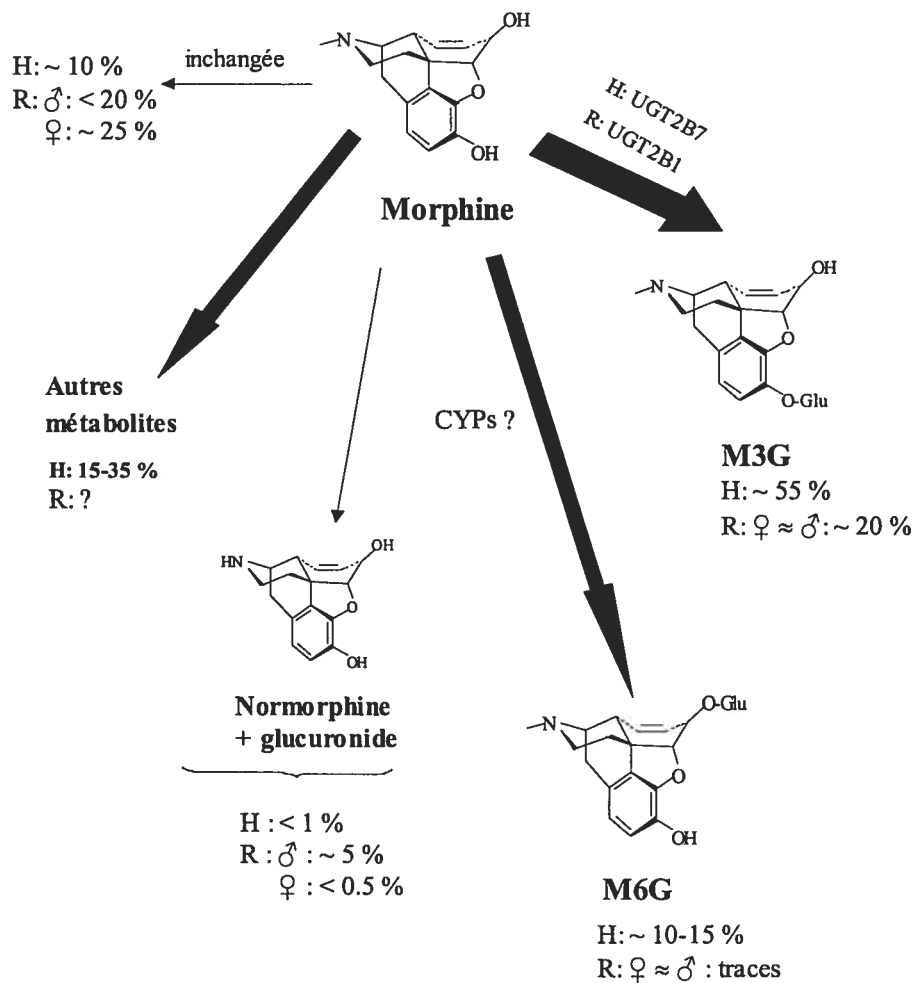


Figure 9. Profil urinaire de la morphine et de ses principaux métabolites après une administration intraveineuse chez l'homme (H), sous-cutanée chez le rat (R) mâle (♂) ou femelle (♀).

4.3.2.3.4.1 Glucuronoconjugaison de la morphine

Chez l'homme, la majeure partie de la clairance de la morphine est due à sa biotransformation en morphine-3-glucuronide (M3G) et, en moindre importance, en morphine-6-glucuronide (M6G) (Hasselstrom et Sawe, 1993). Après une administration intraveineuse ou orale de morphine à des sujets sains, plus de 55 % de la dose est retrouvé sous forme de M3G, comparativement à 10 à 15 % sous forme de M6G (Oguri et coll., 1970; Yeh et coll., 1977a; Fromm et coll., 1997). Bien que la glucuronoconjugaison demeure la voie majeure d'élimination de la morphine chez le rat, la fraction de la dose excrétée sous forme de glucuronoconjugué dans les urines est moins élevée que chez l'homme (~ 20 % de la dose totale) (Kuo et coll., 1991). Ceci s'explique par le fait que les petits mammifères comme le rat excrètent préférentiellement dans la bile les molécules de poids moléculaire supérieur à 250 comme le M3G (poids moléculaire: 461 da) (Roberts et coll., 2002).

La régiosélectivité des UDP glucuronosyltransférases (UGTs) hépatiques qui catalysent les réactions de glucuronoconjugaison de la morphine diffère aussi entre ces deux espèces. En effet, bien que la M3G soit le métabolite majeur chez le rat, ce dernier est incapable de former la M6G en quantité suffisante pour être détectée dans le plasma et les urines après une administration sous-cutanée de morphine (Oguri et coll., 1970; Yeh et coll., 1977b). Ces observations sont en accord avec les données *in vitro* obtenues avec des microsomes de foie humain et de rat, puisque le ratio M3G/M6G après incubation de la morphine est respectivement de 6,1 et 89 (Kuo et coll., 1991). Ces données sont supportées par des études plus récentes utilisant des microsomes contenant des UGTs recombinantes. En effet, l'UGT2B7 humaine a la capacité de former la M3G et la M6G en quantité appréciable à partir de la morphine alors que son homologue chez le rat, l'UGT2B1, forme de grandes quantités de M3G et des quantités négligeables de M6G (King et coll., 2000).

La glucuroconjugaison est souvent considérée comme étant une réaction de détoxication qui supprime l'activité pharmacologique et diminue la toxicité d'une entité chimique. En effet, le métabolite majeur de la morphine, le M3G, possède une faible affinité pour le récepteur μ et est dénué d'effet analgésique chez l'homme et le rat (Chen et coll., 1991; Penson et coll., 2000; Penson et coll., 2001; Ulens et coll., 2001). En revanche, le M6G possède une activité pharmacologique appréciable, *in vitro* et *in vivo*, et ce aussi bien chez l'homme que chez le rat (Abbott et Palmour, 1988; Sullivan et coll., 1989; Chen et coll., 1991; Hanna et coll., 1991; Ulens et coll., 2001). En effet, bien que celle-ci ne soit pas supérieure à celle de la morphine, l'affinité du M6G est de l'ordre du nanomolaire pour le récepteur μ (Penson et coll., 2000). Des études récentes chez l'homme supportent la contribution du M6G à l'effet analgésique de la morphine (Murthy et coll., 2002).

4.3.2.3.4.2 La N-déméthylation de la morphine

Chez l'homme et le rat, la N-déméthylation de la morphine est une voie métabolique mineure via laquelle la morphine est convertie en normorphine, qui est à son tour glucuroconjugée et éliminée dans les urines (Oguri et coll., 1970; Yeh et coll., 1977a; Yeh et coll., 1977b; Zhou et coll., 1993; Fromm et coll., 1997). En comparaison avec l'homme, le rat forme une quantité plus importante de normorphine *in vivo* (e.g. ~5 % par rapport à ~1 %) (Klutch, 1974). *In vitro*, dans les microsomes de rat, la morphine est métabolisée en normorphine par un processus dépendant du NADPH, vraisemblablement par l'intermédiaire des CYPs (Rane et coll., 1985).

Chez le rat, la N-déméthylation de la morphine dépend du sexe. En effet, des études *in situ* et *in vivo* suggèrent que le rat femelle forme beaucoup moins de normorphine que le rat mâle (Rush et coll., 1983; Evans et Shanahan, 1995; Lasagna et Kornfeld, 1958). Puisque le rat femelle n'exprime pas de CYP2C11, ceci laisse supposer que l'isoforme CYP2C11 serait le principal responsable de la N-déméthylation de la

morphine chez le rat mâle. Ces modifications métaboliques pourraient expliquer, en partie, la plus faible clairance obtenue chez les rats femelles (Tableau XV). Tout comme la M6G, la normorphine possède des propriétés analgésiques chez l'homme et le rat (Lasagna et Kornfeld, 1958; Sullivan et coll., 1989). Avant nos travaux, la ou les isoenzymes responsables de la formation de normorphine n'avaient jamais été identifiés chez l'homme.

4.3.2.3.4.3 La sulfoconjugaison de la morphine et autres voies métaboliques

Une autre voie enzymatique de phase II implique la sulfoconjugaison de la morphine en morphine-3-sulfate (M3S). Cette voie enzymatique est non-négligeable chez l'homme (~10-15 %) et semble importante chez le rat, surtout chez la femelle (Boerner, 1975; Milne et coll., 1996). Tout comme la M3G, la M3S a très peu d'affinité pour le récepteur μ *in vitro* (Chen et coll., 1991). D'autres métabolites ont aussi été détectés dans l'urine chez l'homme, notamment la morphine-3,6-glucuronide, la morphine-*N*-oxyde, la normorphine-3-glucuronide, la normorphine-6-glucuronide et même la codéine (Oguri et coll., 1970; Yeh et coll., 1977a). Ensemble, tous ces métabolites ne représentent qu'environ 15 à 35 % de tous les métabolites de la morphine.

4.3.3 **LIGANDS SYNTHÉTIQUES NON PEPTIDIQUES SÉLECTIFS POUR LE RÉCEPTEUR δ**

La pharmacothérapie actuelle compte principalement sur les agonistes des récepteurs μ comme la morphine pour soulager la douleur (Gutstein et Akil, 2001). Cependant, ces derniers sont caractérisés par une multitude d'effets secondaires, notamment la dépression respiratoire, la constipation et les phénomènes de tolérance et de dépendance (Gutstein et Akil, 2001). Bien que l'utilisation d'agonistes spécifiques des récepteurs κ ait aussi été évoquée, les effets secondaires centraux associés à ces

molécules (dysphorie) limitent leur utilisation clinique. C'est pourquoi de nouvelles cibles doivent être envisagées afin de créer de nouveaux médicaments capables de soulager efficacement la douleur tout en minimisant les effets indésirables. Chez l'animal, plusieurs études utilisant des peptides synthétiques suggèrent que l'ajout d'agonistes sélectifs δ à l'arsenal thérapeutique pourrait permettre de soulager la douleur tout en évitant les effets secondaires associés aux agonistes μ et κ (Quock et coll., 1999). Les agonistes des récepteurs δ , sont particulièrement efficaces pour soulager la douleur de type inflammatoire (Fraser et coll., 2000a; Dondio et coll., 2001; Cahill et coll., 2003). Le récepteur δ représente donc une cible attrayante pour le soulagement de la douleur inflammatoire chronique.

Puisque l'utilisation de peptides synthétiques n'est pas compatible avec une administration systémique ou orale, les recherches se sont orientées vers les agonistes non peptidiques des récepteurs δ . Au moins trois classes de ligands non peptidiques des récepteurs δ ont vu le jour depuis le milieu des années 1990. Les deux premières classes ont été construites à partir d'une notion de chimie médicinale appelée relation « message-adresse ». Cette dernière a été appliquée au récepteur δ à partir de données obtenues avec des ligands peptidiques endogènes sélectifs tels que la Met-enképhaline ou la Leu-enképhaline (Portoghese et coll., 1990; Portoghese, 1991). Le « message », impliqué dans la transduction du signal, serait attribuable à un résidu tyrosine de l'enképhaline alors que la portion « adresse » aromatique serait déterminante pour la sélectivité entre les récepteurs opioïdes. Ceci a conduit à la création d'antagonistes sélectifs du récepteur δ tels que les oxymorphindoles et leur version simplifiée, les octahydroisoquinolines (SB-205588) (Figure 10) (Dondio et coll., 1997; Coop et coll., 1999). Le (-)-TAN-67 (Figure 10), une molécule ayant conservé la structure de base des octahydroisoquinolines, possède des propriétés agonistes pour le récepteur δ (Knapp et coll., 1995).

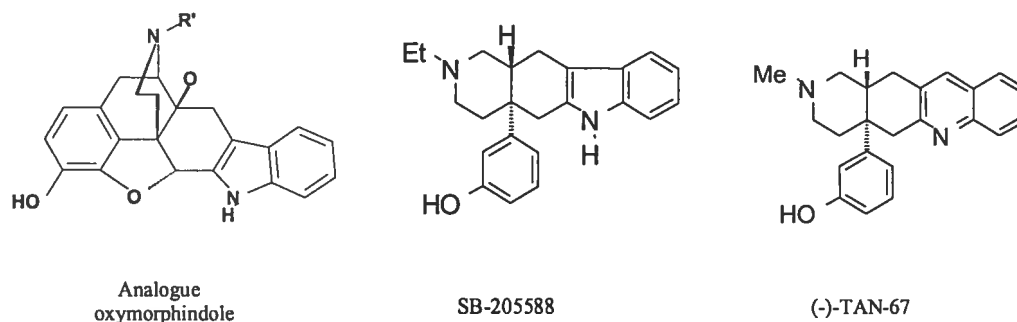


Figure 10. Structures chimiques d'un représentant oxymorphindole, du SB-205588 et du (-) TAN-67.

4.3.3.1 Les arylméthylpiperazine *N, N*-diéthylbenzamides (diarylpipérazines) de première génération : le SNC80

Les molécules les plus étudiées de tous les agonistes non peptidiques des récepteurs δ , les diarylméthylpiperazines, possèdent probablement une relation structure-activité et une orientation spatiale différentes, comme le suggèrent des études récentes qui ont comparé leur positionnement au niveau du site actif du récepteur δ avec celui de certaines octahydroisoquinolines, de morphinans ou de oxymorphindoles (Coop et Jacobson, 1999; Furness et coll., 2000). *In vitro*, un des représentants des diarylpipérazines, le SNC80, est 6 à 7 fois plus efficace que le (-) TAN-67 pour activer le récepteur δ humain (Quock et coll., 1997). Selon la théorie du « message-adresse », les diarylpipérazines possèdent une « adresse » non aromatique, soit la fonction diéthylamide. La plupart de ces molécules sont dérivées du (\pm)-BW373U86, une molécule synthétisée par Burroughs-Wellcome au début des années 1990 (Chang et coll., 1993; Comer et coll., 1993). Sa faible activité analgésique *in vivo*, ses effets secondaires importants (convulsions parfois léthales) et sa composition racémique ont rapidement éliminé ce composé du développement préclinique. Ainsi sont nées

d'autres molécules plus prometteuses comme son isomère dextrogyre, le SNC86, et un analogue *O*-méthyléther du SNC86, le SNC80, ou un autre analogue, nommé le SNC121 (Calderon et coll., 1994) (Figure 11).

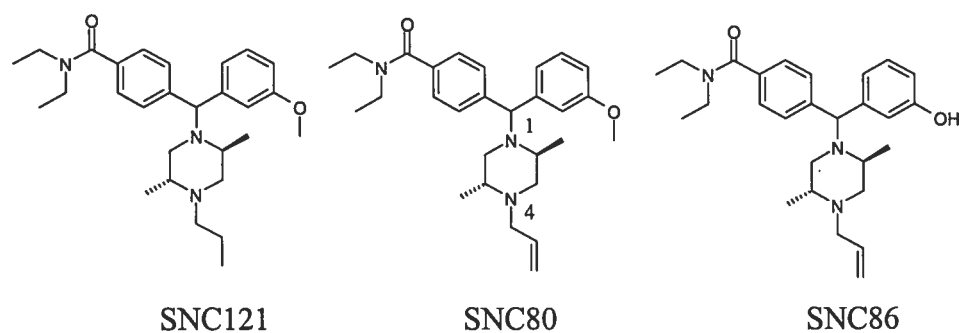


Figure 11. Structures chimiques du SNC121, SNC80 et du SNC86.

Les membres de cette famille de composés chimiques présentent un poids moléculaire assez important (> 400 da) et possèdent au moins trois centres chiraux (Calderon et coll., 1994). Leurs propriétés physico-chimiques ne sont pas très bien documentées. Cependant, l'examen de leur structure révèle que ces molécules sont essentiellement basiques. Les études de relation structure-activité montrent que la stéréochimie est importante, la forme dextrogyre étant habituellement la plus active au niveau du récepteur δ (Calderon et coll., 1997). Comme chez les morphinomimétiques, l'azote (chargé) de la pipérazine en position 4 est essentiel à la liaison de la molécule au récepteur δ (Calderon et coll., 1994). L'atome d'azote protoné (N4) de la pipérazine interagirait avec un résidu aspartate (Asp128) au niveau du troisième passage transmembranaire du récepteur (Figure 12) (Valiquette et coll., 1996). Le groupement *N,N* alkylbenzamide (en position 4 du cycle aromatique; *para*) est quant à lui un élément structural important permettant à ces molécules de conserver leur affinité et leur sélectivité pour le récepteur δ (Katsura et coll., 1997). Des études de mutagenèse dirigée suggèrent que le SNC80 interagit avec le récepteur

δ par l'entremise de liens hydrogène avec un résidu tryptophane (Trp 284) présent dans la troisième boucle extra-cellulaire (Figure 12) (Valiquette et coll., 1996).

Les résidus valine (Val296 et Val297) et leucine (Leu300) présents sur le même segment de la troisième boucle extracellulaire auraient aussi une importance quant à la sélectivité du SNC80 pour le récepteur δ (Valiquette et coll., 1996; Pepin et coll., 1997). Ces résidus hydrophobes non aromatiques interagiraient avec le cycle non benzamide de la molécule.

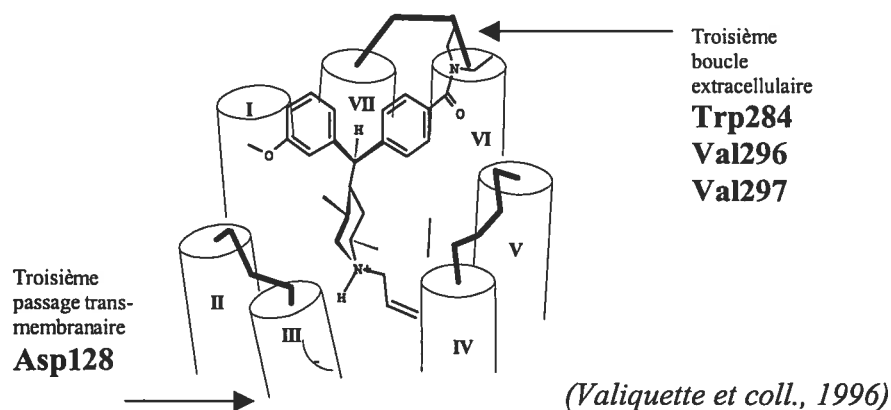


Figure 12. Positionnement suggéré du SNC80 dans le site de liaison du récepteur δ .

Ainsi, l'omission d'un ou de tous les groupements alkyles de l'amide conduit à une diminution importante de l'affinité de la molécule pour le récepteur δ . De même, l'apposition d'un groupement *N,N* alkylbenzamide en position 2 (*ortho*) ou 3 (*méta*) du cycle aromatique affecte aussi l'affinité et la sélectivité de la molécule par rapport au récepteur μ (Katsura et coll., 1997; Bishop et coll., 2003).

La présence du groupement diéthylamide semble aussi importante en ce qui concerne les propriétés agonistes et antagonistes de la molécule. Ceci est particulièrement vrai

avec les octahydroisoquinolines. Par exemple, la substitution du cycle aromatique composant la portion indole de l'antagoniste sélectif du récepteur δ (SB-205588) par un groupement diéthylamide attaché à la structure pyrrolique conduit à la nouvelle entité chimique SB-219825 (Figure 13). Grâce à l'ajout de cette portion diéthylamide et d'un groupement méthyle sur le noyau pyrrolique de la molécule, SB-219825 se superpose avantageusement au SNC80 dans les modèles *in silico* de liaison au site actif du récepteur δ (Dondio et coll., 1997; Dondio et coll., 2001). Il possède aussi des propriétés agonistes *in vitro* et est analgésique dans les modèles animaux.

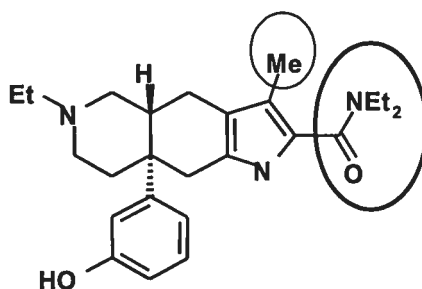


Figure 13. Structure chimique du SB-219825.

Chez les arylméthylpipérazine *N,N*-diéthylbenzamides, l'autre portion de la molécule (non benzamide) doit être un cycle aromatique ou un isostère. En raison de la complexité de la stéréochimie des arylméthylpipérazine *N,N*-diéthylbenzamides, il est difficile de définir exactement l'impact de la modification des groupements *N*-alkyl de la pipérazine ou de la substitution des groupements sur l'autre portion aromatique (non benzamide) de la molécule. Par exemple, des études *in vitro* mettent en évidence une affinité importante du racémique (\pm)-BW373U86 et du SNC86 pour le récepteur δ (Calderon et coll., 1997). Cependant, ces molécules sont plus ou moins sélectives et se lient aussi au récepteur μ (Knapp et coll., 1996). Bien qu'il soit un agoniste moins puissant que (\pm)-BW373U86 et SNC86 *in vitro*, le SNC80 devient, par simple

éthérisation de la fonction phénolique, un agoniste beaucoup plus sélectif pour le récepteur δ (Calderon et coll., 1997; Plobeck et coll., 2000).

Contrairement au (\pm)-BW373U86, le SNC80 est analgésique chez l'animal et présente un profil d'effets secondaires moins important (Bilsky et coll., 1995). Cependant, son activité après une administration systémique est faible et souvent de courte durée et les effets secondaires observés avec le (\pm)-BW373U86 (convulsion, hyperactivité) demeurent présents (Bilsky et coll., 1995; Fraser et coll., 2000b; Broom et coll., 2002). Bien que sa pharmacodynamie soit relativement bien caractérisée, la pharmacocinétique du SNC80 n'a jamais été évaluée chez le rat ou chez la souris. Chez le rat, des études *in vitro* suggèrent que le SNC80 est métabolisé de façon exhaustive par un processus NADPH dépendant (vraisemblablement les CYPs) dans les microsomes de foie (Plobeck et coll., 2000; Wei et coll., 2000). Les voies métaboliques majeures seraient la *N*-déallylation et la *O*-déméthylation qui, ensemble, représenteraient l'essentiel de son métabolisme dans les microsomes de rats (Plobeck et coll., 2000). De plus, les données *in vitro* et *in vivo* disponibles avec le SNC121, un analogue de structure du SNC80, suggèrent que le SNC80 pourrait être éliminé rapidement *in vivo*, principalement au niveau hépatique (Schetz et coll., 1996).

4.3.3.2 Les arylméthylpipérazine *N,N*-diéthylbenzamides de seconde génération : le SNC80 version simplifiée

Chez AstraZeneca R&D Montréal, le SNC80 a été choisi comme molécule chef de file pour la création d'une nouvelle génération d'agonistes δ de type diarylpipérazine (Plobeck et coll., 2000). Grâce à la simplification de la molécule (ARM 0, nouvelle molécule chef de file), des groupes pharmacophores clés ont pu être définis à l'aide de relations structure-activité systématiques et d'études de mutagenèse dirigée (Figure 14).

La simplification et les modifications de la molécule ont permis de réaffirmer l'importance du groupement de *N,N*-diéthylbenzamide et de sa position sur le cycle benzamide du second cycle aromatique et de l'azote chargé en position 4 de la pipérazine. De plus, l'élimination des groupements méthyle a permis de diminuer la taille des molécules et d'abolir deux centres chiraux. Aucune tendance claire n'a pu être établie au niveau des substitutions de l'azote en position 4 de la pipérazine. En revanche, la substitution du groupement phényl pour un groupement bicyclique (naphtyl, quinoléine ou isoquinoléine) a, quant à elle, mené à la découverte d'une série d'agonistes puissants, représentée par ARM434 (Figure 15), qui montre une forte affinité et une sélectivité importante pour le récepteur δ (Plobeck et coll., 2000). En comparaison avec le SNC80, l'ARM434 montre une stabilité métabolique *in vitro* accrue dans les microsomes de foie de rat, sa voie de métabolisme majeure semble être la *N*-déséthylation de l'amide (Plobeck et coll., 2000).

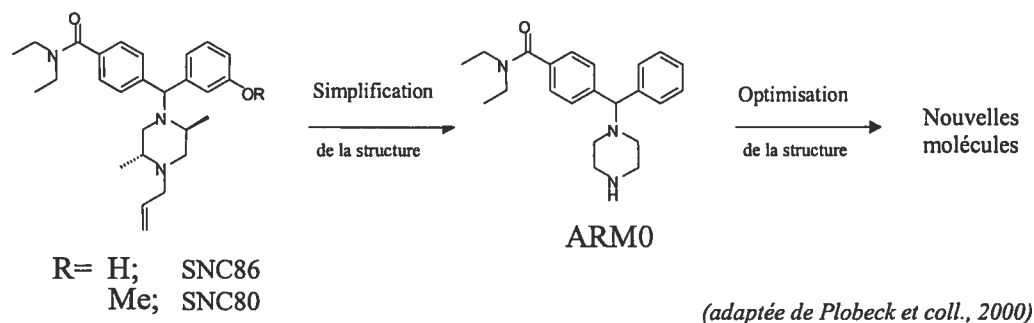
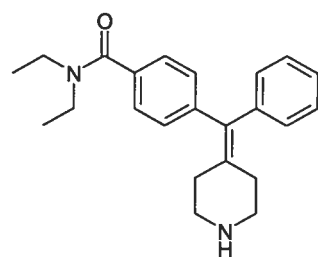


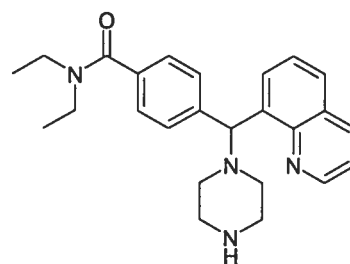
Figure 14. Stratégie de synthèse de nouveaux agonistes δ à partir du SNC80.

4.3.3.3 Les arylxylidèneméthylpipéridine *N,N*-diéthylbenzamides : le SNC80 version achirale

Le même groupe de chercheurs s'est ensuite orienté vers la création d'une structure achirale pouvant avoir les mêmes propriétés de liaison que les diarylpipérazines (Wei et coll., 2000). L'élimination du centre chiral simplifie la synthèse, élimine le coût de séparation de l'isomère actif et la caractérisation de son homologue inactif. Le remplacement de l'anneau pipérazine par un anneau pipéridine et un lien double carbone-carbone exocyclique pouvant relier les deux cycles aromatiques a conduit à la création d'une nouvelle classe d'agonistes δ avec une sélectivité exceptionnelle, supérieure aux diarylpipérazines. L'essentiel du pharmacophore présent chez les diarylpipéridines est conservé. La superposition des structures cristallographiques suggère que l'atome d'azote du cycle pipéridine et l'atome N4 du cycle pipérazine des diarylpipérazines sont importants pour la liaison au récepteur δ . En accord avec d'autres études portant sur la structure du SNC80 et de ses congénères, l'azote C1 du noyau pipéridine ne serait pas nécessaire à la reconnaissance du récepteur δ (Zhang et coll., 1999b). Enfin, des analyses de conformation suggèrent que c'est la rigidité de la structure des arylxylidèneméthylpipéridines qui confèrent à ces molécules une affinité importante au récepteur δ (Wei et coll., 2000). Le représentant de cette classe, ARM390 (Figure 14), montre une forte affinité, une sélectivité remarquable pour le récepteur δ et une stabilité métabolique *in vitro* accrue comparativement au SNC80 (Wei et coll., 2000). La stabilité métabolique et l'affinité dépendront de façon importante des substituants présents sur le cycle aromatique non benzamide et au niveau de l'azote de la pipéridine.



AR-M390



AR-M434

Figure 15. Structure chimique d'agonistes δ de nouvelle génération, ARM390 et ARM434.

5 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Bien que les propriétés pharmacologiques cliniques de la morphine et de ses métabolites soient pour la plupart bien caractérisées, les enzymes responsables de sa *N*-déméthylation chez l'homme n'avaient jamais été identifiées avant nos travaux. Des études *in vitro* avec des analogues structuraux de la morphine avaient proposé que cette dernière soit *N*-déméthylée par le CYP3A4, mais ceci n'avait jamais été prouvé de façon expérimentale. L'hypothèse supportant les travaux présentés au Chapitre II de cette thèse était donc que la *N*-déméthylation de la morphine était catalysée par des CYPs, particulièrement le CYP3A4.

Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les médiateurs libérés lors de la réaction inflammatoire ont la capacité d'altérer de façon différentielle l'activité ou la synthèse de protéines hépatiques telles les CYPs et les PPAs. L'hypothèse sous-jacente aux travaux présentés au Chapitre III de cette thèse était que l'ACF utilisé pour provoquer un état d'hyperalgésie inflammatoire chez le rat pouvait entraîner une chute du contenu et de l'activité de certains CYPs hépatiques et que l'intensité de la réaction inflammatoire engendrée par la présence de médiateurs inflammatoires pourrait expliquer ces modifications.

Bien que sa pharmacodynamie soit relativement bien caractérisée, la PK du SNC80 n'avait jamais été évaluée chez le rat. Des études *in vitro* préliminaires ont montré que le SNC80 était métabolisé de façon exhaustive par un processus NADPH dépendant dans les microsomes de foie de rat. Les observations présentées en introduction suggèrent que l'administration d'agents inflammatoires altère la pharmacocinétique des bases faibles principalement éliminées par métabolisme hépatique chez le rat. Par conséquent, l'hypothèse ayant mené à la réalisation des travaux présentés au Chapitre IV était que le SNC80 (une base faible) serait éliminé de façon prédominante par métabolisme hépatique (vraisemblablement via les CYPs)

et que l'ACF utilisé pour provoquer un état d'hyperalgésie inflammatoire entraînerait une altération de son métabolisme *in vitro* et de sa pharmacocinétique.

En raison du potentiel thérapeutique important associé aux agonistes des récepteurs δ , le SNC80 a été choisi comme molécule chef de file pour la synthèse d'une nouvelle génération d'analgésiques chez AstraZeneca R&D Montréal. Des études préliminaires ont montré que plusieurs de ces molécules présentent une stabilité *in vitro* supérieure au SNC80 (voir Chapitre I, section IV). L'hypothèse supportant les travaux présentés dans le Chapitre V de cette thèse était que le SNC80 présenterait des propriétés pharmacocinétiques défavorables à son développement pré clinique et clinique, et que la création de nouveaux agonistes δ avec une stabilité métabolique *in vitro* accrue pourrait permettre d'obtenir des molécules avec un profil pharmacocinétique plus favorable.

Les objectifs expérimentaux de ces travaux consistaient donc à :

1. Identifier et caractériser l'enzyme ou les enzymes responsables de la *N*-déméthylation de la morphine en normorphine chez l'homme.

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode analytique par chromatographie liquide à haute performance couplée à un spectromètre de masse (HPLC-MS) permettant de mesurer la morphine et ses métabolites dans les matrices biologiques. Puis nous avons réalisé des études in vitro caractérisant la N-déméthylation de la morphine en utilisant des microsomes de foie humain et des systèmes recombinants exprimant des CYPs humains (cellules d'insectes transfectées).

2. Déterminer si l'ACF utilisé pour provoquer un état hyperalgésique chez le rat pouvait entraîner une altération du contenu et de l'activité des CYPs au niveau du foie et vérifier si des modifications éventuelles pouvaient être expliquées par la

présence de médiateurs ou de marqueurs de l'inflammation au niveau plasmatique.

Nous avons préparé des microsomes de foie de rats et les avons phénotypé à l'aide de différentes approches in vitro (c.à-d.. techniques d'électrophorèse-immunobuvardage et de mesures d'activités catalytiques à l'aide de substrats spécifiques). Nous avons ensuite quantifié différents marqueurs et médiateurs de l'inflammation pouvant être présents au niveau plasmatique tels que les cytokines, le NO et l'AGP.

3. Caractériser le métabolisme et la pharmacocinétique du SNC80 chez les rats normaux et hyperalgésiques.

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode analytique par HPLC-MS permettant de mesurer le SNC80 et son métabolite O-déméthylé (SNC86) dans les matrices biologiques. Nous avons par la suite mesuré la disparition du SNC80 dans les microsomes de foie de rats normaux et hyperalgésiques. Nous avons utilisé des modèles de prédiction in vitro et déterminé le profil d'excrétion (urine et fèces) du SNC80 chez les rats normaux afin de confirmer le rôle prédominant du métabolisme dans son élimination. Puis nous avons mesuré sa liaison à l'AGP, à l'albumine et aux protéines plasmatiques totales dans le plasma de rats normaux et hyperalgésiques. Enfin, nous avons caractérisé le profil pharmacocinétique du SNC80 après administration orale et intraveineuse à des rats normaux et hyperalgésiques.

4. Évaluer le profil métabolique, pharmacocinétique et pharmacologique d'un agoniste δ sélectionné.

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode analytique permettant de mesurer un nouvel agoniste δ (ARM390) et son métabolite N-déséthylé dans les matrices biologiques. Nous avons ensuite évalué et comparé le profil métabolique du SNC80 et de l'ARM390 dans les microsomes de foie de rats dans le but d'identifier leurs

métabolites majeurs. Nous avons ensuite mesuré la disparition de l'ARM390 dans les microsomes de foie de rats. Puis nous avons utilisé des modèles de prédiction in vitro chez le rat afin de vérifier le rôle du métabolisme dans son élimination. De plus, nous avons caractérisé le métabolisme et le profil pharmacocinétique d'ARM390 après administration orale et intraveineuse à des rats normaux. Enfin, nous avons évalué la pharmacodynamie in vitro de cet agoniste et de son métabolite majeur dans deux essais pharmacologiques utilisant des membranes de cerveau de rats et des membranes de cellules clonées avec les récepteurs μ , δ ou κ humains.

CHAPITRE II

Articles scientifiques

ayant pour sujet principal la morphine

I – PREMIER ARTICLE

A rapid and simple method to determine morphine and its metabolites in rat plasma by high-performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry

A RAPID AND SIMPLE METHOD TO
DETERMINE MORPHINE AND ITS
METABOLITES IN RAT PLASMA BY HIGH-
PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY COUPLED TO MASS
SPECTROMETRY

Denis Projean, The Minh Tu and Julie Ducharme

Journal of Chromatography B. 2003, 787(2): 243-53

ABSTRACT

A rapid and simple method for the determination of morphine (M), normorphine (NM), morphine-3-glucuronide (M3G) and morphine-6-glucuronide (M6G) in plasma by high-performance liquid chromatographic separation with mass spectrometric detection (HPLC-MS) has been developed. Samples (40 μ L) were cleaned-up by protein precipitation with two volumes (80 μ L) of acetonitrile and reconstituted in formic acid 0.1% in water. Naloxone was used as internal standard. Analytes were separated on a phenyl-hexyl column using a step-gradient (1 mL/min) of acetonitrile and formic acid in water. Acetonitrile was added post-column (0.3 mL/min). Quantification of morphine and its metabolites was achieved with an Agilent 1100 series HPLC-MS system equipped with electrospray interface set to selected ion-monitoring (SIM) mode. Calibration curves covered a wide range of concentrations (2.44 to 10000 nM) and were best fitted with a weighed quadratic equation. The limits of quantification achieved with this method were 2.44 nM for M and 4.88 nM for NM, M3G and M6G. The method proved accurate (85-98 %), precise (CV <10%) and was successfully applied to a wide range of *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic studies in rodents.

1. INTRODUCTION

Morphine (M) is a μ -opioid agonist traditionally used for the treatment of moderate to severe pain [1]. It is extensively metabolized to its morphine-3-glucuronide (M3G), with normorphine (NM) and morphine-6-glucuronide (M6G) as minor metabolites (figure 1), irrespective of the specie or administration route [2, 3, 4]. The extent of formation of M metabolites, however, differs among species [2, 5]. Compared to humans, rats do not produce detectable amounts of M6G while they are able to form more NM [2, 6]. *In vitro*, M6G and NM possess high affinity for the μ -opioid receptor, although this affinity is not higher than that of morphine [7]. *In vivo*, M-6-G and NM are analgesic [8, 9, 10, 11, 12] and may therefore contribute to morphine-induced analgesia [14] or side effects [15], especially following long-term oral treatment. In contrast, M3G is devoid of antinociceptive properties and has been shown to antagonize morphine-induced analgesia in animal models [16].

Morphine is routinely used as a reference compound in drug discovery programs targeting new analgesics. In order to draw pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships and/or understand the impact of various disease states on PK, it is of interest to measure plasma concentrations of both M and its metabolites. Consequently fast, easy and reliable analytical methods are required to ensure adequate turnaround times. High sensitivity is also essential as sample volumes are very limited by the use of rodents for *in vivo* studies.

Various methods have been developed for the simultaneous determination of M and its metabolites in biological fluids. Immunological assays lack specificity between morphine and its metabolites. Their usefulness is therefore limited and lead to complicated data analyses when quantitative results are needed [17]. Several reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods have been described and report the separation of M and its metabolites using ultraviolet (UV) [17-18], fluorescence [19-21] or electrochemical [22-23] detections. UV suffers

from lack of sensitivity, often precluding the accurate description of the later part of the plasma concentration versus time curves. Electrochemistry may be very sensitive but M3G cannot be quantified by this method since it lacks an oxidizable phenolic group. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (MS) [24, 25], may offer adequate sensitivity but requires time-consuming sample preparation and derivatization procedures. Furthermore, morphine glucuronides have to be measured indirectly as total glucuronides, which results in a loss of precious information.

Recently, several reports have described analysis of M and its metabolites by RP-HPLC-MS [26-28] or RP-HPLC-tandem MS (MS-MS) [29-32] coupled to atmospheric pressure-electrospray ionization (AP-ESI). In spite of improved selectivity and sensitivity, the systems require highly qualified technical expertise (for tandem-MS) or extensive sample clean up relying mainly on solid phase or liquid-liquid extraction for optimal detector response. In order to provide robust and accurate data in a timely manner, we have developed and validated a new HPLC-MS assay that allows the determination of M and its major metabolites in rat plasma without any solid-phase or liquid-liquid extraction.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Chemicals and reagents

Morphine sulfate pentahydrate and formic acid were obtained from BDH (Toronto, Ontario, Canada). Normorphine hydrochloride and morphine-3-glucuronide were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Morphine-6-glucuronide was obtained from Lipomed (Cambridge, MA, USA). The internal standard (IS), naloxone hydrochloride, was purchased from RBI (Natick, MA, USA). HPLC grade acetonitrile and formic acid were obtained from VWR International

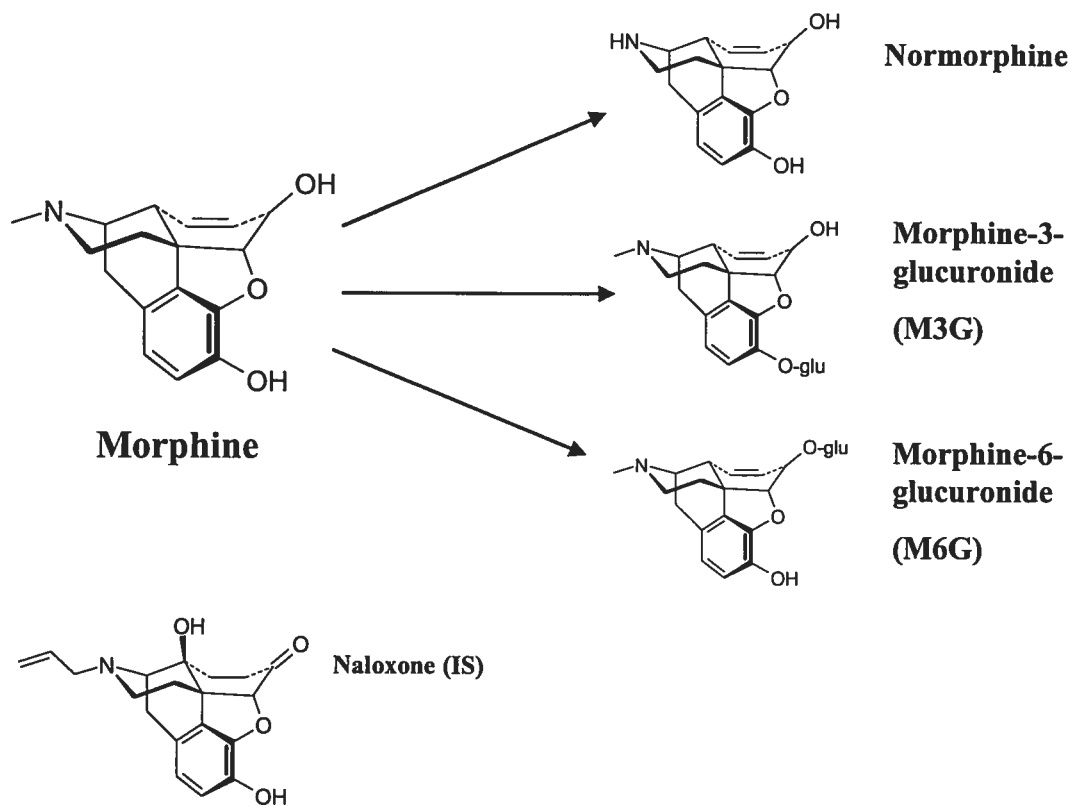


Figure 1. Chemical structures of morphine (M) and its metabolites, morphine- 3-glucuronide (M3G), morphine-6-glucuronide (M6G) and normorphine (NM).

(Montréal, Québec, Canada). Purified water was obtained using a NanoPure water purification system (Barnstead, Dubuque, IA, USA).

2.2 Preparation of stock solutions, calibration standards and quality control samples

Stock solutions (5 mM) of M3G, M6G, M, NM and the IS naloxone were prepared in purified water. Naloxone was diluted in 0.1 % formic acid in acetonitrile to a final concentration of 1 μ M. “Individual working solutions” (10 μ M) of M, NM, M3G, M6G and naloxone were prepared by diluting stock solutions in 0.1 % formic acid for optimization of chromatographic and MS conditions. M, NM, M3G and M6G stock solutions were combined and diluted with water to obtain a “pooled working solution” containing 1 mM of each of the four analytes. All solutions were stored in amber glass tubes and kept at -20 °C. Analytes did not interfere with each other and standard curves obtained with individual analytes were comparable with that obtained with the pooled solution.

Calibration standards and quality control (QC) samples were prepared on the same day by spiking appropriate amounts of two different “pooled working solutions” in drug free EDTA plasma obtained from Sprague-Dawley rats. The calibration curves were constructed using 12 to 13 concentrations points. For M, concentration points were 2.44, 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 and 10 000 nM. For NM, M3G and M6G, concentration points were 4.88, 9.77, 19.5, 39.1, 78.1, 156, 312, 625, 1250, 2500, 5000 and 10 000 nM.

These ranges cover the plasma concentrations expected in our experimental studies. Calibration curves, which relate the analytes concentration to the peak area ratio of analytes over the IS were best fitted with a quadratic equation weighed with 1/x factor. A quadratic regression was used for quantification since it produces a more accurate fit over a larger dynamic range compared to linear regression. QC sample

concentrations covered lower (10 nM), medium (400 nM) and higher (4000 nM) ranges of the standard curves. All QC and standards were kept at -80 °C.

2.3 HPLC-AP-ESI-MS analysis

The assay was performed using an Agilent 1100 series HPLC-MS system (Agilent technologies, Ville St-Laurent, Canada). Liquid chromatographic separations were achieved using a Luna 3 µm phenyl-hexyl column (4.6 x 75 mm) that was preceded by a phenyl-hexyl 3 µm guard column (4.6 x 30 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column temperature was kept constant at 40 °C. The mobile phase consisted of a mixture of 0.1 % formic acid in water (A) with 0.1 % formic acid in acetonitrile (B) and was delivered at a flow rate of 1 ml/min. A step-wise gradient of B into A was run over 5.5 min, after 3.5 min with A in isocratic mode. It consisted of a linear gradient increasing to 5 % of B over 1.5 min, followed by a rapid increase to 70 % of B over 4 min. A re-equilibration phase of 3 min was allowed between samples. An isocratic pump (Agilent technology, Ville St-Laurent, Canada) was programmed to deliver acetonitrile post-column at 0.3 ml/min via a post-column addition tee. The total flow rate delivered to the MS source was 1.3 ml/min.

The single quadrupole MS was equipped with an AP-ESI source and operated in selected ion-monitoring (SIM) mode. The protonated quasi-molecular ions were used to quantify NM ($m/z = 272$), M ($m/z = 286$), M3G and M6G ($m/z = 462$). MS parameters were set to facilitate the ionization process and achieve the best sensitivity. In order to minimize contamination of the AP-ESI source from potential endogenous interferences coming from the sample matrix, a switching-valve strategy was implemented. The LC flow was directed to the waste for the first 3 min following the injection before entering the source. The nebulizer pressure was set at 60 p.s.i.g., while the drying gas (nitrogen) was delivered at a flow rate of 13 L/min at a temperature of 350°C. Capillary voltage was set at 3.5 kV and the fragmentor (collision-induced dissociation cell) was set at 120 V from 3 to 7.2 min and at 150 V

from 7.2 to 9 min. These conditions allowed minimal fragmentation of the parent compound, optimal yield of its quasi-molecular ion and minimized interferences from the matrix. Chromatograms were integrated using the HP ChemStation software package (Rev 8.04) (Agilent technologies, Ville St-Laurent, Canada).

2.4 Sample preparation

Plasma samples were vortex-mixed briefly and aliquots (40 μ l) were transferred to microcentrifuge tubes. Proteins were precipitated by the addition of two sample volumes (80 μ L) of ice-cold acetonitrile containing the IS (1 μ M). Following precipitation, tubes were vortex-mixed and centrifuged at 16 000 x g for 10 min. Supernatants (100 μ L) were evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Dry residues were reconstituted with 40 μ l of 0.1 % formic acid, centrifuged for 10 min at 16 000 x g and aliquoted into 96-well plates. The plate was transferred to a refrigerated (4°C) autosampler and 3 to 20 μ L of samples were injected into the HPLC-MS system.

2.5 Assay Validation

2.5.1 Sensitivity and specificity

The limit of quantitation (LOQ) was determined as the minimum concentration that could be accurately and precisely quantified (lowest data point of the standard curve) [33]. The limit of detection (LOD on column) was defined as the amount that could be detected with a signal-to-noise ratio of 3. The specificity of the assay for the analytes versus endogenous substances in the matrix was assessed by comparing the lowest concentration in the calibration curves with reconstitutions prepared with blank plasma from five different rats.

2.5.2 Accuracy and precision

The accuracy and precision (presented as the coefficient of variation; CV) of the assay were determined using QC samples. Accuracy (%) was determined from the percentage ratio of measured over nominal QC concentration (mean of measured/nominal \times 100). Intra-day precision was determined by analyzing replicate aliquots of QCs (n=10/each concentration) on the same day. Inter-day precision was determined by repetitive analysis of QC samples (n=5-10) on 3 consecutive days.

2.5.3 Recovery and ionization

Recovery was determined by comparing cleaned-up QC samples and cleaned-up drug-free plasma spiked with appropriate amount of standards. The efficacy of ionization was assessed by comparing spiked cleaned-up drug-free plasma to standard mixtures prepared directly in the reconstitution solvent.

2.5.4 Stability

The effect of different storage conditions on sample stability was determined for each analyte using QC samples. In one set of experiments, QC samples (n=5/each concentration) were kept for 6 h at room temperature before sample precipitation-reconstitution. In a different set of experiments, the stability of processed samples in the autosampler was determined using precipitated-reconstituted QC samples (n=5/each concentration) that were stored in capped 96-well plates for 24 h at 4°C (temperature of the autosampler). Stability was assessed by comparing the mean concentration of the stored QC samples with the mean concentration of freshly prepared QC samples.

2.5.5 Application of the assay

The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of AstraZeneca R&D Montréal. Rats were treated with a single iv bolus (10 $\mu\text{mol/kg}$) of morphine. Multiple blood samples were collected from the tail vein up to 4 h post-dose in test tubes containing EDTA. Following centrifugation (3000 g x 10 min at 4°C), plasma was collected and stored immediately at -80°C until analysis.

3. RESULTS AND DISCUSSION

With the present method, following a simple protein precipitation from small volume samples (40 μl) and easy reconstitution steps, aliquots can be directly injected into the HPLC-MS system. The combined resolution and specificity of HPLC and MS allows maximum sensitivity from SIM analysis using only a single quadrupole. Since pharmacokinetic studies involve the analysis of numerous samples, the chosen method must combine accuracy and precision with speed and simplicity of execution.

3.1 Sample clean up and HPLC separation

In order to minimize sample preparation, our initial intention was to directly inject the diluted plasma samples after protein precipitation. Several solvents and diluted organic acids (e.g. 20 % trifluoroacetic acid) were investigated, but only acetonitrile provided efficient protein precipitation that was compatible with MS. When sample composition contained more than 20 % of organic solvent however, M and its metabolites were not adequately retained on analytical columns when MS compatible mobile phases were used. Consequently, the sample had to be evaporated and reconstituted in an aqueous solution (0.1 % formic acid) before injection into the HPLC-MS system.

Table I. Mean ionization efficiency and recovery of M and its metabolites

	Concentration (nM)	Ionization efficiency (mean, n=5) (%)	Recovery (mean, n=5) (%)
M	10	90	90
	400	94	91
	4000	98	90
NM	10	72	93
	400	71	91
	4000	86	89
M6G	10	113	78
	400	98	77
	4000	99	76
M3G	10	87	76
	400	94	70
	4000	97	70

Using this simple reconstitution step, analyte recovery ranged from 70 to 93 % (Table I). M and NM recoveries were equal or greater than 89 % at all concentrations tested while the glucuronide recoveries ranged from 70 % to 78 %. The lower recoveries observed may be explained by the polar nature of the glucuronide moiety or non-specific binding to certain components of the precipitated proteins.

Bioanalyses of complex mixtures consisting of small molecules often rely on HPLC-MS or MS-MS for the quantification of analytes. This can usually be achieved by targeting specific molecular masses or ion-transitions without extensive chromatographic separations [34]. However, since M3G and M6G possess identical mass to charge ratios and daughter ions corresponding to quasi-molecular ion of the parent compound, chromatographic resolution is a prerequisite. Consequently, a large variety of reversed-phase columns were investigated, including C₁₈, C₈, CN and phenyl-hexyl. The best separation was achieved with a Phenyl-Hexyl column using a step gradient of the mobile phase components. Complete separation was achieved within 8.0 min and analytes were detected at 3.9 (NM), 5.3 (M3G), 6.7 (M), 6.9 (M6G) and 7.5 min (IS). Analytes were identified on the basis of their retention times and mass spectra compared to individual standard solutions. Representative HPLC-MS chromatograms are presented in figure 2, 3 and 4. More than 300 samples were injected on the column without adversely affecting its chromatographic performance. This was made possible by regularly washing the column and changing the pre-column 0.5- μ m filter at the end of each day of analysis.

3.2 Ionization and MS conditions

An important concern when applying AP-ESI-MS to quantitative bioanalyses is the ionization process within the ESI source, whereby the ionization efficiency relies on the vaporization of the mobile phase into fine droplets [35]. Factors such as high aqueous proportions, the presence of endogenous substances coming from the matrix or the possible co-elution of analytes can alter the process whereby the analytes are transferred from the mobile phase to the gaseous phase as ions [36, 37].

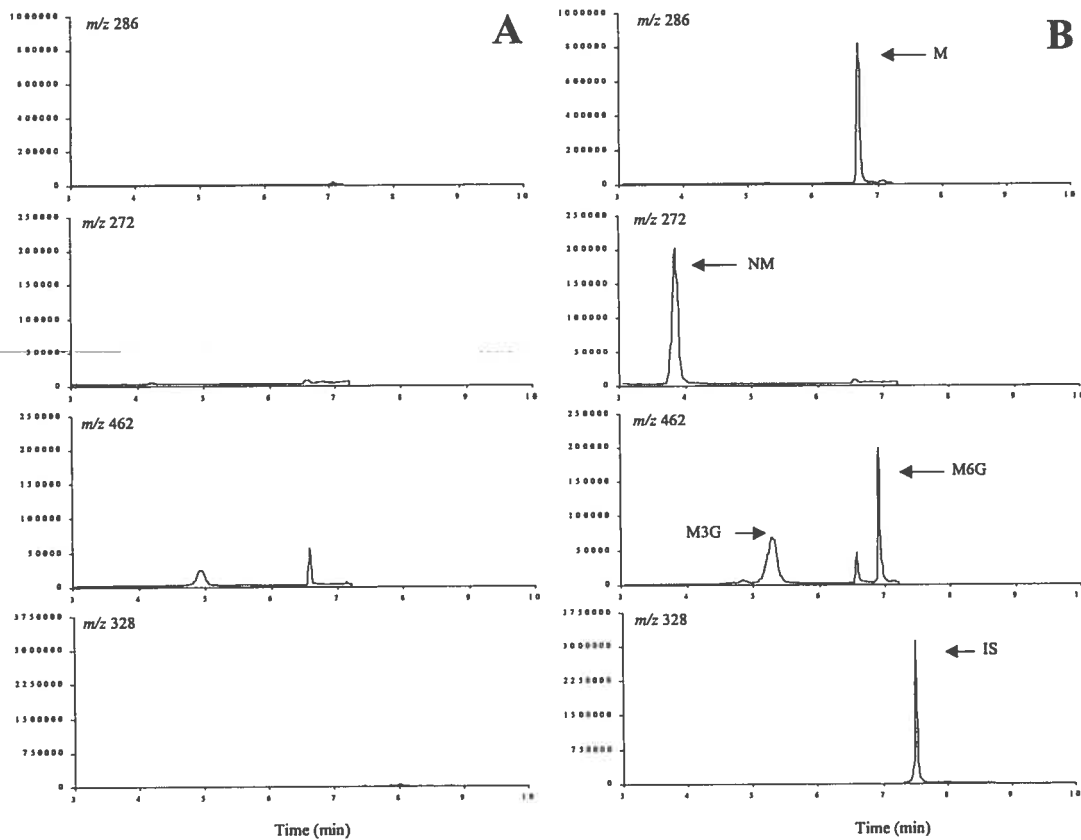


Figure 2. LC-MS chromatograms of drug-free plasma (A), rat plasma spiked with 150 nM of M, NM, M3G and M6G (B).

The quasi-molecular ions quantified were m/z 286 for M, m/z 272 for NM, m/z for M3G and M6G and m/z 328 for naloxone. Complete separation was achieved within 8.0 min and analytes were detected at 3.9 (NM), 5.3 (M3G), 6.7 (M), 6.9 (M6G) and 7.5 min (IS; naloxone).

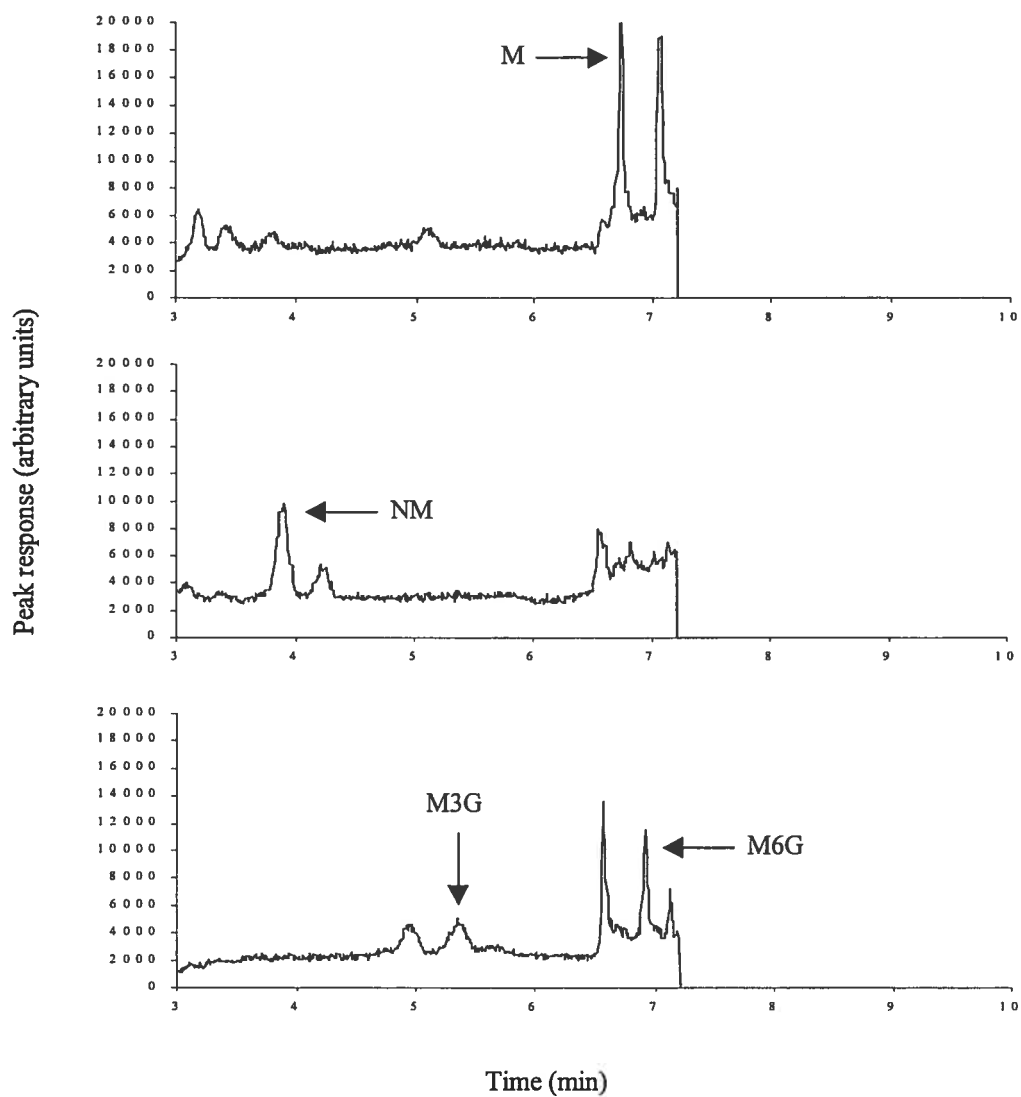


Figure 3. LC-MS chromatograms of rat plasma spiked with LOQ concentrations of M (2.44 nM), NM (4.88 nM), M3G (4.88 nM) or M6G (4.88 nM).

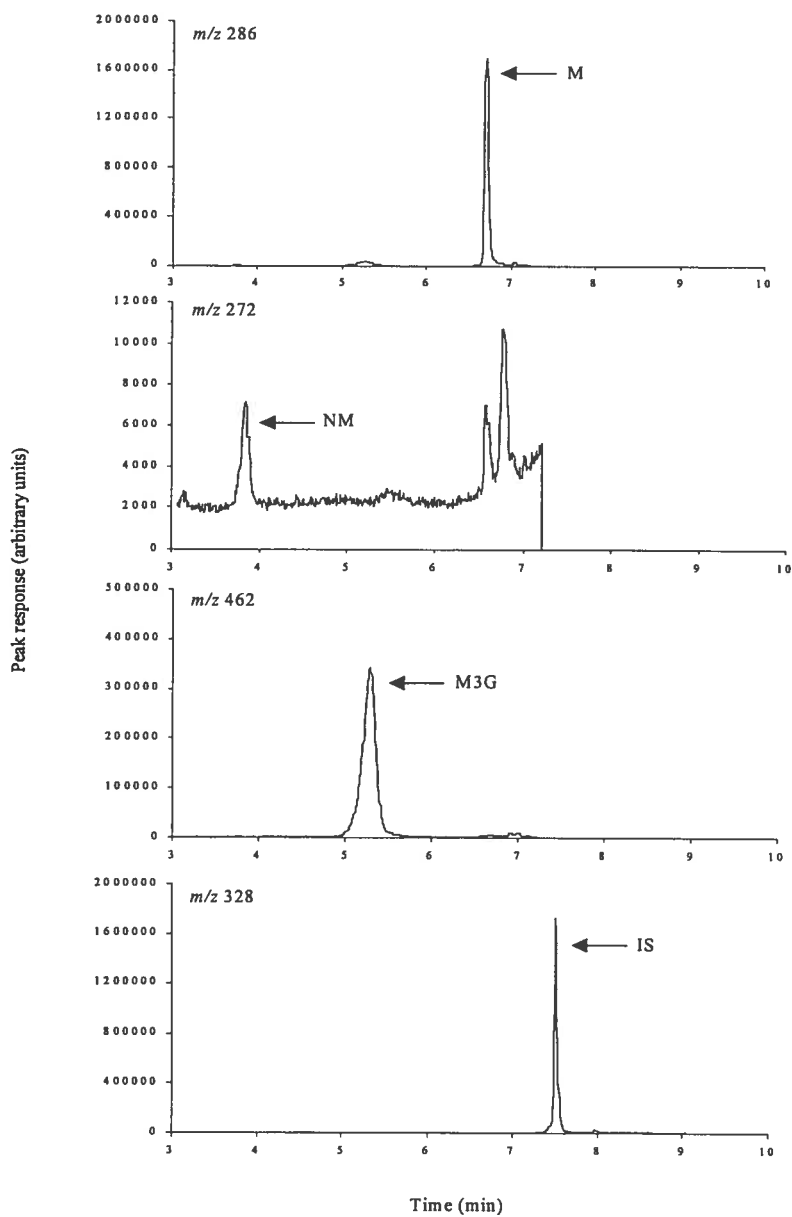


Figure 4. LC-MS chromatograms of a rat plasma sample collected one hour after an intravenous administration (10 $\mu\text{mol/kg}$) of morphine.

Measured concentrations were 666 nM for M; 7.7 nM for NM and 1427 nM for M3G.

Our experiment showed that post-column addition of acetonitrile improved the signal of NM and M3G. Since high proportions (> 85%) of aqueous phase were present when NM and M3G were eluting, the high surface tension of the mobile phase was adversely affecting the desolvation process into the ion source and resulted in poor ion formation when compared to M or M6G [38, 39]. Acetonitrile acted as a modifier, which reduced the radius of the droplet and enhanced ion formation.

Although chromatographic separation and post-column addition of acetonitrile were designed to maximize the ionization process, signal suppression could nevertheless occur since the MS detector only focused on selected ions (SIM mode). The results presented in Table I show that matrix suppression was minimal for M, M3G and M6G with a signal response always exceeding 85 %. On the other hand, NM appeared to be more affected, as it displayed a maximal signal suppression of 30 % in cleaned-up plasma samples compared to standard solutions.

3.3 Assay validation

Specificity was achieved by single quadrupole MS in SIM mode. Drug-free plasma showed no interfering peak with M, NM, M glucuronides or the IS at their respective retention times (figure 2A). To our knowledge, an HPLC-MS method with comparable sensitivity to HPLC- tandem MS has never been reported for quantitation of M and its metabolites. The sensitivity of the present assay was comparable or better than that reported in the literature from selected MS or MS-MS methods [26-32]. The absolute detection limits (signal to noise ratio =3) were 17, 10, 14 and 20 fmol for M, NM, M3G and M6G, respectively. The LOQ of the assay was 2.44 nM for M and 4.88 nM for its metabolites (figure 3).

Table II. Intra- and inter-day accuracy and precision data for M and its major metabolites

	Concentration (nM)	Intra-day (mean, n=10)		Inter-day (mean, n=3)	
		Accuracy (% nominal)	Precision (CV, %)	Accuracy (% nominal)	Precision (CV, %)
M	10	94	4.8	100	1.0
	400	96	1.9	92	3.9
	4000	91	3.1	87	5.0
NM	10	94	4.7	93	2.5
	400	95	1.4	93	0.1
	4000	97	3.3	94	2.9
M6G	10	86	6.0	94	7.0
	400	97	2.7	97	0.1
	4000	97	3.8	94	5.9
M3G	10	85	5.7	87	2.1
	400	95	3.0	95	3.3
	4000	98	5.9	95	5.0

CV : coefficient of variation

The method allowed accurate measures over a wide range of concentrations (5 orders of magnitude) and calibration curve determination coefficients (r-square) were better than 0.995. Residuals were always within 20 % of the nominal value. The method

was found to be accurate (91-98 %) for M and NM and 85-97 % accurate for M3G and M6G (Table II). The intra- and inter-day precisions are presented in Table II. Irrespective of the compound of interest or QC concentration, intra-assay precision (CV) was better than 6 % and inter-day precision (CV), determined on three consecutive days, never exceeded 7 %.

The effect of various storage conditions on sample stability is presented in Table III. The experimental protocols were selected to allow enough time for sample preparation and overnight injections. The results revealed that reconstituted samples stored in the refrigerated autosampler and samples kept at room temperature for 6 h were not substantially affected. For all analytes, calculated concentrations were within 20 % of the value obtained from “untreated” QC standards.

3.4 Application of the assay

The method was used to study the PK of morphine and its metabolites in rats. Figure 4 shows that M, M3G and NM were detected in plasma from one rat treated with a single iv bolus (10 $\mu\text{mol/kg}$) of morphine. The concentration versus time profile obtained over 4 h is comparable to those reported in the literature (figure 5) [32]. Micromolar concentrations of M were detected at 30 min and declined to approximately 100 nM at 4 h. The most abundant metabolite, M3G, surpassed levels of the parent compound after 30 min and its concentrations declined to approximately 1000 nM at 4 h. On the other hand, NM plasma concentrations never exceeded 30 nM and no detectable levels could be found after 1 h. This is in agreement with previous observation in morphine-treated rats where NM was found to be a minor metabolite in rat plasma and urine [4, 32]. In agreement with data obtained in the literature, M6G could not be quantitatively measured [2, 32].

Table III. Stability of M, NM, M6G and M3G after different storage conditions of QC samples.

	Concentration (nM)	24 h stability (4 °C) (mean, n=5) (% control)	6 h stability (22 °C) (mean, n=5) (% control)
M	10	109	117
	400	103	105
	4000	101	101
NM	10	86	88
	400	93	97
	4000	95	97
M6G	10	118	82
	400	98	111
	4000	97	105
M3G	10	101	87
	400	98	108
	4000	95	101

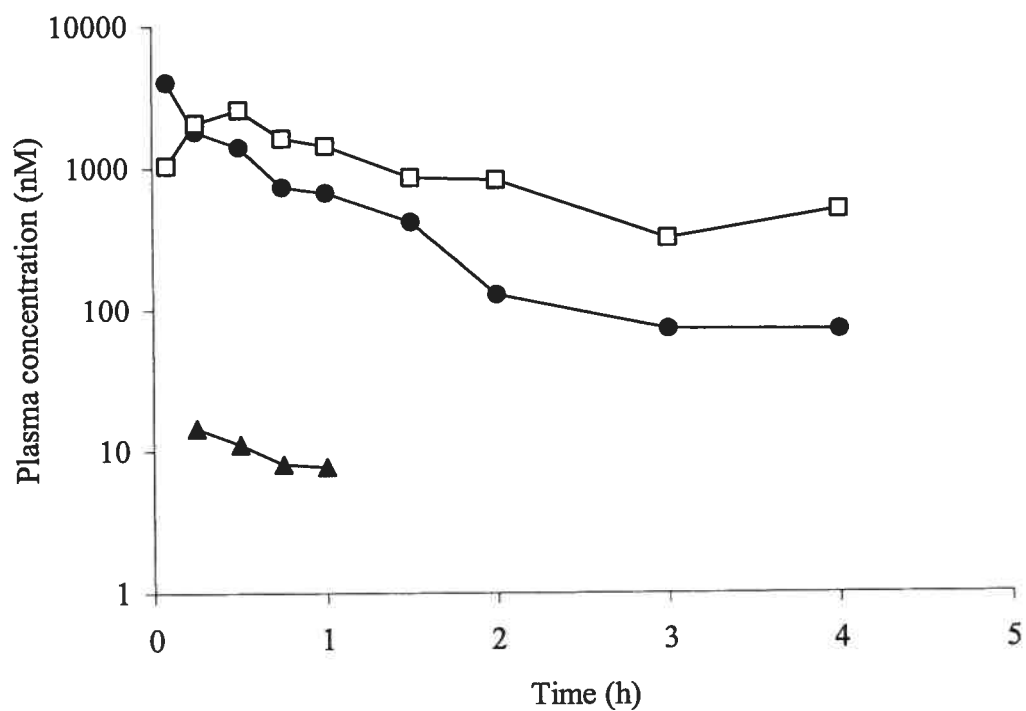


Figure 5. Plasma concentration versus time profile of M (●), M3G (□) and NM (▲) after a 10 $\mu\text{mol/kg}$ intravenous administration of morphine to one rat.

4. CONCLUSION

In conclusion, a simple HPLC-MS method has been developed for the rapid and precise determination of M and its metabolites in small plasma samples (40 μ L). Ninety-six samples could be prepared in a well-plate format within 3 h and a complete i.v. PK experiment (including calibration curves, QCs and samples obtained from 4 rats) could be analyzed in less than 24 h of injection time. From the very first sample collection to data processing, PK results could be provided to project teams in less than 3 days. Our results have demonstrated that HPLC-ESI-MS, together with a simple precipitation-reconstitution procedure, is an alternative to HPLC-MS or MS-MS methods that traditionally employed liquid-liquid or solid-phase extraction for the determination of M and its metabolites in biological fluids. The high sensitivity, rapid turnaround time and simplicity of the method make this technique particularly attractive for *in vitro* or *in vivo* PK studies.

5. NOTE

Part of this work was presented as an oral presentation at HPLC2002, Montréal, Canada, June 2002.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

AstraZeneca R&D Montreal is acknowledged for studentship assistance to Denis Projean. The authors would like to thank Heli Parenteau et H  l  ne Maurice for their excellent technical assistance in the rat PK studies.

7. REFERENCES

1. World health Organization, Cancer pain relief 2nd ed., World Health Organization, Geneva, 1986.
2. R.W. Milne, R.L. Nation, A.A. Somogyi, *Drug Met Rev*, 28 (3) (1996) 345.
3. S.Y. Yeh, C.W. Gorodetzky *J. Pharm. Sci*, 66 (1977) 1288.
4. S.Y. Yeh, H.A. Krebs, C.W. Gorodetzky, *J. Pharm. Sci*, 68 (1979) 133.
5. K.Oguri, S. Ida, H. Yoshimura, H. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull*, 18 (1970) 2414.
6. C.K. Kuo, N. Hanioka, Y. Hoshikawa, K. Oguri, H. Yoshimura, *J. Pharmacobiodyn*, 14 (1991) 187.
7. Z.R.Chen, R.J.Irvine, A.A. Somogyi, F. Bochner, *Life Sci*, 48 (1991) 2165.
8. F.V. Abbott, R.M. Palmour, *Life Sci*, 43 (1988) 1685.
9. R. Osborne, S. Joel, D. Trew, M. Slevin, *Lancet*, 1 (1988) 828.
10. L. Lasagna and T.J. Kornfeld, *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 124 (1958) 260.
11. A.F. Sullivan, H.J. McQuay, D. Bailey, A.H. Dickenson *Brain Res*, 482 (1989) 219.
12. K. Shimomura, O. Kamata, S. Ueki, S. Ida, K. Oguri, H. Yoshimura, H. Tsukamoto, *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 105 (1971) 45.

13. B.R.Murthy, G.M. Pollack, K.L.Brouwer, *J Clin Pharmacol*, 42 (2002) 569.
14. P.I. Thompson, S.P. Joel, L. John, J.A.Wedzicha, M. Maclean, M.L. Slevin, *Br J Clin Pharmacol*, 40 (1995) 145.
15. M.T. Smith, J.A. Watt, T Cradmond, *Life Sci*, 47 (1990) 579.
16. C.W Hand, R.A. Moore, H.J. Quay, M.C. Allen, J.W. Sears, *Ann. Clin. Biochem*, 24 (1987)
17. D. Bourquin, T. Lehmann, M. Bühler, R. Brenneisen, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*, 694 (1997) 233.
18. G.Chari, A. Gulati, R. Bhat, I.R. Tebett, *J. Chromatogr*, 571 (1991) 263.
19. P.A. Glare, T.D. Walsh, C.E. Pippenger, *Ther. Drug Monit*, 13 (1991) 226.
20. J. Huwyler, S. Rufer, E. Küsters, J Drewe, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*, 674 (1995) 57.
21. R.F. Venn and A. Michalkiewicz, *J. Chromatogr*, 525 (1990) 379.
22. A.W.E. Wright, J.A. Watt, M. Kennedy, T. Cramond, M. Smith, *Ther Drug, Monit*, 16 (1994) 200.
23. W.J. Liaw, ST. Ho, JJ. Wang, O.YP Hu, JH Li, *J. Chromatogr*, 714 (1998) 237
24. R.A. Tasker and K. Nakatsu, *Analyst*, 111 (1986) 563.

25. D.G. Watson, Q.Su, J.M. Midge, *J. Pharm. Bio. Anal*, 13 (1) (1995) 27.
26. N. Tyrefors, B. Hylbrant, L. Ekman, M. Johansson, B.Lågström, *J. Chromatogr A*, 729 (1996) 279.
27. R. Pacifici, S. Pichini, I. Altieri, A. Caronna, A.R. Passa, P. Zuccaro, *J. Chromatogr*, 664 (1995) 329.
28. P. Zuccaro, R. Ricciarello, S. Pichini, R. Pacifici, I. Altieri, M. Pelgrini, G. D'Ascenzo, *J. Annal. Tox.*, 21 (1997) 268.
29. M. Blanchet, G. Bru, M. Guerret, M. Bromet-Petit, N. Bromet, *J Chromatogr. A*, 854 (1999) 93.
30. G. Shänzle, S. Li, G. Mikus, U. Hofmann, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*, 721 (1999) 55.
31. MH Slawson, DJ Crouch, DM Andrenyak, DE Rollins, JK Lu, PL Bailey. *J Anal Toxicol*, 23(6) (1999) 468.
32. M. Zheng, K.M. McErlane, M.C. Ong, *J. Pharm. Bio Anal*, 16 (1997) 971.
33. ICH harmonized tripartite guideline, 1996.
34. D.T. Rossi, in D.T. Rossi and M.W. Sinz (editors).
35. BK Matszweski, M.L. Constantzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem*, 70 (1998) 882.

36. TL Constantopoulos, GS Jackson, CG Enke, *J Am. Soc. Mass Spectrom*, 10 (1999) 625.
37. Apffel, S. Fischer, G. Goldberg, P.C. Goodley, F.E. Kuhlmann, *J. Chromatogr. A*, 712 (1995) 177.
38. M.G. Ikonomou, A.T. Blades, P. Kebarle *Anal. Chem*, 63 (1991) 1989.
39. J. Eshraghi, S.K. Chowdhury *Anal. Chem*, 65 (1993) 3528.

II – DEUXIÈME ARTICLE

Identification of CYP3A4 and CYP2C8 as the major cytochrome P450s responsible for Morphine N-demethylation in Human Liver Microsomes

IDENTIFICATION OF CYP3A4 AND CYP2C8
AS THE MAJOR CYTOCHROME P450s
RESPONSIBLE FOR MORPHINE *N*-
DEMETHYLATION IN HUMAN LIVER
MICROSOMES

**Denis Projean, Pierre-Emmanuel Morin, The Minh Tu and
Julie Ducharme**

Xenobiotica. 2003, 33(8): 841-54

ABSTRACT

1. The present study was performed to identify the cytochrome P450 (CYP) enzymes responsible for the *N*-demethylation of morphine *in vitro*.
2. In human liver microsomes, normorphine formation followed Michaelis-Menten kinetics with mean K_m and V_{max} values of 12.4 ± 2.2 mM and 1546 ± 121 pmolmin⁻¹mg⁻¹, respectively. In microsomes from a panel of 14 human livers phenotyped for ten CYP enzymes, morphine *N*-demethylation correlated with testosterone 6 β -hydroxylation ($r= 0.91$, $p < 0.001$) and paclitaxel 6- α hydroxylation ($r= 0.72$, $p < 0.001$), two specific markers of CYP3A4 and CYP2C8, respectively. Normorphine formation decreased when incubated in the presence of troleandomycin or quercetin (by 46% and 33-36%, respectively), which further corroborates the contribution of CYP3A4 and CYP2C8.
3. Among eight recombinant human CYP enzymes tested, CYP3A4 and CYP2C8 exhibited the highest intrinsic clearance. More than 90% of morphine *N*-demethylation could be accounted for via the action of both CYP3A4 and CYP2C8.
4. Our *in vitro* findings suggest that hepatic CYP3A4, and to a lesser extent CYP2C8, play an important role in the metabolism of morphine into normorphine

Morphine is a potent opioid analgesic traditionally used for the treatment of moderate to severe pain (Levy 1996). In humans, morphine is metabolised by three distinct metabolic pathways: glucuronidation, sulfation and *N*-demethylation (Figure 1) (Milne *et al.* 1996). Irrespective of the route of administration, the majority of morphine clearance can be attributed to its biotransformation into morphine-3-glucuronide (M-3-G) and to a lesser extent, into morphine-6-glucuronide (M-6-G), morphine-3-sulfate and normorphine (Yeh *et al.* 1977; Hasselström and Säwe 1993).

Normorphine possesses analgesic properties (Lasagna and Kornfeld 1958) and may contribute to morphine-induced toxicity (Glare *et al.* 1990). This metabolite is found in urine from normal and addicted subjects (Yeh *et al.* 1977, Hasseltröm and Säwe 1993, Zhou *et al.* 1994, Fromm *et al.* 1997) and is formed in greater amounts when morphine is administered orally (Brunk and Delle 1974). This may account for the difference in free morphine concentrations found in urine after oral and intravenous administration (Glare and Walsh 1991). However, because the enzyme(s) mediating the formation of normorphine in humans is (are) unknown, the influence of pathophysiological conditions or drug interactions on the metabolism of morphine cannot be entirely predicted.

Although the metabolic profile of morphine is relatively well described *in vivo*, only the enzymes involved in its glucuronidation (e.g. UGT2B7 for the conversion of morphine into M-3-G and M-6-G and less importantly UGT1A3 for the formation of M-3-G) have been identified (Coffman *et al.* 1998, Green *et al.* 1998). In contrast, the enzymes responsible for the sulfation and *N*-demethylation reactions remain to be identified. Although this has never been proven experimentally in human liver microsomes, morphine is thought to be *N*-demethylated via CYP3A4 (Milne *et al.* 1996, Fromm *et al.*, 1997). The purpose of this study was to identify, *in vitro*, the CYP (s) responsible for normorphine formation in humans.

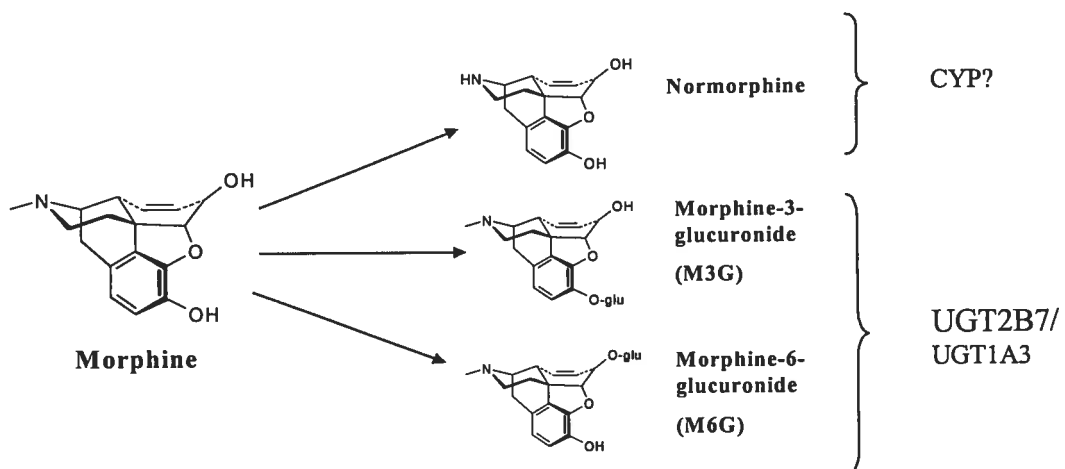


Figure 1. Morphine and its main metabolic pathways in humans.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Morphine sulfate was obtained from BDH (Toronto, Ontario, Canada) and naloxone bis-hydrochloride was purchased from RBI (Natick, MA, USA). Normorphine hydrochloride was obtained from Sigma-Aldrich (St-Louis, Mo, USA). Other compounds were from the following sources: magnesium dichloride hexahydrate (MgCl_2), glucose-6-phosphate, glucose-6-dehydrogenase, nicotinamide adenosine di-phosphate (NADP^+), troleandomycin (TAO), sulphaphenazole (SPZ), quinidine hydrochloride and quercetin were from Sigma-Aldrich (St-Louis, Mo, USA); S (+)-mephenytoin (*S*-meph) was from Ultrafine (Manchester, UK). Stock solutions of morphine, normorphine and naloxone were prepared in distilled water and stored in amber glass tubes at -20°C . Working solutions were prepared in appropriate solvents immediately before the experiments. All other chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, Mo, USA).

Human liver microsomes

General incubation conditions

Human liver microsomes were purchased from Xenotech LLC (Kansas City, KS, USA). Human livers were obtained from approved sources within the USA, in compliance with United Network for Organ Sharing policies. All incubations [human liver microsomes (0.4 mgml^{-1} of proteins), morphine (7 to 13 000 μM), 0.1M potassium phosphate buffer at pH 7.4] were performed in duplicate at 37°C . After a 5 min pre-incubation, the reaction was started by the addition of a NADPH-regenerating system (1 mM NADP^+ , 5 mM glucose-6-phosphate, 1 unit ml^{-1} glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 3.3 mM MgCl_2). The final incubation volume was 500 μl . Reactions were stopped after 30 min by the addition of an equal volume of

ice-cold acetonitrile acidified with 0.1% formic acid containing 750 nM of naloxone (internal standard). Samples were then vortex-mixed for 1 minute, put on ice for 10 min and centrifuged (10 000 g for 20 min at 4°C). Supernatants (350 µl) were frozen at -80°C until analysis. Control incubations were carried out without the NADPH-regenerating system or without microsomes.

Enzyme kinetics

The kinetics of normorphine formation were determined using 3 sets of pooled human liver microsomes obtained from 10 to 15 donors (Xenotec LLC, Kansas City, KS, USA). Morphine was incubated at concentrations ranging from 7 to 13 000 µM. Morphine could not be incubated at higher concentrations than 13 mM because of solubility limitations (stock solutions precipitated at concentrations above 130 mM). Enzyme kinetic parameters (V_{\max} , K_m) were assessed using computerised iterative non-linear regression (Prism, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The *in vitro* intrinsic clearance (CL_{int}) was calculated as the ratio of V_{\max} over K_m (Houston and Kenworthy, 2000). Morphine *N*-demethylation CL_{int} was scaled up to an *in vivo* intrinsic clearance (CL'_{int}) as described in the following equation and using previously published values of scaling factors [45 mg of microsomal protein per gram of liver, and 20 g of liver per kilogram of body weight (Carlile *et al.* 1997; Obach 1999)]:

$$CL'_{\text{int}} = CL_{\text{int}} \cdot (45 \text{ mg microsomes g}^{-1} \text{ liver}) \cdot (20 \text{ g liver kg}^{-1} \text{ body weight}) \quad (1)$$

The CL'_{int} of morphine *N*-demethylase was entered in equation (2), along with estimates of human hepatic blood flow ($Q = 20 \text{ ml/min/kg}$; Obach *et al.* 1999) and morphine free fraction (f_u) in human plasma (0.65; Glare and Walsh 1991), to predict the *in vivo* partial clearance ($CL_{(N-DM)}$) of morphine *N*-demethylase using the well stirred model (Obach *et al.* 1999).

$$CL_{(N-DM)} = Q \cdot f_u CL'_{int} / (Q + f_u CL'_{int}) \quad (2)$$

Chemical inhibition studies

Morphine (50 μ M) was incubated with human liver microsomes (3 different pools) in the presence or absence of two different concentrations of specific inhibitors or substrates of CYPs (see Figure 3 for concentrations), namely SPZ (CYP2C9, Newton et al., 1995), quercetin (CYP2C8, Rahman et al. 1994, Masimirembwa et al. 1999), S-meph (CYP2C19, Loft et al. 1991), quinidine (CYP2D6, Newton et al. 1995) and TAO (CYP3A, Newton et al. 1995). Stock solutions of CYP inhibitors/substrates were prepared in methanol and were diluted in methanol immediately before the incubations. The final methanol concentrations never exceeded 1% v/v and appropriate incubation controls (with morphine only and appropriate amounts of methanol) were used. The mechanism-based inhibitor TAO was pre-incubated with microsomes (for 15 min in the presence of the NADPH-regenerating system) prior to the addition of morphine. All other inhibitors/substrates were pre-incubated with morphine prior to the addition of a NADPH-regenerating system, as described in the general incubation conditions section.

Regression studies

The *N*-demethylation of morphine (50 μ M) was investigated in a panel of 15 human liver microsomes (Reaction Phenotyping™ kit version 5, Xenotec LLC, Kansas City, KS, USA). The microsomal preparations were characterised for the following activities: NADPH-P450 reductase, 7-ethoxyresorufin O-dealkylation (CYP1A2), coumarin-7-hydroxylation (CYP2A6), *S*-mephenytoin *N*-demethylation (CYP2B6), *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation (CYP2C19), paclitaxel (taxol) 6 α -hydroxylation (CYP2C8), tolbutamide methyl-hydroxylation (CYP2C9), dextromethorphan O-demethylation (CYP2D6), chlorzoxazone-6-hydroxylation (CYP2E1), testosterone

6 β -hydroxylation (CYP3A4/5) and lauric acid 12-hydroxylation (CYP4A11). Statistical analyses were performed with Sigma Stat 2.0 (SPSS, San Rafael, CA, USA). The statistical significance of any correlation between normorphine formation and specific CYP activities was evaluated by simple linear regression using a Student t-test ($\alpha = 0.05$).

cDNA- expressed human CYPs

Morphine *N*-demethylation was evaluated in microsomes prepared from insect cells transfected with cDNA encoding for human CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9-Arg₁₄₄, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 or CYP3A4. The recombinant enzymes and microsomes from untransfected insect cells were purchased from Gentest (Supersome™; Woburn, MA, USA). All incubations [microsomes (100 pmol CYPml⁻¹), morphine (50 μ M), 0.1M potassium phosphate buffer at pH 7.4] were performed at 37°C. After a 5 min pre-incubation, the reaction was started by the addition of the NADPH-regenerating system (1 mM NADP⁺, 5 mM glucose-6-phosphate, 1 unitml⁻¹ glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 3.3 mM MgCl₂). The final incubation volume was 500 μ l. Reactions were stopped after 20 min by the addition of an equal volume of ice-cold acetonitrile acidified with 0.1% formic acid and containing 750 nM of naloxone (internal standard). Samples were then vortex-mixed for 1 minute, put on ice for 10 min and centrifuged (10 000 g for 20 min at 4°C). Supernatants (350 μ l) were frozen at -80°C until analysis. Control incubations were carried out without NADPH-regenerating system, without protein or in microsomes from untransfected insect cells. Normorphine formation rates, expressed as pmolmin⁻¹pmol⁻¹ CYP, were corrected for the basal rate of formation of normorphine (0.01 pmolmin⁻¹pmolCYP⁻¹) when morphine was incubated in microsomes from untransfected insect cells.

Enzyme kinetics and relative contribution of CYPs

CYPs found to contribute to at least 1% of total relative activity were subjected to enzyme kinetics investigations, as described in a previous section. The Michaelis-Menten kinetics of morphine *N*-demethylation by CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 were investigated using substrate concentrations ranging from 7 to 13 000 μM . Morphine could not be incubated at higher concentrations than 13 mM because of solubility limitations (stock solutions precipitated at concentrations above 130 mM). The relative contribution of individual CYPs (RC_i of CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4) to morphine *N*-demethylation was estimated using the relative activity factor (RAF) approach suggested by Crespi (Crespi and Miller 1999, Strömer *et al.* 2000a, Strömer *et al.* 2000b, Venkatakrishnan *et al.* 2001a). The individual CYP reaction velocity ($v_i(S)$) of the isoform *i* at the morphine concentration (*S*) was obtained using the Michaelis-Menten equation (equation 3). RAF_i values for specific isoforms (8.3 for CYP2C8; 4 for CYP2C9; 230 for CYP2C19; 42 for CYP2D6 and 3.5 for CYP3A4) were obtained from Gentest and entered with $v_i(S)$ in equation (4) and (5) to estimate RC_i .

$$v_i(S) = (V_{\max,i} [S]) / (K_{m,i} + [S]) \quad (3)$$

$$v = \sum_i v_i(S) / \text{RAF}_i \quad (4)$$

$$\text{RC}_i (\%) = \{v(S)_i / (\text{RAF}_i \times v) \times 100\} \quad (5)$$

LC/MS analysis of normorphine

Normorphine was quantified using a modified version of an HPLC-MS method developed in our laboratory (Projean *et al.*, 2003). Briefly, acetonitrile-diluted (200

μ l) supernatants were collected and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Dry residues were dissolved in 200 μ l of 0.1% v/v formic acid and a volume of 30 μ l was injected into the LC/MS system. Chromatographic separations were achieved on a reversed-phase HPLC column (3 μ m particle-size Synergi polar-RP 75 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of 0.1% v/v formic acid in acetonitrile (A) and 0.1% v/v formic acid in water (B). After 1 minute at 100% of B, a linear gradient of A into B was run (0 to 75% v/v) from 1 to 10 min. The column was allowed to re-equilibrate for 2.5 min between injections. The flow rate was 1 ml/min. Retention times were 3.2 min for normorphine, 4.2 min for morphine and 5.1 min for the internal standard naloxone. The MS was operated in scan mode for the qualitative analysis of the incubates (m/z from 200 to 500) and in selected ion monitoring (SIM) mode for the quantitative studies ($m/z = MH^+$, M being the mass of the parent compound; $m/z = 272$ for normorphine, $m/z = 286$ for morphine and $m/z = 328$ for the internal standard). Calibration curves (9.7-10 000 nM) were constructed by linear regression of the analyte/internal standard peak area ratio vs concentration curves (using a weighting factor of 1/concentration). Mean intra-day precision was less than 10 %, mean accuracy approximately 95 %. The limit of quantification was 9.7 nM.

RESULTS

Kinetic studies in human liver microsomes

The NADPH-dependent metabolism of morphine resulted in the formation of normorphine in all incubations. No other oxidative metabolite could be detected by mass spectrometry in SCAN mode. Normorphine formation required microsomal proteins and the NADPH regenerating system. The reaction was linear with protein concentration and time. The kinetic parameters describing normorphine formation in pooled human liver microsomes are presented in Table I.

In all cases, normorphine formation followed apparent first-order Michaelis-Menten kinetics, as illustrated in Figure 2. Mean apparent K_m and V_{max} values were 12.4 ± 2.2 mM and 1546 ± 121 pmolmin⁻¹mg⁻¹, respectively, yielding a mean apparent CL_{int} of 0.127 ± 0.017 μ lmin⁻¹mg⁻¹ protein. Normorphine formation kinetics in HLM predicted a $CL_{(N-DM)}$ of 0.08 ± 0.01 mlmin⁻¹kg⁻¹ in man.

Effect of chemical CYP inhibitors

Results from the co-incubation of morphine with various CYP inhibitors/substrates in human liver microsomes are presented in Figure 3. Inhibitors/substrates selective for CYP2C19 (*S*-meph), CYP2D6 (quinidine), and a low dose of SPZ (25 μ M) had little (<10%) or no effect on the biotransformation of morphine into normorphine. A 20% inhibition was observed with high (50 μ M) but less selective concentrations of SPZ. Low concentrations of quercetin, a CYP2C8 inhibitor, decreased normorphine formation by approximately 31 to 36%. TAO, a selective mechanism-based inhibitor of CYP3As, inhibited normorphine formation by 46 %.

Regression studies

In characterised microsomal preparations from 15 human livers, normorphine formation rates showed a ten-fold interindividual variability. Data from simple regression analyses (Table II) suggest that CYP3A (by the formation of 6 β -hydroxy-testosterone, Figure 4A) and CYP2C8 (by the formation of 6- β -hydroxy-paclitaxel, Figure 4B) are likely to be involved in normorphine formation.

Table I. Apparent Michaelis-Menten kinetic parameters for morphine *N*-demethylation in pooled human liver microsomes. All incubations were performed in duplicate.

	Morphine <i>N</i> -demethylation		
	K_m	V_{max}	CL_{int}
	<i>mM</i>	<i>pmolmin⁻¹mg⁻¹</i> <i>protein</i>	<i>μlmin⁻¹mg⁻¹</i> <i>protein</i>
Pool 1	13.9	1606	0.116
Pool 2	13.7	1625	0.118
Pool 3	9.6	1407	0.147
mean ± S.D.	12.4 ± 2.2	1546 ± 121	0.127 ± 0.02

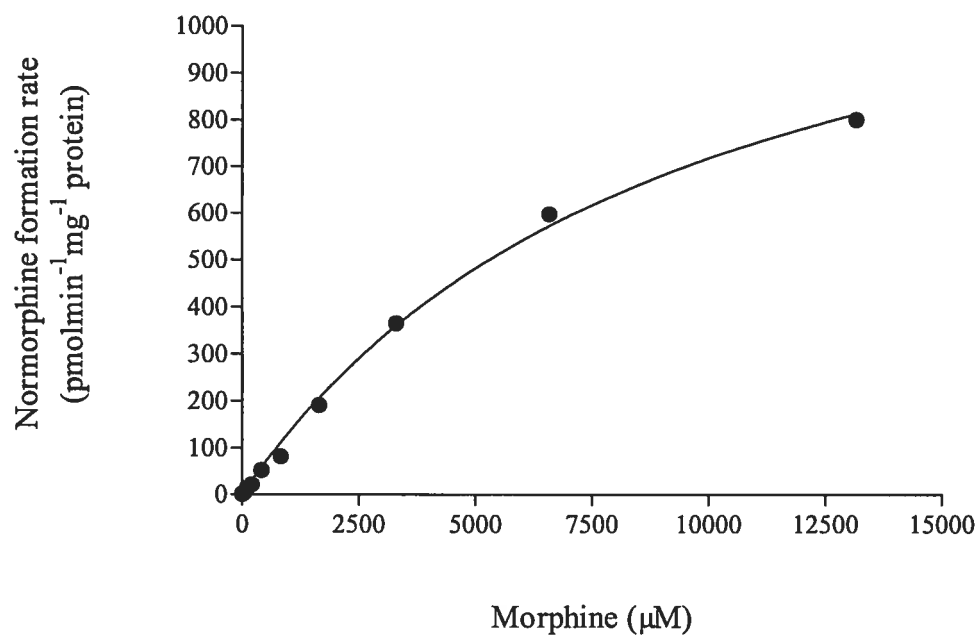


Figure 2. Kinetics of normorphine formation from morphine in pooled human liver microsomes (HLM3).

Symbols represent observed data (average of duplicate samples), and the curve was fitted by non-linear regression. Kinetic parameters are displayed in Table I.

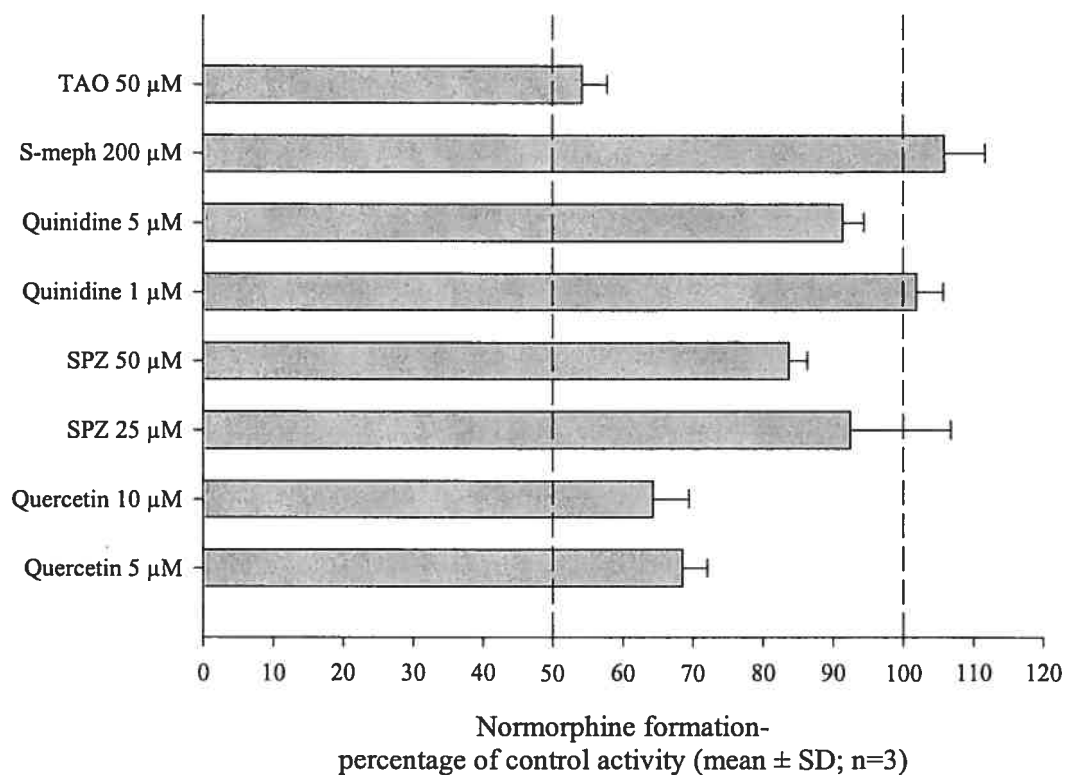


Figure 3. Effect of chemical substrates/inhibitors on morphine *N*-demethylation in pooled human liver microsomes.

Morphine was incubated at 50 μM . SPZ, sulphaphenazole; S-meph, S-mephenytoin; TAO, troleandomycin. Data are derived from three different determinations and the 100 % value is 7.5 pmolmin⁻¹mg⁻¹.

Human CYPs expressed in insect cells

Recombinant human CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 had the capacity to catalyse normorphine formation (Figure 5). Under these conditions, CYP3A4 *N*-demethylated morphine more efficiently than any other CYPs. Recombinant CYP2D6, CYP2C19 and CYP2C8 followed CYP3A4 in decreasing order of importance. The least effective enzyme was CYP2C9. The other CYP enzymes exhibited no significant metabolic activity.

The kinetics of morphine *N*-demethylation were investigated further with recombinant CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4. Normorphine formation followed apparent first-order Michaelis-Menten kinetics in all recombinants tested (Table III, Figure 6). In agreement with the K_m values obtained in human liver microsomes, the K_m values obtained in recombinant CYPs ranged from 4.8 to 14 mM. CYP2C8 and CYP2C19 exhibited the highest affinity for morphine whereas CYP3A4 showed the highest intrinsic clearance. Consistent with the results obtained using a single 50 μ M concentration of morphine, CYP2C9 was the least efficient enzyme to catalyse normorphine formation. CYP2D6 efficiency was lower than that obtained with CYP2C8 and CYP2C19.

Table II. Correlation between morphine *N*-demethylase activity and various CYP-specific activities following the incubation of morphine (50 μ M) in a panel of 15 different human liver microsomal preparations.

CYP-specific catalytic activities	Morphine <i>N</i> -demethylase activity	
	CYP	<i>Correlation coefficient (r)</i>
Ethoxyresorufin <i>O</i> -deethylase	1A2	0.09
Coumarin 7-hydroxylase	2A6	0.57
<i>S</i> -mephenytoin <i>N</i> -demethylase	2B6	0.33
Paclitaxel 6 α -hydroxylase	2C8	0.72 ***
Tolbutamide methylhydroxylase	2C9	0.45
<i>S</i> -mephenytoin 4'-hydroxylase	2C19	0.49
Dextromethorphan <i>O</i> -demethylase	2D6	0.18
Chlorzoxazone 6-hydroxylase	2E1	0.03
Testosterone 6 β -hydroxylase	3A	0.91 ***
Lauric acid 12-hydroxylase	4A11	0.10

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Student t-test

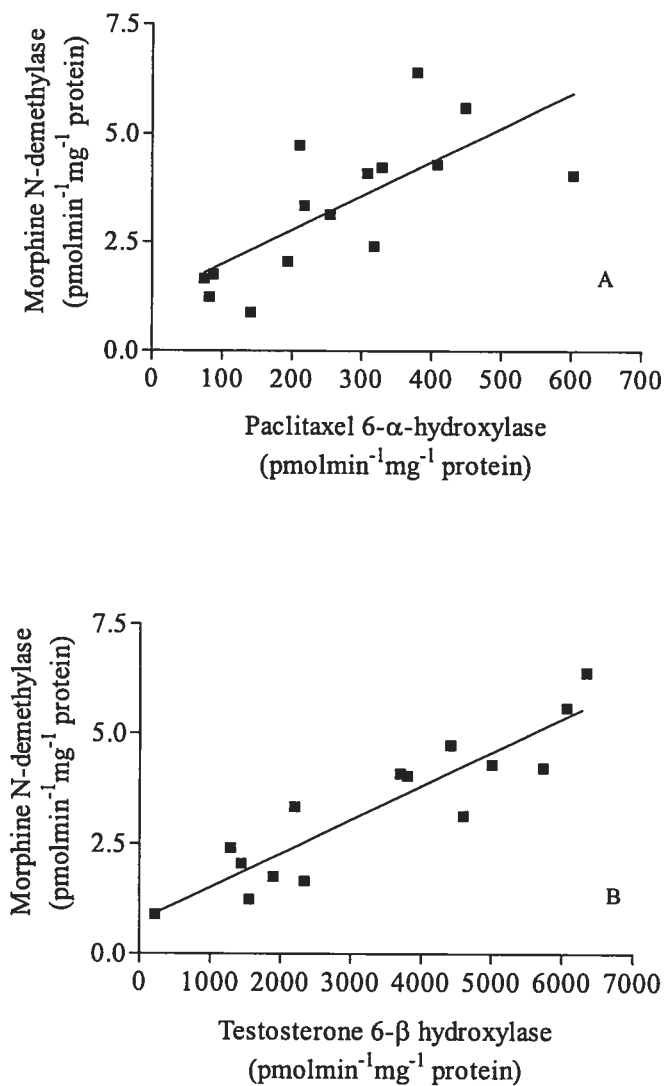


Figure 4. Relationship between paclitaxel-6- α -hydroxylase (A), testosterone-6 β -hydroxylase (B) and morphine *N*-demethylase activity.

Morphine (50 μ M) was incubated in 15 different human liver microsomal preparations. Regression coefficient (r) are displayed in Table II. Symbols represent observed data (average of duplicate samples).

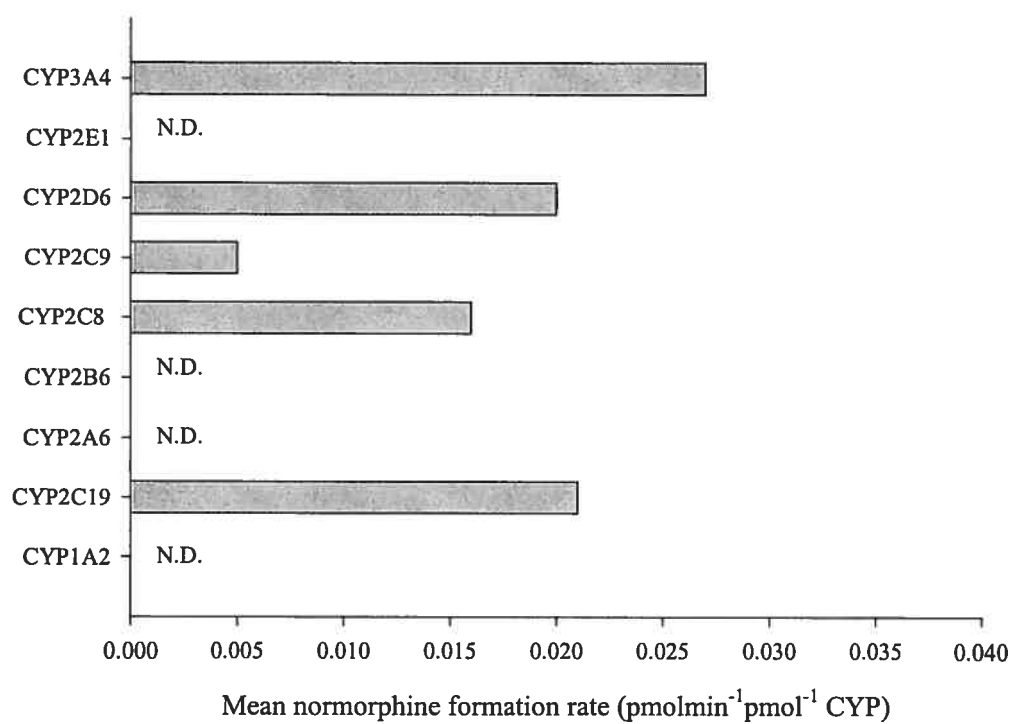


Figure 5. Normorphine formation rate following the incubation of 10 μ M morphine in microsomes prepared from insect cells expressing individual human CYPs.

Samples were assayed in triplicate. N.D., no detectable formation of normorphine by the enzyme.

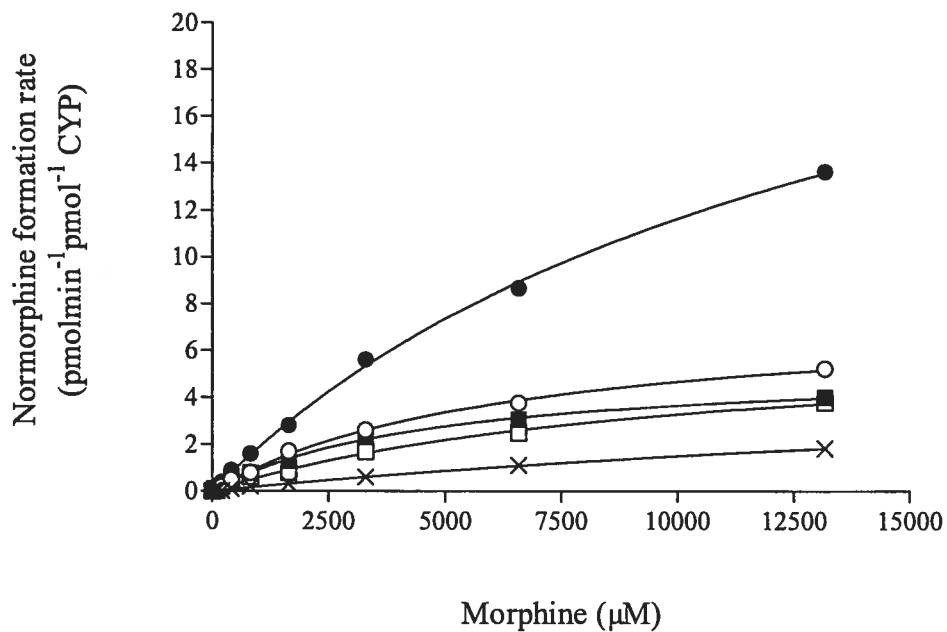


Figure 6. Kinetics of normorphine formation from morphine in cDNA-expressed human CYP enzymes. (●), CYP3A4; (■), CYP2C8; (○), CYP2C19; (□), CYP2D6 and (×), CYP2C9.

Symbols represent observed data (average of duplicate samples); lines represent formation rates predicted with nonlinear regression. Kinetic parameters are displayed in Table III.

Predicted contribution of CYP enzymes to morphine *N*-demethylation

The relative contributions (RC_i) of CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 to morphine *N*-demethylation in HLM were estimated using enzyme kinetic parameters obtained in recombinant human CYPs (Table III) over a concentration range determined to be representative of *in vivo* liver concentrations (0 to 10 μM). For the most part, morphine *N*-demethylation was accounted for by CYP3A4 (~ 60%) and CYP2C8 (~ 30%) (Figure 7). CYP2C19, CYP2C9 and CYP2D6 appeared to be of minor importance, accounting globally for less than ten percent of the total reaction.

Table III. Apparent Michaelis-Menten kinetic parameters for morphine *N*-demethylation in microsomes from cDNA-expressed CYPs in insect cells. Incubations were performed in duplicate.

	Morphine <i>N</i> -demethylation		
	K_m	V_{max}	CL_{int}
	<i>mM</i>	$pmol\min^{-1}pmol^{-1}$ <i>CYP</i>	$\mu\text{min}^{-1}pmol^{-1}CYP$
CYP2C8	4.8	5.41	0.0011
CYP2C9	25.4	5.32	0.0002
CYP2C19	6.4	7.67	0.0012
CYP2D6	10.1	6.57	0.0007
CYP3A4	14.15	28.13	0.0020

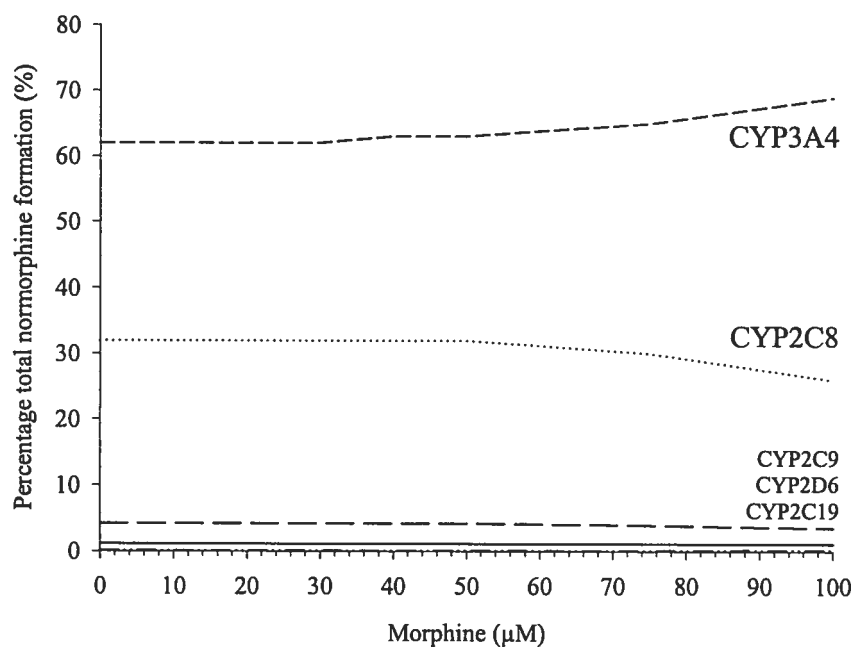


Figure 7. Percentage contribution to morphine N-demethylation for CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 and CYP2C19 predicted from recombinant CYP using RAF normalisation.

Calculations were based on kinetic parameters obtained from recombinant CYP displayed in Table III.

DISCUSSION

This is the first investigation of morphine oxidative metabolism in human liver microsomes. Mass spectrometry analysis of the microsomal incubates revealed that normorphine was the only metabolite formed in our incubation conditions.

Clinically, in chronically treated subjects, morphine peak to trough plasma concentrations rarely exceed the micromolar range (Faura *et al.* 1996). However, distribution studies in animals that received single or multiple doses of morphine have shown that morphine tends to concentrate in tissues such as the kidney, liver, lung, spleen and muscles (Woods 1954). Accordingly, in patients, morphine concentrations in the liver are likely to be higher than in plasma. Intra-hepatic concentrations can be approximated by multiplying plasma concentrations by a partition factor obtained from animal distribution studies or clinical autopsies (Schmider *et al.* 1999). Post-mortem analyses reported a morphine liver to blood partition ratio of approximately four (Felby *et al.* 1974). In addition, local liver concentrations may be even higher shortly after oral administration (Shen *et al.* 1997). Morphine is rapidly and completely absorbed from the GI tract and is subjected to extensive first-pass metabolism (Milne *et al.* 1996). Liver concentrations of 10^{-6} to 10^{-5} M are therefore relevant to study the *in vitro* metabolism of morphine.

The mean apparent K_m of 12.4 ± 2.2 mM evidences that liver microsomal enzymes metabolising morphine to normorphine have a poor affinity for the substrate. The mean apparent K_m is consistent with values previously obtained for the *N*-demethylation of structurally related opioids. Thus, the *N*-demethylation of dihydrocodeine is characterised by apparent K_m values ranging from 4 to 14 mM (Kirkwood *et al.* 1997).

Using *in vitro* CL_{int} data in human liver microsomes, the predicted $CL_{(N-DM)}$ in man is 0.08 ± 0.01 mlmin⁻¹kg⁻¹, which would only contribute to 0.4% of total morphine

clearance. The low predicted clearance obtained in the present experiments suggests that the CYP(s) implicated in normorphine formation would have little contribution to morphine total clearance. These observations are in good agreement with that obtained from *in vivo* data since the major metabolites recovered from biological fluids are morphine glucuronides and not oxidation products (Hasselström and Sawe 1993). In addition, according to urinary data in normal subjects, CL_(N-DM) is also expected to contribute to less than 1% of total morphine clearance (Zhou *et al.* 1994).

Although a one-enzyme model best fitted normorphine formation, one cannot exclude the involvement of more than one isoform. Studies using cDNA-expressed systems showed that CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 could all catalyse the formation of normorphine. However, unlike microsomal preparations that contain all CYPs in their native proportions, cDNA-expressed enzymes alone cannot determine whether an enzymatic pathway makes a quantitatively important contribution to the overall metabolism of a compound (Rodrigues, 1999). The use of the RAFs has been successfully applied to bridge the gap between recombinant systems and liver microsomes. The RAF approach is based on the assumption that any effect on the rate of formation of a metabolite is independent of the substrate, and that any factor that may affect the rate of metabolism for one substrate will equally affect other substrates (Crespi and Miller 1999, Strömer *et al.* 2000a, Strömer *et al.* 2000b). Since this approach has the advantage of taking into account the inherent differences between the recombinant systems and the liver microsomes, it represents, when used in conjunction with other methods (inhibition/correlation studies), a powerful tool to estimate CYP contribution to drug metabolism (Venkatakrishnan *et al.* 2001b, Nakajima *et al.* 2002).

Using the RAF approach, we identified CYP3A4 as the most active CYP enzyme contributing to more than 60% of total morphine *N*-demethylation over a wide range of concentrations. These observations are consistent with those obtained in human liver microsomes where the formation of normorphine correlated strongly with the

6 β -hydroxylation of testosterone, a CYP3A-mediated reaction (figure 6A) (Waxman *et al.* 1991). Further corroboration of the involvement of CYP3A4 in morphine *N*-demethylation was obtained when the microsomal reaction was extensively inhibited by TAO, a potent inhibitor of CYP3As (Newton *et al.* 1995).

CYP3A4 is recognized as the principal enzyme involved in the *N*-demethylation of many drugs (Smith and Jones 1992). Our results are consistent with previous findings on the *N*-demethylation of other opioids structurally similar to morphine, including codeine (Caraco *et al.* 1996) and dihydrocodeine (Kirkwood *et al.* 1998), which are also *N*-demethylated by CYP3A4. Our results are also in agreement with clinical findings evidencing a significant increase in total normorphine urine concentrations when morphine was administered orally to healthy volunteers pre-treated with rifampine, a CYP3A inducer (Fromm *et al.* 1997).

Although normorphine formation in human liver microsomes was best fitted by a one-enzyme kinetic model, a combination of enzymes having similar kinetic behaviours could lead to the determination of one apparent K_m . In addition, if one CYP is clearly predominant for a particular reaction, this could also result in apparent simple kinetics (Clarke *et al.* 1998). Therefore, in addition to CYP3A4, other CYPs might contribute to normorphine formation.

Direct evidence that CYP2C8 could also *N*-demethylate morphine was first provided by cDNA-expressed enzymes. Recombinant CYP2C8 was found to have a higher affinity for morphine (Table II, Figure 4) but a lower capacity than CYP3A4. The RAF approach predicted CYP2C8 contribution to account for approximately 30% of total normorphine formation. The results were confirmed by incubations in a panel of human liver microsomes, where there was a significant correlation between normorphine formation and taxol 6 α -hydroxylation, a CYP2C8-mediated reaction (Rahman *et al.* 1994). In addition, low concentrations of quercetin (CYP2C8-

inhibitor), inhibited morphine *N*-demethylation by 30 to 35%, which is also consistent with a contribution of CYP2C8 to normorphine formation.

A modest inhibition of normorphine formation (20%) was observed when morphine was incubated with high concentrations of SPZ. However, recombinant CYPs and correlation studies failed to evidence any significant contribution of CYP2C9. The RAF approach predicted the sum of CYP2D6, CYP2C19 and CYP2C9 to account for less than 7% of normorphine formation. Therefore, it is likely that the 20% inhibition observed with high SPZ concentrations in human liver microsomes may be due to the inhibition of a CYP other than CYP2C9. SPZ has been shown to inhibit CYP2C8 (Mancy *et al.* 1996) and may have partially decreased CYP2C8-mediated normorphine formation.

The contribution of CYP2C8 to the metabolism of drugs and endobiotics has recently gained interest (Ong *et al.* 2000). Thus far, morphine has not been involved in drug interactions with CYP2C8 substrates. This is not surprising since CYP2C8 would be expected to play a minor role, if any, in drug-drug interactions, given the major contribution from CYP3A4 and relatively small fraction of the total CYP contents in the liver expressed as CYP2C8 (Shimada *et al.* 1994, Inoue *et al.* 1997). However, our *in vitro* observations substantiate the hypothesis that a certain degree of overlap exists between CYP2C8 and CYP3A4 substrate specificity (Ong *et al.* 2000). Partial contribution from CYP2C8 to the metabolism of predominantly CYP3A4 substrates has been reported with drugs such as carbamazepine, zopiclone and verapamil (Kerr *et al.* 1994, Becquemont *et al.* 1998, Tracy *et al.* 1999). In light of these data, CYP2C8 may even contribute, albeit to a small extent, to the *N*-dealkylation of opioids identified as CYP3A4-specific substrates such as dihydrocodeine and codeine.

In summary, the present investigations evidence the role of CYP3A4 and CYP2C8 in the *N*-demethylation of morphine in human liver microsomes. However, since *N*-

demethylation is a minor pathway of morphine metabolism, CYP-mediated drug-drug interactions resulting from CYP3A4 or CYP2C8 should not be problematic in the clinic unless major pathways such as glucuronidation are also affected.

REFERENCES

Becquemont L., Mouajjah S., Escaffre O., Beaune P., Funck-Brentano C., and Jaillon P., 1999, Cytochrome P-450 3A4 and 2C8 are involved in Zopiclone metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**: 1068-1073.

Brunk F. and Delle M., 1974, Morphine metabolism in man *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **16**: 51-57.

Caraco Y., Tateishi T., Guengerich F.P. and Wood A.J.J., 1996, Microsomal codeine N-demethylation: cosegregation with cytochrome P4503A4 activity. *Drug Metabolism and Disposition*, **24**: 761-764.

Carlile D.J., Zomorodi K., Houston J.B., 1997, Scaling factors to relate drug metabolic clearance in hepatic microsomes, isolated hepatocytes, and the intact liver: studies with induced livers involving diazepam. *Drug Metabolism and Disposition*; **25**(8):903-11

Coffman B.L., Rios G.R., King C.D., Tephly TR, 1997, Human UGT2B7 catalyses morphine glucuronidation. *Drug Metabolism and Disposition*, **25**: 1-4.

Clarke S.E., 1998, In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica*, **28**: 1167-202.

Crespi C.L. and Miller V.P., 1999, The use of heterologously expressed enzymes-state of the art and prospects for the future. *Pharmacology and Therapeutics*, **84**: 121-131.

Faura C.C., Moore A., Horga J.F., Hand C.W. and McQuay H.J. , 1996, Morphine and morphine-6-glucuronide and effect in cancer pain. *Journal of Pain Symptoms and Management*, **11**: 95-102.

Felby S., Christensen H. and Lund A., 1974, Morphine concentration in blood and organs in cases of fatal poisoning. *Forensic Science*, **3**: 77-81.

Fromm M.F., Eckhardt K., Li S., Schanzle G., Hofmann U., Mikus G., Eichelbaum M., 1997, Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain*, **72**: 261-267.

Glare P.A., Walsh T.D. and Pippenger C.E., 1990, Normorphine, a neurotoxic metabolite? *Lancet*, **335**: 725-726.

Glare P.A. and Walsh T.D., 1991, Clinical pharmacokinetics of morphine *Therapeutic Drug Monitoring*, **335**: 1-23.

Green M.D., King C.D., Mojarrabi B., MacKenzie P.I. and Tephly T.R., 1998, Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalysed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metabolism and Disposition*, **26**: 507-12.

Hand C.W., Blunnie W.P., Claffey L.P., McShane A.J., McQuay H.J. and Moore R.A., 1987, Potential analgesic contribution from morphine-6-glucuronide in CSF. *Lancet*, **2**: 1207-1208.

Houston J.B., Kenworthy K.E., 2000, In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metabolism and Disposition*, **28**(3): 246-54.

Hasselström J. and Säwe J., 1993, Morphine pharmacokinetics and metabolism in human. *Clinical Pharmacokinetic*, **24**: 344-354.

Inoue K., Yamazaki H., Imiya K., Akasaka S., Guengerich F.P. and Shimada T., 1997, Relationship between *CYP2C9* and *2C19* genotypes and tolbutamide methyl hydroxylation and *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. *Pharmacogenetics* **7**: 103-113.

Kerr B.M., Thummel K.E., Wurden C.J., Klein S.M., Kroetz D.L., Gonzales F.J. and Levy R.H., 1994, Human carbamazepine metabolism—role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11 epoxide formation. *Biochemical Pharmacology*, **47**: 1969-1979.

Kirkwood L.C., Nation R.L. and Somogyi A.A., 1997, Characterization of the human cytochrome P450 enzyme involved in the metabolism of dihydrocodeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **44**: 549-555.

Lasagna L. and de Kornfeld T.J., 1958, Analgesic potency of normorphine in patients with postoperative pain. *Journal of Pharmacology*, **124**: 260-263.

Levy M.H., 1996, Drug Therapy: Pharmacologic Treatment of Cancer Pain. *New England Journal of Medicine*, **335**: 1124-32.

Loft S., Otton V., Lennard M., Tucher G. and Poulsen H., 1991, Characterisation of metronidazole metabolism by human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **41**: 1127-1134.

Mancy A., Dijols S., Poli S., Guengerich F.P. and Mansuy D., 1996, Interaction of sulphaphenazole derivatives with liver cytochrome P450 2C: molecular origin of the specific inhibitory effects of sulfaphenazole on CYP2C9 and consequences for the substrate binding site topology of CYP2C9. *Biochemistry*, **35**: 16205-16212.

Masimirembwa C.M., Otter C., Berg M., Jonsson M., Leidvik B., Jonsson E., Johansson T., Backman A., Edlund A., Andersson T.B., 1999, Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**:1117-22.

Milne R.W., Nation R.L. and Somogyi A.A., 1996, The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metabolism Reviews*, **28**: 345-472.

Newton D.J., Wang R.W. and Lu A.Y.H., 1995, Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, **23**: 154-158.

Nakajima M., Tane K., Nakamura S., Shimada N., Yamazaki H., Yokoi T., 2002, Evaluation of approach to predict the contribution of multiple cytochrome P450s in drug metabolism using RAF effects of the differences in expression levels of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5) in the expression system and the differences in the marker activities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **91**: 952-63.

Obach RS, 1999, Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**(11): 1350-9.

Ong C.E., Coulter S., Birkett D.J., Bhasker C.R. and Miners J.O., 2000, The xenobiotic inhibitor profile for cytochrome P4502C8. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **50**: 573-580.

Projean D, Tu T.M. and Ducharme J., 2003, A rapid and simple method to determine morphine and its metabolites in rat plasma by high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 787(2): 243-53.

Rahman A., Korzekwa K.R., Grogan J., Gonzales F.J. and Harris J.W., 1994, Selective biotransformation of taxol to 6-alpha hydroxy taxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Research*, 54: 5543-5546.

Rodrigues A.D., 1999, Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* 57:465-80.

Shen D.D., Kunze K.L., Thummel K.E., 1997, Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Advanced Drug Delivery Review*, 27(2-3): 99-127.

Schmider J., von Moltke L.L., Shader R.I., Harmatz J.S. and Greenblatt D.J., 1999, Extrapolating in vitro data on drug metabolism to in vivo pharmacokinetics, evaluation of the pharmacokinetic interaction between amitryptilline and fluoxetine. *Drug Metabolism Reviews*, 31: 545-560.

Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F.P., 1994, Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270 : 414-423

Smith D.A. and Jones B.C., 1992, Speculation on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology*, **44**: 2089-2098.

Strömer E., Von Moltke L.L., Shader R.I. and Greenblatt D.J., 2000a, Metabolism of the antidepressant mirtazapine in vitro: contribution of cytochrome P450 1A2, 2D6 and 3A4. *Drug Metabolism and Disposition*, **28**: 1168-1175.

Strömer E., Von Moltke L.L. and Greenblatt D.J., 2000b, Scaling drug biotransformation data from cDNA-expressed cytochrome P-450 to human liver: A comparison of relative activity factors and human liver abundance studies of mirtazapine metabolism *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**: 793-801.

Tracy T.S., Korzekwa K.R., Gonzalez F.J., Wainer I.W., 1999, Cytochrome P450 enzymes involved metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **58**: 1201-1208.

Waxman D.J., Lapenson D.P., Aoyama T., Gelboin, H.V., Gonzalez F.J. and Korzekwa K., 1991, Steroid hormone hydroxylase specificities for eleven cDNA-expressed human liver cytochrome P450s. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **290**:160-166.

Wood L.A., 1954, Distribution and fate of morphine in non tolerant and tolerant dogs and rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **112**: 158-175.

Venkatakrishnan K., Von Moltke L.L. and Greenblatt D.J., 2001a, Application of the relative activity approach in scaling from heterologously expressed cytochrome P450 to human liver microsomes: Studies on amitriptyne as model substrate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **297**: 326-337.

Venkatakrishnan K., Von Moltke L.L., Greenblatt D.J., 2001b, Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *Journal of Clinical Pharmacology* 41:1149-79.

Yeh S.Y., Gorodetzky C.W. and Krebs H.A., 1977, Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-ethereal sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66: 1288-93.

ACKNOWLEDGEMENTS

Denis Projean was supported by Research Studentship from AstraZeneca R&D Montréal.

CHAPITRE III

*Selective downregulation of hepatic cytochromes
P450 contents and activities in FCA-treated rats*

SELECTIVE DOWNREGULATION OF
HEPATIC CYTOCHROMES P450 CONTENTS
AND ACTIVITIES IN FCA-TREATED RATS

**Denis Projean, Sophie Dautrey, Jean-Louis Brazier and Julie
Ducharme**

Pharmaceutical Research

Soumis, 2003

ABSTRACT

PURPOSE: This study was designed to examine the effect of Freund's complete adjuvant (FCA)-induced inflammation on liver P450 contents and CYP-specific activities in the first 7 days that followed a single FCA injection in the rat hindpaw. **METHODS:** Rats were humanely sacrificed at regular time points, plasma samples were collected and liver microsomes were prepared. **RESULTS:** FCA injection led to the development of an acute inflammatory response, as evidenced by paw edema and increased alpha-1-glycoprotein(AGP) and total-nitrite (NOx) plasma concentrations. Interleukin (IL-)1 β and Tumor-necrosis-factor(TNF- α) could not be detected in any samples but plasma IL-6 levels were significantly higher in FCA-treated rats than in controls at 8h post-FCA (219 ± 70 pg/ml vs 31 pg/ml, respectively). These changes were accompanied by a rapid decrease in total P450 contents in rat liver and the selective downregulation of specific CYP isoforms, as illustrated by decreased contents/activities in CYP2B, CYP2C6, CYP2C11 and CYP2E1 in FCA-treated rat liver microsomes. CYP2C11 was the most severely affected, its protein levels and catalytic activity decreasing to 20-30% of controls at 48h post-FCA. CYP2D(activity) and CYP3A2 were unaffected by FCA administration. **CONCLUSION:** FCA-induced decreases in CYP contents and activities may have pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences when highly hepatically-cleared drugs are administered to FCA-treated rats.

Key words: Cytochrome P450, inflammation, Freund's complete adjuvant, Interleukin-6, rat

Cytochromes P450 (P450s) constitute a superfamily of enzymes that catalyze a variety of oxidative reactions, including xenobiotic biotransformation and endogenous substrate synthesis or catabolism. In mammals, the CYP isoforms primarily involved in drug metabolism include the CYP1, CYP2, CYP3 and to a lesser extent the CYP4 subfamilies. Their expression and activity are influenced by a variety of events such as genetic, endogenous, environmental or pathophysiological factors [1]. For instance, infectious and inflammatory stimuli, by triggering a series of events collectively called the acute phase response, can lead to altered drug metabolism and pharmacokinetics and eventually influence clinical response [2].

In rats, inflammatory pain models have been developed as an attempt to reproduce persistent pain in man and are used to evaluate the analgesic potential of new chemical entities. These models rely on the administration of inflammatory stimuli, such as Freund's complete adjuvant (FCA), turpentine or lipopolysaccharides (LPS), to elicit hyperalgesic/allodynic conditions [3]. A single FCA injection in the rat hindpaw has been shown to produce a stable and reproducible thermal hyperalgesia from 24 to 72h post-administration [4]. When rats are followed for more than 14 days post-FCA injection, acute inflammation progresses to a complex arthritis-like stage [6]. Although FCA-induced hyperalgesia is well characterized pharmacodynamically, little is known about the influence of FCA-induced acute inflammation on the pharmacokinetics of co-administered drugs. FCA-induced arthritis has been recognized to decrease total P450 contents in rat liver [7]. Despite a broad characterization using non-specific P450 substrates such as aminopyrine [7], a systematic evaluation of FCA-mediated down-regulation of hepatic individual P450 activities/contents has never been reported in the rat. In addition, it is not known whether P450s would be affected to the same extent in the early days that follow FCA injection, before the development of the arthritis-like syndrome.

The goal of this study was to characterize, in rats, the biochemical and metabolic events that occur during the acute inflammation phase triggered by a single FCA

injection, and to assess their potential impact on drug metabolism and pharmacokinetics. To address this, we examined the effect of FCA-induced inflammation on rat hepatic P450 contents and activities in the first 7 days that followed FCA administration. In addition, using a combination of biochemical assays and highly specific HPLC-UV or HPLC-MS methods, we evaluated the relationships between the observed modifications in P450 contents/activities with the time-course of selected inflammatory mediators.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals Diclofenac (DF), dextromethorphan (DM) hydrobromide, dextrophan (DEX), *p*-nitrophenol, *p*-nitrocatechol, Tween 20, and *Mycobacterium tuberculosis* were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada). Androstenedione, testosterone and its hydroxylated metabolites (2 α , 2 β , 6 β , 7 α , 16 α and 16 β hydroxytestosterone) were obtained from Steraloids (Wilton, NH, USA). Four-hydroxy-diclofenac (4-OH-DF) was obtained from BDGentest (Woburn, MA, USA). All other chemical were obtained from VWR International (Montréal, Québec, Canada).

Animals and treatments The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of AstraZeneca R&D Montréal. All procedures were conducted according to CCAC (Canadian Council on Animal Care) and AAALAC (Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) guidelines. Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Québec), weighing 170-220g, were housed under standard conditions (light/dark cycle of 12h; room temperature of ~ 20°C) and provided with food and water *ad libitum*. FCA was prepared from 1-mg heat killed *Mycobacterium Tuberculosis* dissolved in a mixture of 0.85 ml of paraffin oil and 0.15 ml of mannide oleate. FCA-treated rats received a single subcutaneous injection of 100 μ L of FCA into the plantar face of the left hindpaw. Control rats were treated with an equal volume of saline. In a first set of rats, hindpaw volumes were measured by liquid plethysmometry (Ugo Basile, Italy) 24, 48, 72 and 168h after the injection of FCA or saline (n=6/group). Following isoflurane anesthesia, the same animals were killed by cardiac puncture (exsanguination) and blood was collected in EDTA tubes. In addition, livers were removed immediately following cardiac puncture, washed to remove excess blood, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until microsome preparation. In a second set of rats (n=6/group), only blood samples were collected by cardiac puncture under light anesthesia, in EDTA tubes 4, 8 and 12h after the

injection of FCA. Plasma obtained following blood centrifugation (3000 x g for 15 min) was stored at -80°C.

Determination of total nitrite levels (NO_x). Nitrite, a stable end product of nitric oxide, was measured in rat plasma using a commercially available kit (Oxis International inc, Portland, OR, USA). Plasma (5 µl) was incubated with nitrate reductase to reduce any nitrates to nitrites. Following incubation, samples were treated with Griess reagent and absorbance was measured at 540 nm. The limit of quantification (LOQ) was 10 µM.

Determination of α₁-acid glycoprotein (AGP) levels. AGP was measured in rat plasma using a commercially available radial immunodiffusion kit (Cardiotech service, Louisville, KY, USA). The LOQ was 100 µg/ml.

Determination of cytokine levels. Interleukin (IL)-1β, IL-6 and Tumor necrosis factor (TNF)-α levels were determined using rat-specific ELISA kits (Endogen, Woburn, MA, USA; Amersham bioscience, Baie d'Urfé, Québec, Canada). The LOQ was 25 pg/ml for IL-1β and 31 pg/ml for both IL-6 and TNF-α. Cytokines were assayed for all time points.

Preparation of rat liver microsomes. Rat liver microsomes were prepared by differential ultracentrifugation according to the method of Pearce et al. [8]. The final microsomal pellets were resuspended in 0.25 M sucrose and stored at -80°C. Microsomal proteins were measured by the BCA protein assay (Pierce, Woburn, MA, USA) using bovine serum albumin solutions as standards. Cytochrome P450 quantification was carried out according to the method of Omura and Sato [9].

Gel electrophoresis and Western immunoblotting. Protein levels of various CYP isoforms present in rat liver microsomes were measured by western immunoblotting. Proteins (samples and standards) were separated by SDS polyacrylamide gel

electrophoresis (10% polyacrylamide) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Phenobarbital-induced (CYP2B and CYP3A2) and benzphetamine-induced (CYP2C11) rat liver microsomes were used as standards and were provided by the antibodies supplier (BDGentest, Woburn, MA, USA). For CYP2E1, recombinant rat CYP2E1 was used as standard (BDGentest, Woburn, MA, USA). Immunoblots were performed in 5% non-fat milk in PBS and washed in PBS containing 0.1% Tween 20. Membranes were then incubated with polyclonal goat anti-rat CYP2B1, CYP2C11, CYP2E1 or CYP3A2 primary antibodies (1: 1000; BDGentest Woburn, MA). Anti-rat CYP2B1 has been shown to cross-react with CYP2B2 and the 10% polyacrylamide gel could not clearly separate the bands. Thus, the bands recognized by the anti-CYP2B1 antibody were regarded as CYP2Bs. Immune complexes were revealed using rabbit anti-goat IgG (secondary antibody; 1:10 000) coupled to horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). The binding of all antibodies was detected using electrochemiluminescence (LumiGLO, Kirkegaard & Perry Lab, Gaithersburg, MD, USA) onto an Hyperfilm ECL autoradiography film (Amersham bioscience, Baie d'Urfé, Québec, Canada). The product intensities of the immunoblots were measured with a Hewlett Packard Scanner (Hewlett Packard, Kirkland, Québec, Canada) equipped with the PC version of Scion Image/Gel analysis program (Scion Corp, Frederick, MD, USA). Band intensities were normalized to that of a standard that was run in the same gel.

Testosterone hydroxylase assay. An incubation mixture containing KH_2PO_4 (0.1 M pH 7.4), testosterone (250 μM) and liver microsomes (0.3 mg/ml final protein concentration) was pre-incubated for 5 min at 37°C. The enzymatic reaction was initiated by the addition of NADPH (1mM final) and was allowed to proceed for 10 min. The final assay volume was 500 μl and final solvent concentration (methanol) was less than 1%. Control incubations were performed to ensure product formation linearity against time and protein concentration. The reaction was stopped with the addition of an equal volume of ice-cold methanol. Samples were then vortex-mixed,

put on ice for 10 min and centrifuged (3 500 g for 30 min at 4°C). Supernatants were frozen until HPLC analysis.

Testosterone and its hydroxylated metabolites were quantified using an HPLC-UV method adapted from Whalley et al. [10]. Briefly, an aliquot (50 µl) of the supernatant was injected onto a reversed-phase HPLC column (Hypersil BDS C-18 analytical column 3 µm, 4.6 x 100 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) and eluted with a linear step gradient of tetrahydrofuran-acetonitrile-water (10:10:80 changing to 14:14:72 over 10 min) followed by an isocratic hold of 5 min. The total run time was 15 min. The mobile phase was allowed to re-equilibrate for 3 min between injections. The flow rate was 1.25 ml/min. Retention times were 3.1 min for 7 α -testosterone, 3.7 min for 6 β -testosterone, 4.2 min for 16 α -testosterone, 5.5 min for 16 β -testosterone, 6.2 min 11 β -testosterone, 6.5 min for 2 α -testosterone, 6.8 min for 2 β -testosterone, 10.6 min for androstenedione and 11.3 min for testosterone. Analytes were detected at 255 nm. The method was linear between 78 and 40 000 nM for all metabolites ($R^2 = 0.999$), mean accuracy averaged 95% and intra-day reproducibility was within 10%. The LOQ of the method was 78 nM for all metabolites.

Diclofenac 4-hydroxylase and dextromethorphan *O*-demethylase assays. An incubation mixture containing KH_2PO_4 (0.1M pH 7.4), DF (25 µM) or DM (10 µM), and liver microsomes (0.3 mg/ml final protein concentration) was pre-incubated for 5 min at 37°C. The enzymatic reaction was initiated by the addition of NADPH (1mM final) and was allowed to proceed for 15 (DM) or 30 min (DF). The final incubation volume was 500 µl and final solvent concentration (DMSO) was less than 1 %. Control incubations were performed to ensure product formation linearity against time and protein concentration. Reactions were stopped by the addition of an equal volume of ice-cold acetonitrile. Samples were then vortex-mixed, put on ice for 10 min and centrifuged (3 500 g for 30 min at 4°C). Supernatants were frozen until HPLC analysis.

DEX and 4-OH-DF were quantified using an HPLC/MS method developed in our laboratory. Supernatants (5-20 μ l) were injected directly into the HPLC/MS system [Agilent 1100/Benchtop MS detector equipped with an electrospray source (Agilent Technology, Ville St-Laurent, Québec, Canada)]. Chromatographic separations were achieved on a reversed-phase HPLC column (Inertsil-ODS-3 C18, 3 μ m, 4.6 x 75 mm; Agilent Technology). The mobile phase consisted of a mixture of 0.1 % formic acid in acetonitrile (A) and 0.1% formic acid in water (B). From 0 to 0.5 min, the mobile phase was kept at 100% B and from 0.5 to 5 min, a linear gradient of A into B (5 to 95%) was run. The total run time was 7 min. The mobile phase was allowed to re-equilibrate for 3 min between injections. The flow rate was 1 ml/min. Retention times were 2.88 min for DEX, 5.0 min for 4-OH-DF, 3.25 min for DM and 6.0 min for DF. The MS detector was set in selected ion monitoring (SIM) mode for the quantitative analysis of DEX and 4-OH-DF ($m/z = MH^+$, M being the mass of the parent compound; $m/z = 296$ for DF, $m/z = 312$ for 4-OH-DF, $m/z = 272$ for DM and $m/z = 258$ for DEX). Nebulizer pressure was 60 psi while the drying gas (nitrogen) was delivered at 13 L/min. Capillary voltage was 3500V and the fragmentor collision-induced dissociation cell was set at 70V. Analytes were identified on the basis of their retention times and mass spectra compared to standard solutions. Calibration curves (4.88-10 000 nM) were constructed by quadratic regression of the analyte peak area vs concentration curves (using a weighting factor of 1/concentration). Regression coefficients were always higher than 0.999. Mean intra-day variation was less than 10%, accuracy averaged 95% and the LOQ was 4.88 nM.

***p*-nitrophenol hydroxylase assay.** An incubation mixture containing KH_2PO_4 (0.1 M pH 7.4), *p*-nitrophenol (100 μ M) and liver microsomes (0.3 mg/ml final protein concentration) was pre-incubated for 5 min at 37°C. The enzymatic reaction was initiated by the addition of NADPH (1mM final) and was allowed to proceed for 30 min. The final assay volume was 500 μ l. Control incubations were performed to ensure product formation linearity against time and protein concentration. The reaction was stopped with the addition of 100 μ l of trichloroacetic acid (20 % v/v).

Samples were then vortex-mixed, put on ice for 10 min and centrifuged (3 500 g for 30 min at 4°C). Supernatant aliquots (125 µl) were transferred into a polystyrene 96-well plate and diluted with 62.5 µl of NaOH (2 mM). The plate was shaken briefly and absorbance was measured by spectrophotometry at 535 nm.

Data Analysis Cytochrome P450 levels, total P450 contents and P450 activities were expressed as percentages of the mean of the control group. Differences between FCA-treated and control groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan post-hoc test. The level of significance was set at 0.05.

RESULTS

Inflammatory mediators in FCA-treated rats. In the early days following injection, FCA administration is associated with local inflammatory signs such as edema, erythema and hyperalgesia [5]. In our study, FCA injection led to the development of an acute inflammatory response, as evidenced by paw edema and increased AGP and NOx levels. Indeed, all FCA-treated rats showed significant paw edema (measured by paw volume in comparison to control rats) (figure 1A). From 24h to 7 days after FCA treatment, NOx plasma levels were found to be significantly higher in FCA-treated than in control rats (figure 1B). Peak NOx levels ($287 \pm 24 \mu\text{M}$) occurred at 72h post-FCA administration. AGP levels were also significantly increased in FCA-treated rats between 24 and 72h post-FCA. AGP levels decreased to control levels 7 days after the FCA injection (figure 1B). IL-6 could not be detected in any plasma samples from control rats ($< 31 \text{ pg/ml}$). In FCA-treated animals, IL-6 levels were detectable at 8h post-injection ($219 \pm 70 \text{ pg/ml}$). TNF- α and IL-1 β concentrations were found to be below the limit of detection in all plasma samples (FCA-treated and control rats).

Total CYP levels and individual protein contents in rat liver microsomes. In rats treated with FCA, total P450 contents were significantly decreased when compared to controls (figure 2). In agreement with literature values, mean P450 contents were $\sim 0.6 \text{ nmol/mg protein}$ for the control group [11]. Weak but significant correlations were observed between total P450 contents in liver microsomes and NOx or AGP plasma levels ($r = -0.52$; and -0.60 ; $p < 0.01$). Western blots of CYP2C11, CYP3A2, CYP2B and CYP2E1 in liver microsomes obtained from rats sacrificed 72h following FCA or saline administration are shown in figure 3. Figure 2 shows that significant reductions in CYP2B levels (~ 30 to 60%) were observed between 24 and 72h post-FCA. After 7 days, CYP2B contents were back to control levels. CYP2C11 was the most severely affected by FCA administration and its expression was suppressed in a time-dependent manner. A significant decrease (down to 40% of control values) was

observed 24h after FCA administration. The effect was maximal at 48h (down to 23% of control values) and CYP2C11 levels slowly increased up to approximately 60% of controls, 7 days following FCA injection. In contrast, CYP3A2 microsomal contents were not altered by FCA treatment (figure 2). CYP2E1 protein contents were decreased to 60 and 70% of control levels 24 and 48h after FCA treatment respectively, but this decrease was not statistically significant.

Testosterone hydroxylation in rat liver microsomes. In rats, CYP2B, CYP2C11 and CYP3As have been shown to catalyze the hydroxylation of testosterone at the 16 β , 2 α /16 α and 6 β positions, respectively [12]. Up to 72h post-FCA, CYP2C11-related activities were lower in microsomes from FCA-treated rats than in controls (figure 4). At 48h post-FCA, testosterone 2 α and 16 α -hydroxylase were severely affected, with a 70% decrease in activity compared to controls. At 7 days post-FCA, CYP2C11-related activities were back to control values. FCA did not have any significant influence on testosterone 6 β -hydroxylase (CYP3As) (figure 4). Since constitutive CYP2B expression is very low in livers from uninduced rats, 16 β -hydroxytestosterone levels were below the LOQ in all samples and no activity could be measured.

Other CYP activities in rat liver microsomes. DF 4-hydroxylation was significantly altered in rats treated with FCA when compared to controls (figure 5). This CYP2C6-related activity decreased to a maximum of 65% of control values at 24h post-FCA. After 7 days, DF hydroxylase activity was back to control values. In addition, FCA administration significantly decreased the hydroxylation of *p*-nitrophenol (CYP2E1) at 24 and 72h post-FCA (figure 5). In contrast, DM *O*-demethylation was not altered in liver microsomes obtained from FCA-treated rats compared to controls (figure 5).

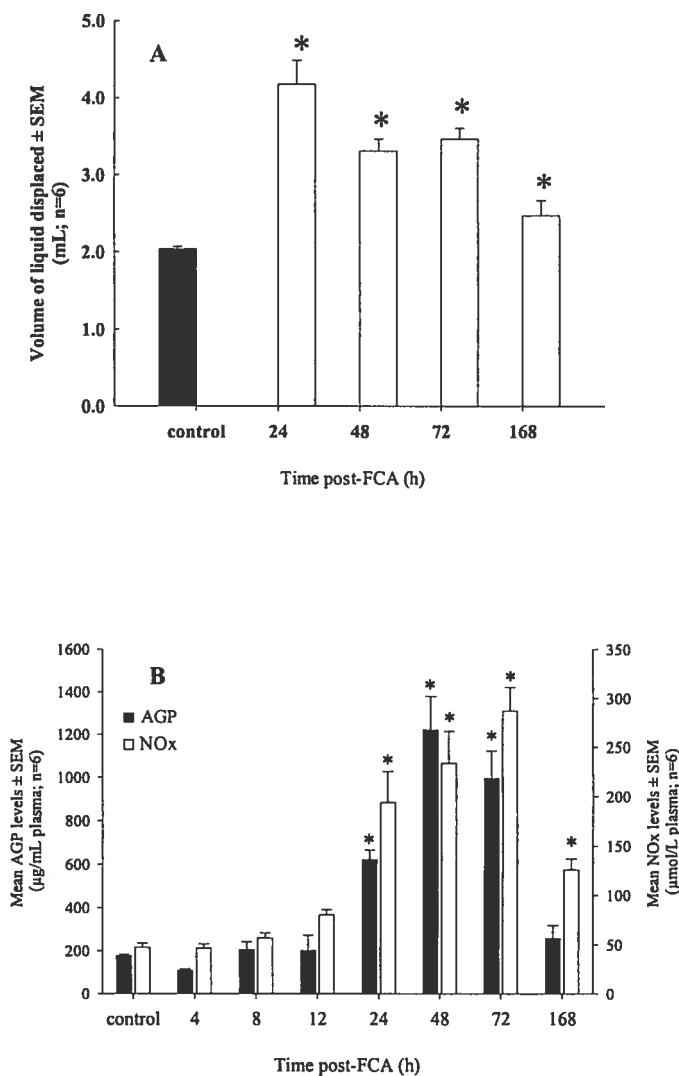


Figure 1. (A) Volume of liquid displaced by the left hindpaw following a subcutaneous administration of saline (control; ■) or FCA (□) to rats. (B) Nitrite + Nitrate (NO_x, □) and AGP levels (■) in plasma following a subcutaneous administration of saline (control) or FCA to rats.

* $p < 0.05$: Naïve vs FCA-treated rats.

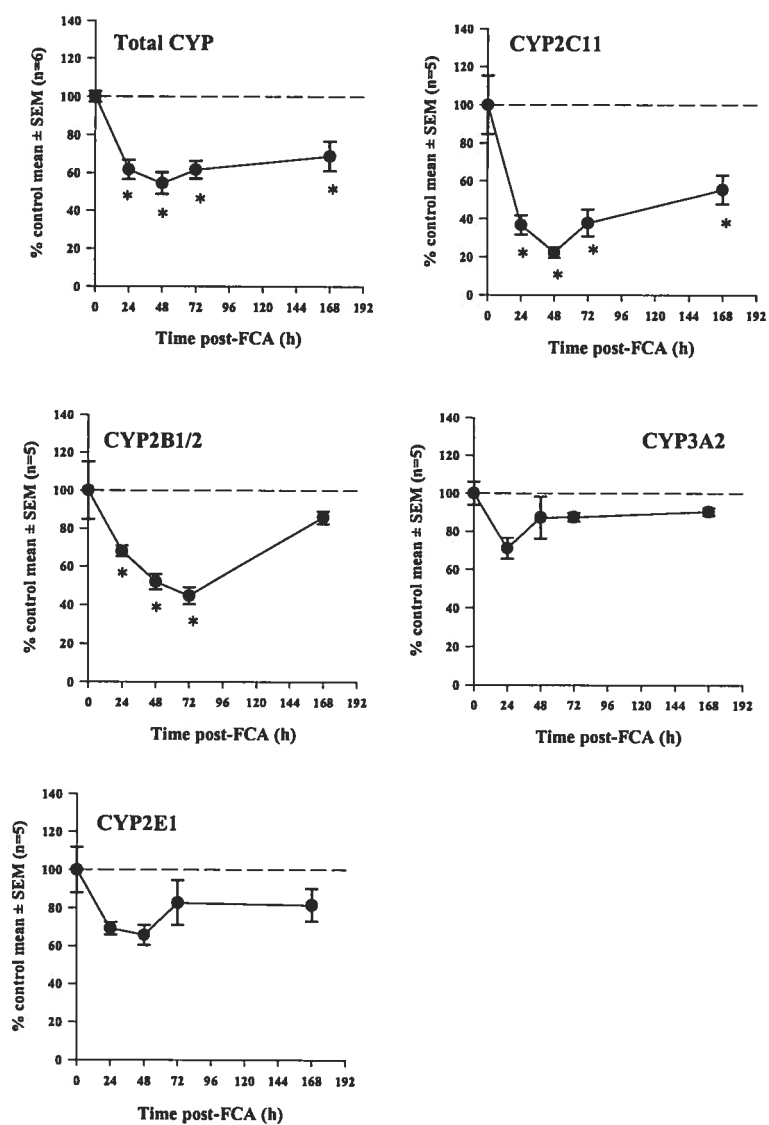


Figure 2. Total CYP and CYP3A2, CYP2E1, CYP2C11, CYP2C6 and CYP2B1/2 proteins contents in rat liver microsomes following a subcutaneous administration of saline (control)/FCA to rat.

* $p < 0.05$: Naïve vs FCA-treated rats.

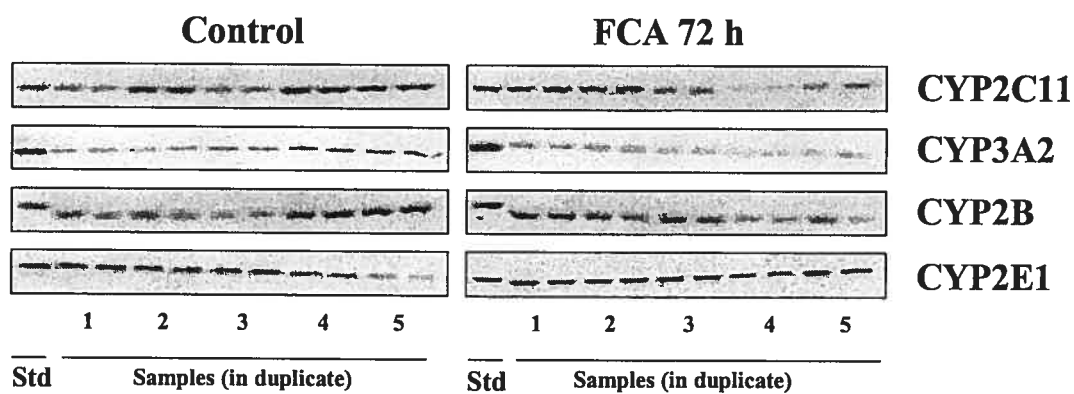


Figure 3. Western blotting analysis of hepatic microsomal CYP isoforms obtained from control and FCA-treated (72 h) rats.

Microsomes were subjected to SDS-PAGE electrophoresis and probed for different protein CYPs using anti-rat polyclonal antibodies. 625 to 2500 ng (CYP2B1/2, 2C11, 2E1, and 3A2) of microsomal protein were loaded in each lane.

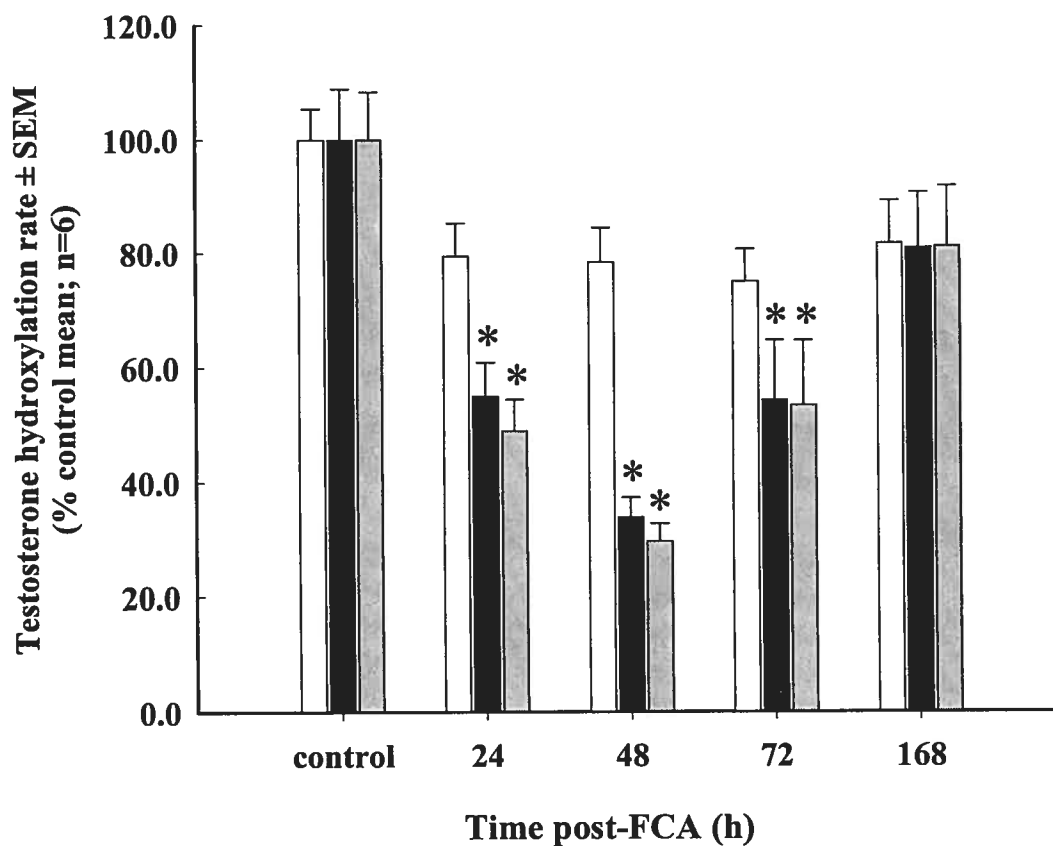


Figure 4. Rates of 6 β (\square), 16 α (\blacksquare) and 2 α (\blacksquare) hydroxytestosterone formation in rat liver microsomes following a subcutaneous administration of saline (control) or FCA to rats.

* $p < 0.05$: Naïve vs FCA-treated rats.

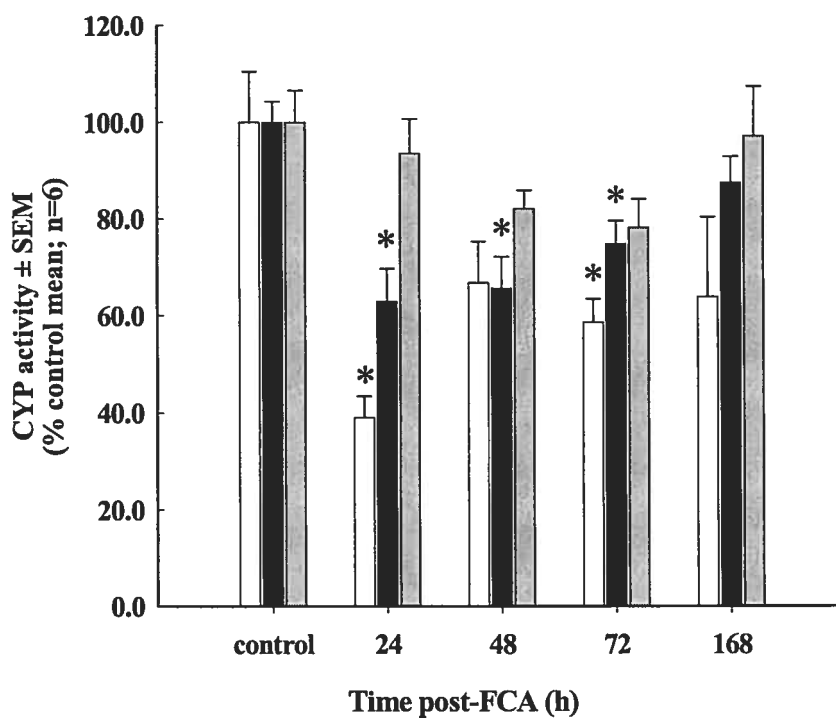


Figure 5. *p*-nitrophenol hydroxylase (□), dextromethorphan-O-demethylase (■) and diclofenac-4-hydroxylase (■) activities in rat liver microsomes following a subcutaneous administration of saline (control) or FCA to rats.

* $p < 0.05$: Naïve vs FCA-treated rats.

DISCUSSION

In this study, we showed that in rats, a single FCA injection downregulates hepatic P450 expression in the first days following injection. The observed decrease in total P450 levels (30-45% at 2-3 days post-FCA) appears to be more modest than reported in FCA-arthritic rats [85% at 14 days post-FCA, [7]] but comparable to that detected 24 and 48h after the administration of turpentine, another rat model of acute local inflammation [13], suggesting that inflammation severity modulates P450 contents. Indeed, the release of pro-inflammatory cytokines appears to be more important in FCA-arthritic rats [14], where TNF- α and IL-6 were increased 14 to 25 days after FCA injection, than in our FCA-treated rats, where only IL-6 was increased at 8h post-injection. In addition, the fact that, in our rat model, plasma NOx and AGP, which increased with paw edema, were negatively correlated with P450 levels substantiates further the correlation between inflammation intensity and the decrease in P450 contents.

Our results demonstrate that FCA-induced inflammation has a selective effect on CYP expression and/or activity in rat liver. CYP3A2 and CYP2E1 contents were unaltered in FCA-treated rats compared to controls while protein levels of CYP2B and CYP2C11 were strongly downregulated. CYP2C11 was the only isoform that did not return to control values but remained at less than 60% of control levels at 7 days post-FCA. Since CYP2C11 contents were so severely diminished, and because this isoform is the major P450 constitutively expressed in male rat liver [13,15] the decrease in total P450 contents observed in FCA-treated rat liver is likely to result from decreased CYP2C11 protein levels. Literature findings in other rat models of acute inflammation confirm the major impact of inflammation on CYP2C11, and to a lesser extent on CYP2B. In turpentine-treated rats, liver CYP2C11 contents were severely decreased 24 to 48h after injection [13]. However, since no other CYP isoforms were measured, one could not conclude to a specific effect on CYP2C11. In rats submitted to peritoneal macrophage stimulation by particulate irritants,

CYP2C11 (mRNA and protein) liver expression was profoundly suppressed while CYP2E1 and CYP3A2 remained unchanged [16]. In livers from LPS-treated Sprague-Dawley rats sacrificed at 24h after injection, CYP2C11 and CYP2B, but also CYP3A2 mRNA and protein levels were diminished [17, 18].

This paper demonstrates that FCA-induced inflammation not only affects P450 protein levels but also P450-mediated oxidative activities. Consistent with the observed downregulation in CYP2C11 contents, testosterone 2 α /16 α -hydroxylation rates (CYP2C11-specific activities) were severely diminished in FCA-treated rats. CYP3A-specific activity remained unaltered (testosterone 6- β hydroxylation), as were the CYP3A2 protein levels. CYP2E1 was the only isoform for which the FCA-induced protein contents did not agree with the reduction in catalytic activity, as measured by *p*-nitrophenol hydroxylase activity. This inconsistency could be explained by the overall regulation of CYP2E1, which may involve several mechanisms both at the transcriptional level and at the post-translational level [19]. For instance, Oesch-Bartlomowicz and Oesch have shown that some P450s, in particular CYP2B and CYP2E1, can be inactivated post-translationally without any decrease in their protein contents, through phosphorylation on a serine residue by cyclic AMP dependent protein kinases [20]. Therefore, it is possible that the inflammatory processes triggered by FCA activate mechanisms that decrease CYP2E1 catalytic activity or protein turnover.

Several lines of evidence suggest that pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1 β and TNF- α are involved in the induction of iNOS and the synthesis of acute phase proteins such as AGP [21, 22]. Since the observed decrease in P450 contents/activities triggered by FCA administration was accompanied by an increase in NO and AGP production, we proceeded to characterize the time-course of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in plasma obtained from control and FCA-treated rats. At any time point, there was no significant difference in IL-1 β and TNF- α plasma levels between

FCA-treated and control rats. In contrast, IL-6 was significantly increased in plasma from FCA-treated rats compared to controls at 8h post-injection. These findings are in agreement with literature reports where IL-1 β and TNF- α levels were found to be drastically increased locally (in the rat hindpaw) but not systemically (in plasma) following FCA treatment [5, 23]. This was also the case in turpentine-treated rats, where IL-1 β and TNF- α serum concentrations did not change compared to control rats [24, 25]. The authors also measured IL-6 circulating levels and these were found to peak at the same time post-injection (8h) as in our study after FCA administration. Together these findings suggest that IL-6 plays an important role in selectively altering the expression of hepatic P450s in FCA-treated rats.

Studies in turpentine-treated or control rabbits have demonstrated that serum IL-6, and not IL-1 β and TNF- α , is responsible for the decrease in total P450 contents in hepatocytes obtained from the turpentine-treated group [26]. *In vitro*, the incubation of primary cultures of rat hepatocytes with IL-6 was associated with a decrease in CYP2C11 and CYP2B mRNA and/or protein levels [27, 28]. *In vivo*, IL-6 administration decreased CYP2C11 mRNA/protein contents, but had no effect on CYP3A2 or CYP2E1 protein levels [29]. These studies confirmed the role of IL-6 but could not exclude the involvement of IL-1 β and TNF- α since these cytokines have been shown to promote the secretion of IL-6 [25]. Finally, in IL-6 knock-out mice, the mRNA contents of many P450s (Cyp1a2, Cyp2a5 and Cyp3a11) were not affected by turpentine treatment, which further corroborates the predominant role of IL-6 in P450 downregulation following an inflammatory stimulus [30].

In conclusion, our study demonstrates that a single FCA injection in the rat hindpaw leads to the development of an acute inflammatory response, as evidenced by paw edema and increased AGP, NO $_x$ and IL-6 plasma levels in the early days that follow FCA injection. These changes are accompanied by a rapid decrease in total P450 contents in rat liver and the selective downregulation of specific CYP isoforms, as illustrated by decreased contents and/or activities in CYP2B, CYP2C6, CYP2C11

and CYP2E1 in FCA-treated rat liver microsomes. These early biochemical modifications may have consequences when drugs are administered to FCA-treated rats, particularly for highly hepatically-cleared drugs. Considering the widespread use of rodent inflammatory models in pain research, a better knowledge of these modifications could allow us to explain pharmacokinetic variability and to improve the pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of new chemical entities.

ACKNOWLEDGEMENT

AstraZeneca R&D Montreal is acknowledged for studentship assistance to Denis Projean.

NOTATIONS

AGP, α_1 -acid glycoprotein; ANOVA, analysis of variance; API-ES, atmospheric pressure ionization–electrospray; CYP, cytochrome P450 isoform; DM, dextromethorphan; DEX, dextrorphan; DF, diclofenac; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FCA, Freund’s complete adjuvant; HPLC/MS, High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry; 4-OH-DF, 4-hydroxy-diclofenac; IL, Interleukin; LOQ, limit of quantification; LPS, lipopolysaccharide (*E. coli* endotoxin); M, mass of the parent compound; MH⁺, molecular ion; m/z, mass over charge ratio; M, mass spectrometry; NADPH, nicotinamide adenosine diphosphate reduced form; NO_x, total nitrite levels; P450, cytochrome P450; SIM, selected ion monitoring; SDS, sodium dodecyl sulfate; TNF- α , tumor necrosis factor α .

REFERENCES

- [1] Morgan ET, Sewer MB, Iber H, Gonzalez FJ, Lee YH, Tukey RH, Okino S, Vu T, Chen YH, Sidhu JS, and Omiecinski CJ. Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* **26**:1232-1240 (1998).
- [2] Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* **29**:1129-1188 (1997).
- [3] Yaksh TL. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol Sci* **20**:329-337 (1999).
- [4] Fraser GL, Gaudreau GA, Clarke PB, Menard DP and Perkins MN. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br J Pharmacol* **129**:1668-1672 (2000).
- [5] Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, Poole S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br J Pharmacol* **121**:417-424 (1997).
- [6] Carlson RP and Jacobson PB. Comparison of adjuvant and streptococcal cell wall-induced arthritis, In: Morgan DW and Marshall LA editors. *In vivo models of inflammation*. Birkhäuser, Boston, 1999, pp. 1-50.
- [7] Toda A, Ishii N, Kihara T, Nagamatsu A and Shimeno H. Effect of adjuvant-induced arthritis on hepatic drug metabolism in rats. *Xenobiotica* **24**:603-611 (1994).

- [8] Omura T and Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**:2370-2378 (1964).
- [9] Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, Cook DC, Burton LA, Latham J, Nevins C and Parkinson A. Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys* **331**:145-169 (1996).
- [10] Whalley PM, Bakes D, Grime K and Weaver RJ. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the separation of hydroxylated testosterone metabolites. *J Chromatogr B* **760**:281-288 (2001).
- [11] Sewer MB and Morgan ET. Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450s by endotoxin in vivo occurs independently of nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Ther* **287**:352-358 (1998).
- [12] Sonderfan AJ, Arlotto MP, Dutton DR, McMillen SK, Parkinson A. Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* **255**:27-41 (1987).
- [13] Morgan ET. Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin. *Mol Pharmacol* **36**:699-707 (1989).
- [14] Szekanecz Z, Halloran MM, Volin MV, Woods JM, Strieter RM, Kenneth HG, III, Kunkel SL, Burdick MD, and Koch AE. Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **43**:1266-1277 (2000).

- [15] Nedelcheva V and Gut I. P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**:1151-1175 (1994).
- [16] Sewer MB, Koop DR and Morgan ET. Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. *J Pharmacol Exp Ther* **280**:1445-1454 (1997).
- [17] Sewer MB, Koop DR, Morgan ET. Endotoxemia in rats is associated with induction of the P4504A subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* **24**:401-407 (1996).
- [18] Khatsenko O and Kikkawa Y. Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* **280**:1463-1470 (1997).
- [19] Hakkola J, Hu Y, Ingelman-Sundberg M. Mechanisms of down-regulation of CYP2E1 expression by inflammatory cytokines in rat hepatoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **304**:1048-54 (1997).
- [20] Oesch-Bartlomowicz B and Oesch F. Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch. *Arch Biochem Biophys* **409**:228-234 (2003).
- [21] MacMicking J, Xie QW and Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**:323-350 (1997).
- [22] Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* **181**:257-66 (1997).

- [23] Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, and Woolf CJ. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* **410**:471-475 (2001).
- [24] Cooper AL, Brouwer S, Turnbull AV, Luheshi GN, Hopkins SJ, Kunkel SL and Rothwell NJ. Tumor necrosis factor-alpha and fever after peripheral inflammation in the rat. *Am J Physiol*, **267**:R1431-R1436 (1994).
- [25] Luheshi GN, Stefferl A, Turnbull AV, Dascombe MJ, Brouwer S, Hopkins SJ and Rothwell NJ. Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat. *Am J Physiol* **272**: R862-R868 (1997).
- [26] Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H and Du Souich P. Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines. *Br J Pharmacol* **130**:1777-1784 (2000).
- [27] Chen JQ, Strom A, Gustafsson JA and Morgan ET. Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol Pharmacol* **47**:940-947 (1995).
- [28] Carlson TJ and Billings RE. Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol Pharmacol* **49**:796-801 (1996).

- [29] Morgan ET, Thomas KB, Swanson R, Vales T, Hwang J and Wright K. Selective suppression of cytochrome P-450 gene expression by interleukins 1 and 6 in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1219**:475-483 (1994).
- [30] Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J and Jover R. Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology* **32**:49-55 (2000).

CHAPITRE IV

*Drug metabolism and pharmacokinetics of the
non-peptidic delta agonist SNC80 in naïve and
FCA-treated rats*

DRUG METABOLISM AND
PHARMACOKINETICS OF THE NON-
PEPTIDIC DELTA AGONIST SNC80 IN NAÏVE
AND FCA-TREATED RATS

**Denis Projean, Murray P. Ducharme, Étienne Lessard, Sophie
Dautrey and Julie Ducharme**

Pharmaceutical Research

Soumis, 2003

ABSTRACT

Purpose. This study was carried out to characterize the metabolism and pharmacokinetics of SNC80 in rats and to evaluate the impact of Freund's complete adjuvant (FCA)-induced inflammation on its body disposition. **Methods.** The intrinsic clearance (CL_{int}) of SNC80 was measured following incubations in liver microsomes from naive and 24h-FCA-treated rats. The unbound fraction (f_u) was assessed by ultrafiltration. SNC80 was administered to naive and 24h-FCA-treated rats at 10- μ mol/kg i.v. and 50 μ mol/kg p.o. **Results.** In rats, SNC80 showed a high plasma clearance (3.1 L/h/kg), low renal clearance (<0.02 L/h/kg) and poor bioavailability (<4%). Its absorption was nearly complete (98%), pointing to metabolic first-pass as the major factor limiting oral bioavailability. Following i.v. administration, its plasma clearance was significantly lower in FCA-treated vs. untreated rats. Despite significant decreases in f_u (~40%) and CL_{int} (~30%) in FCA-treated rat plasma and microsomes, in vivo, the bioavailability and oral clearance of orally administered SNC80 were not significantly different in FCA-treated vs. naive rats. **Conclusions.** Our results suggest that hepatic and possibly intestinal first-pass contribute to the low bioavailability of SNC80 and that in FCA-treated rats, non-hepatic mechanisms may compensate for the decrease in plasma clearance, preventing an increase in the oral bioavailability of SNC80.

Key words: SNC80, pharmacokinetics, inflammation, FCA

In rodents, inflammatory states induced by a variety of stimuli are often associated with significant hyperalgesia and allodynia (1). Freund's Complete Adjuvant (FCA)-induced inflammation has been shown to initiate a complex sequence of events, both locally and centrally, that can lead to the activation of a variety of genes involved in the modulation and integration of pain (2). Consistent with these observations, the expression of the δ receptor, a receptor known to play an important role in pain control, is up-regulated in spinal dorsal horn neurons following a single injection of FCA to rats (3).

The selective non-peptidic δ receptor agonist, SNC80 (figure 1), exerts weak antinociceptive effects in naive rodents when administered centrally or systemically (4; 5). Similar to other δ receptor agonists administered centrally (e.g. D-[Ala(2), Glu(4)] deltorphin or deltorphin II), SNC80 has been associated with enhanced antinociceptive effects when administered to FCA-treated rats (3; 6). In anaesthetized FCA-treated rats, intra-arterial administration of SNC80 reduced the hypersensitivity of the flexor reflex (7). These results suggest that the δ receptor is a promising target for the treatment of inflammatory pain.

Although most commonly used analgesics have been tested in rats suffering from FCA-mediated hyperalgesia/allodynia, little is known about the influence of inflammation on their pharmacokinetics, especially in the early days following FCA injection. In rats treated with a single dose of FCA, the inflammatory response observed 14 days post-injection (FCA-induced arthritis) is characterized by pathophysiological changes that can alter drug disposition namely, elevated levels of α -1-acid glycoprotein (AGP) and/or decreased liver enzyme activity (8; 9). In agreement with *in vitro* evidence, the *in vivo* pharmacokinetics of several drugs are also altered in FCA-arthritic rats. (10).

While SNC80 is considered a gold standard of δ -mediated efficacy, its metabolism and pharmacokinetics are poorly understood. Preliminary results suggest that SNC80 is extensively metabolized in rat liver microsomes via an NADPH-dependent system (11; 12). In rat liver microsomes, the main metabolic pathways of SNC80 appear to be *N*-dealkylation and *O*-demethylation, both routes accounting for approximately 80% of its total microsomal metabolism *in vitro* (11). In addition, data obtained with SNC121 (figure 1), a structural analogue of SNC80, suggest that SNC80 would be hepatically-cleared and biotransformed into an *O*-demethylated metabolite *in vivo* (13).

The goal of this study was to understand better the metabolic and pharmacokinetic events that occur following FCA-induced inflammation and their potential impact on drug response. Therefore, this study was designed, on one hand, to characterize the pharmacokinetics and excretion profile of SNC80 in naive rats and on the other hand, to determine the pharmacokinetic modifications induced by a single FCA injection 24h before drug administration. We also investigated if there was any relationship between *in vitro* and *in vivo* changes, using *in vitro-in vivo* models as predicting tools.

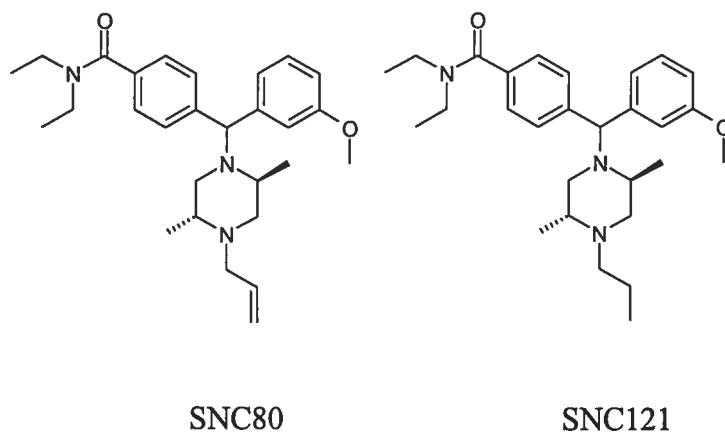


Figure 1. Chemical structures of SNC80 and SNC121.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents. SNC80 (figure 1) and SNC121 were purchased from Tocris Cookson (Ballwin, MO, USA). The bis-hydrochloride salt of SNC80 was prepared at AstraZeneca R&D Montreal. *Mycobacterium tuberculosis*, human AGP and human albumin were obtained from Sigma (Sigma, St-Louis, MO, USA). All other chemicals were purchased from VWR international (Montréal, Québec, Canada) and were of reagent or analytical grade.

Animals and treatments. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of AstraZeneca R&D Montréal. Experiments were carried out according to CCAC (Canadian Council on Animal Care) and AAALAC (Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) guidelines. Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, Québec, Canada), weighing 170-220 g, were housed under standard conditions (light/dark cycle of 12h; room temperature: $22\pm 1.5^{\circ}\text{C}$) with food and water *ad libitum*. Freund's complete adjuvant (FCA) was prepared from 1-mg heat killed *Mycobacterium tuberculosis* dissolved in 0.85-ml paraffin oil and 0.15 ml mannide oleate. Inflammation was induced by the single subcutaneous administration of 100 μl of FCA into the left hindpaw. All experiments were conducted 24h following FCA administration. Naive rats were selected as controls.

Plasma and tissue collection. Naive and FCA-treated rats ($n=6/\text{group}$) were humanely sacrificed by cardiac puncture under light isoflurane anaesthesia and blood was collected into tubes containing (K_3) EDTA as anticoagulant. Blood samples were centrifuged (15 min, 3000 g) and plasma was decanted and stored at -80°C . Livers were collected quickly following cardiac puncture, washed to remove excess blood, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Rat liver microsomes were prepared by differential ultracentrifugation according to the method of Pearce *et al.* (14). Microsomes were washed and the final pellets (resuspended in 0.25M sucrose)

were stored at -80°C . Microsomal proteins were measured by the BCA protein assay (Pierce, Woburn, MA, USA) using bovine serum albumin solutions as standards. Quantification of cytochromes P450 was carried out according to the method of Omura and Sato (15).

***In vitro* experiments**

Plasma protein levels in naive and FCA-treated rats. Plasma AGP levels were measured using a commercially available single radial immunodiffusion method (Cardiotech Services, Inc., Louisville, KY, USA). Plasma albumin levels were measured using the bromocresol green (BCG) method (Sigma, St-Louis, MO, USA).

SNC80 protein binding in human plasma, human AGP and human albumin solutions and plasma obtained from naive and FCA-treated rats. A micropartition system (Amicon, Millipore Corp, Bedford, MA, USA) was used to determine the unbound fraction (f_u) of SNC80 by ultrafiltration (BSC corp., Colmar, PA, USA). Human AGP (0.07 g/100 mL) and albumin (4 g/100 mL) solutions were prepared in potassium phosphate 100 mM pH 7.4 at typical concentrations found in human plasma, 0.07 g/100 mL and 4 g/100 mL, respectively (16). Briefly, 1.5 ml of biological fluid or protein solution was spiked with an aqueous solution of SNC80 to give a final concentration of 2500 nM. Aliquots (400 μL) were placed into a filter device and centrifuged at 2000 g (22°C) for 20 min using a fixed angle rotor. Concentrations of SNC80 in the ultrafiltrate (unbound; CF_{SNC80}) and in plasma (bound + unbound; CT_{SNC80}) were determined by LC-MS. The non-specific binding (NSB) to the membrane was always less than 30%. The fraction unbound (f_u) was calculated using the following equation:

$$f_u = \left\{ \text{CF}_{\text{SNC80}} / (\text{CT}_{\text{SNC80}} \times \text{NSB}) \right\} \times 100 \quad (1)$$

In vitro intrinsic clearance of SNC80 in liver microsomes obtained from naive and FCA-treated rats. The *in vitro* intrinsic clearance (CL_{int}) of SNC80 was obtained using the rate of disappearance of the compound over time (*in vitro* “half-life” approach) (17). All incubations [rat liver microsomes (0.05 mg/ml of proteins), SNC80 (1 μ M), 0.1M KH_2PO_4 buffer at pH 7.4 and NADPH (1 mM)] were performed in duplicate at 37°C. The final assay volume was 0.5 mL and final solvent concentration (DMSO) was less than 1%. After a 5 min pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of NADPH. At T=0 and at 5, 10, 15, 20 and 30 min, aliquots were collected and transferred into a vial that had an equivalent volume of acidified acetonitrile (0.1% formic acid + internal standard SNC121). Samples were vortex-mixed, put at 4°C for 10 min, centrifuged at 10 000 g for 30 min and stored at –80°C until LC/MS analysis.

In vitro-in vivo predictions. The CL_{int} of SNC80 was scaled up to an *in vivo* intrinsic clearance (CL'_{int}) as described in the following equation [using published values of physiological scaling factors: 45 mg of microsomal proteins per g of liver and 40 g of liver per kg of body weight (17; 18)].

$$CL'_{int} = CL_{int} \cdot (45 \text{ mg microsomes/g liver}) \cdot (40 \text{ g liver/kg body weight}) \quad (2)$$

The CL'_{int} of SNC80 was entered into equation 3, along with estimates of rat hepatic blood flow (19) and the experimentally determined f_u in plasma, to predict the *in vivo* hepatic clearance (CL_h) of SNC80 using the well-stirred model.

$$CL_h = [Q \cdot f_u (CL'_{int})] / [Q + f_u (CL'_{int})] \quad (3)$$

Assuming complete absorption and a total clearance approximating the hepatic clearance, the predicted oral bioavailability (F_{pred}) of SNC80 was predicted using the following equation (17):

$$F_{pred} = 1 - E_h = 1 - [CL_h / Q_h] \quad (4)$$

***In vivo* experiments**

Pharmacokinetics of SNC80 in naive and FCA-treated rats. SNC80 bis-hydrochloride was dissolved in saline. Four different test groups [two groups of naive rats (A,B) and two groups of FCA-treated rats (C,D)] were included in the study. Groups A and C (n=4/group) received an intravenous bolus of SNC80 (10 μ mol/kg) while groups B and D (n=5/group) received a dose of 50 μ mol/kg by oral gavage. Blood (250-300 μ L) was obtained by tail bleeding and samples were collected at the following time points after drug administration: groups A and C, 0.08, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 12h; groups B and D, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12h. Each blood sample was centrifuged immediately (10 min, 3000 g) and the plasma was separated and stored at -80°C until analysis. Potassium (K₃) EDTA was used as anticoagulant (20 μ L per 300 μ L of blood).

Excretion of SNC80 in urine and feces of naive and FCA-treated rats. In another experiment, naive and FCA-treated rats were administered SNC80 (10 μ mol/kg iv, 50 μ mol/kg po; n=2/route of administration) according to the protocol described in the previous section. Urine and feces were collected at room temperature using metabolic cages. Urine was collected over the following intervals: 0-4, 4-8, 8-24, 24-28, 28-32 and 32-48h after drug administration. Feces were collected in 24h intervals until 48h. All samples were stored at -80°C until analysis. On the day of analysis, feces samples were weighted and powdered using a freezer-mill (Spex certiprep inc., Metuchen, NJ, USA).

Oral absorption of SNC80 naive and FCA-treated rats. The absorption of SNC80 was estimated from the amount of SNC80 recovered unchanged in feces after oral and intravenous administration.

$$\% \text{ absorbed} = 100\% - (\text{mean } (\%) \text{SNC80}_{\text{feces,p.o.}} - \text{mean } (\%) \text{SNC80}_{\text{feces,i.v.}}) (5)$$

Sample preparation. *Urine.* A 50 μL aliquot was first diluted with one volume of water and the mixture was further diluted with 3 volumes of methanol:water (1:2) acidified with 1% acetic acid containing the internal standard diclofenac (20 μM). Samples were centrifuged at 4°C (9000 g) for 10 minutes. *Feces.* 100 mg of feces powder were suspended in 500 μL of NaOH 1N, spiked with 20 μL of amitriptyline (5 μM ; internal standard) and extracted twice with ethyl acetate (2 mL). The organic fractions were collected, combined and evaporated at 50°C under a stream of nitrogen. Residues were reconstituted in 500 μL (or more as needed) of water:acetonitrile (1:1) acidified with 0.1% formic acid. *Plasma and in vitro preparations (protein solutions and microsomal incubations).* Samples (40-100 μL) were diluted with one volume of ice-cold acetonitrile containing the internal standard SNC121 (1 μM). Samples were centrifuged at 11 000 g for 30 min at 4°C.

LC-MS bioanalysis of SNC80 in various biological media. *MS detection.* SNC80 and SNC86 were analyzed using a single quadrupole mass spectrometric detector (MSD) (HP1100/Benchtop MS detector with API-ES source, Agilent, Québec, Canada) running in positive ion mode. The MSD was operated in selected ion monitoring mode [$m/z = \text{MH}^+$, M being the mass of the compound; $m/z = 450$ for SNC80 and: $m/z = 452$ for SNC121, $m/z 296$ for diclofenac or $m/z 278$ for amitriptyline].

Urine. A 10 μl aliquot was injected onto a Luna- C_{18} column (4.6 \times 75 mm: 3.5- μm particle size; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column temperature was kept constant at 40°C. The mobile phase consisted of a mixture of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) and was delivered at a flow rate of 1 ml/min. A step-wise gradient of B into A was run over 12 min. It consisted of a linear gradient increasing to 95% of B over 8 min, followed by an isocratic hold of 4

min. A re-equilibration phase of 2 min was allowed between injections. Retention times were 4.5 min for SNC80 and 7.2 min for the internal standard diclofenac.

Feces, plasma and in vitro preparations. A 10 μ l aliquot of each sample was injected onto an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 \times 30 mm: 3.5- μ m particle size). The mobile phase consisted of a mixture of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) and was delivered at a flow rate of 1 ml/min. A step-wise gradient of B into A was run over 7 min. It consisted of a linear gradient increasing to 50% of B over 5.4 min, followed by a rapid increase to 95% of B over 1 min. The retention time of SNC80 was 4.8 min. The retention times for the selected internal standards were 4.6 min for amitriptyline (feces) and 4.9 min for SNC121 (plasma and *in vitro* preparations).

The SNC80 standard curve covered dynamic ranges of 50 to 100 000 nM in urine and 0.1 to 50 nmol/g in feces while it ranged from 4.88-9.77 to 5000 nM in plasma and *in vitro* preparations. All calibration curves were constructed using a quadratic regression of the analyte/internal standard peak area ratio vs concentration curves (using a weighting factor of 1/concentration). In all biological media, the mean intra-day precision was more than 90%, mean accuracy was 105% and regression coefficients were always better than 0.995. The limits of quantification of SNC80 were 50 nM in urine, 0.1 nmol/g in feces and 9.77 nM in plasma and *in vitro* preparations.

Data analysis. The pharmacokinetic parameters of SNC80 were calculated using a non-compartmental approach (20). The areas under the curve from time 0 to the last measurable plasma concentration (AUC_{0-t}) were calculated using the linear trapezoidal rule. The rate constant of elimination (kel) was calculated using the last three plasma concentrations and the elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693/kel$. The area under the curve extrapolated to infinity (AUC_{inf}) was calculated using $AUC_{0-t} + C_{last}/kel$ where C_{last} was the last measurable plasma concentration. The bioavailability (F) of SNC80 was calculated using $(AUC_{inf p.o.}/D_{p.o.})/(AUC_{inf i.v.}/D_{i.v.})$.

The plasma (CL) and oral (CL/F) clearances were calculated by dividing the dose (D) by the appropriate AUC_{inf} . The mean residence time (MRT) was obtained after i.v. administration by dividing the area under the first moment-time curve ($AUMC_{inf}$) by the AUC_{inf} . The total volume of distribution (V_{ss}) was calculated using $CL \times MRT$. The renal clearance was calculated as the fraction of the SNC80 dose excreted in urine multiplied by CL. A compartmental method was also used to get a better description of the concentration-time profiles, as the noncompartmental method did not allow the determination of important estimates such as the first order rate of absorption constant (Ka), t_{max} and C_{max} .

Compartmental pharmacokinetic analyses were performed using maximum likelihood analysis with ADAPT-II[®] (USC biomedical simulation resource, Los Angeles, USA). A two-compartment model was found to be the most appropriate to fit the data and adequately describe the pharmacokinetics of SNC80 in FCA-treated and naive rats. Discrimination between models (i.e. two compared one or three-compartment) was decided based upon the visual quality of the fit and the minimization of the aiKaikie information criterion test. The same two-compartment model included Ka and a lag time (T_{lag}) to fit the data obtained after oral administration. Pharmacokinetic parameters obtained (CL, V_{ss} , $t_{1/2}$, F) were compared to those found using the noncompartmental approach to validate the model.

Statistical analyses. The statistical significance of differences in mean pharmacokinetic parameters (noncompartmental) between FCA-treated and naive rats was obtained by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test (Sigma Stat 2.0, San Raphael, CA, USA). The significance level was set at 0.05. All other comparisons between FCA-treated and naive rats were performed using an unpaired Student *t*-test.

RESULTS

Protein levels in plasma obtained from naive and FCA-treated rats. In FCA-treated rats, AGP plasma levels were significantly increased (3-fold) when compared to untreated rats (figure 2). In contrast, albumin levels were slightly lower in FCA-treated than in naive rats (26 ± 2 g/L vs. 30 ± 2 g/L; $p < 0.05$).

***In vitro* protein binding of SNC80 in plasma and protein solutions.** In rat plasma, more than 93% of the total concentration was found bound to plasma proteins. The *in vitro* unbound fraction of SNC80 was significantly decreased (1.5 fold) in plasma obtained from FCA-treated when compared to naive rats (figure 2). SNC80 was also highly bound to proteins (93-96%; $n=2$) in human plasma. In solutions of human AGP and albumin, SNC80 was bound at 80-82% ($n=2$) and 38-40% ($n=2$), respectively.

***In vitro* intrinsic clearance of SNC80 and total CYP contents in liver microsomes obtained from naive and FCA-treated rats.** SNC80 was extensively metabolized in rat liver microsomes with a mean *in vitro* CL_{int} of 1102 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein (figure 3). Compared to naive rats, total CYP levels were lower in liver microsomes obtained from FCA-treated rats (figure 3) and the CL_{int} of SNC80 was decreased to a similar extent (40%). The CL_{int} of SNC80 obtained in rat liver microsomes allowed us to extrapolate hepatic clearances (CL_h) of 2.56 and 1.63 L/h/kg in naive and FCA-treated rats, respectively.

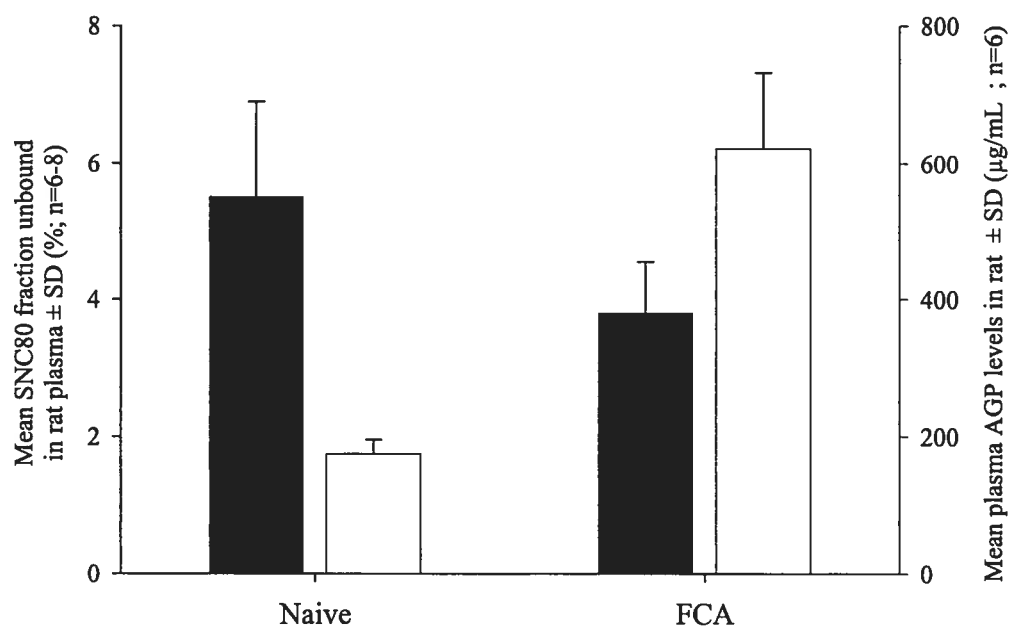


Figure 2. Mean total AGP levels (\square) and mean unbound fraction (\blacksquare) of SNC80 in rat plasma obtained from naive and FCA-treated rats. * $p < 0.05$: Naive vs. FCA-treated rats.

* $p < 0.05$: Naive vs. FCA-treated rats.

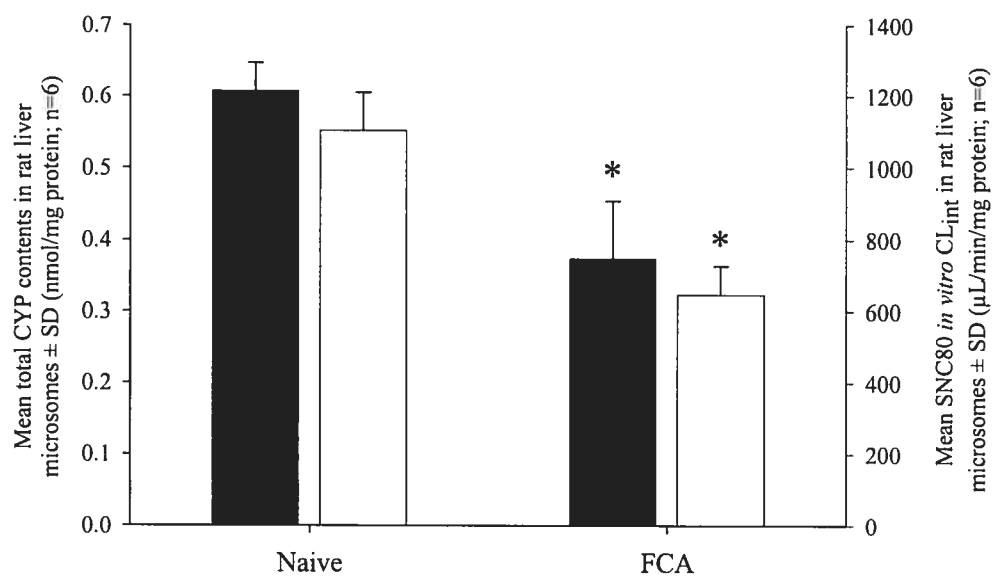


Figure 3. Mean total CYP contents (■) and mean *in vitro* CL_{int} (□) of SNC80 in rat liver microsomes obtained from naive and FCA-treated rats.

* $p < 0.05$: Naïve vs. FCA-treated rats.

Excretion of SNC80 in urine and feces of naive and FCA-treated rats. Irrespective of the administration route, less than 1% of the dose was recovered as SNC80 in urine of naive and FCA-treated rats (table I). Accordingly, using these data, the renal clearance of the parent compound was estimated to be low, approximating 0.002 L/h/kg. In naive rats, only 1 and 3% of the dose was found as unchanged SNC80 in feces following intravenous and oral administration, respectively, indicating that SNC80 was almost completely absorbed (~98%) following oral administration. In FCA-treated rats, the proportions of unchanged SNC80 recovered in feces following oral and intravenous administration were similar to those obtained in naive rats.

Table I. Percentage of the dose found as SNC80 in rat urine or feces following intravenous (10 $\mu\text{mol/kg}$) or oral (50 $\mu\text{mol/kg}$) administration of SNC80 to naïve and FCA-treated rats. Experiments were performed with two rats per group.

		SNC80 (% dose)	
		Intravenous (n=2/group)	Oral (n=2/group)
Naive	Urine	0.05-0.1	0.001-0.008
	Feces	1.1-1.4	2.6-3.6
FCA	Urine	0.05-0.1	0.001-0.008
	Feces	0.33-0.48	0.81-0.85

Intravenous pharmacokinetics of SNC80 in naive and FCA-treated rats.

Noncompartmental analysis. Mean plasma concentration-time profiles of SNC80 following a single intravenous dose of SNC80 to rats are shown in figure 4. In naive rats, SNC80 had a high plasma clearance (3.11 L/h/kg) and a relatively high V_{ss} (3.5 L/kg) (table II). Its apparent terminal elimination half-life was 2h. In FCA-treated rats, the plasma clearance of SNC80 was significantly lower (20%) than that obtained

in naive rats (figure 4, table II). Although small changes were observed in V_{ss} and $T_{1/2}$, differences were not statistically significant between FCA-treated and naive rats. *Compartmental analysis.* The pharmacokinetic parameters (CL , V_{ss}) estimated by the two-compartment pharmacokinetic model were similar to those calculated using the noncompartmental approach.

Oral pharmacokinetics of SNC80 in naive and FCA-treated rats.

Noncompartmental analysis. When SNC80 was administered orally, less than 5% of the dose reached the systemic circulation (table III). As evidenced in figure 5A, SNC80 mean plasma concentrations peaked at 108 ± 33 nM within 1h. SNC80 showed marked inter-rat variability in key pharmacokinetic parameters such as AUC_{inf} , t_{max} or C_{max} . All pharmacokinetic parameters, t_{max} , C_{max} and F of SNC80 were not significantly changed in FCA-treated rats when compared to naive animals. In FCA-treated rats, the oral clearance of SNC80 was decreased (30%), albeit not significantly, compared to naive rats (figure 5B, table III). *Compartmental analysis.* The absolute oral bioavailability of SNC80 estimated by the compartmental model ($F \sim 4\%$) was consistent with the bioavailability estimated using a noncompartmental approach (Table III). The fitted curve evidenced a double peak that was not detected noncompartmentally. The rate of absorption of SNC80 was relatively fast in naive and FCA-treated rats ($K_a = 0.42\text{-}0.44$ h⁻¹) and most of the dose (75%) was found to be absorbed over the time interval described by the first peak.

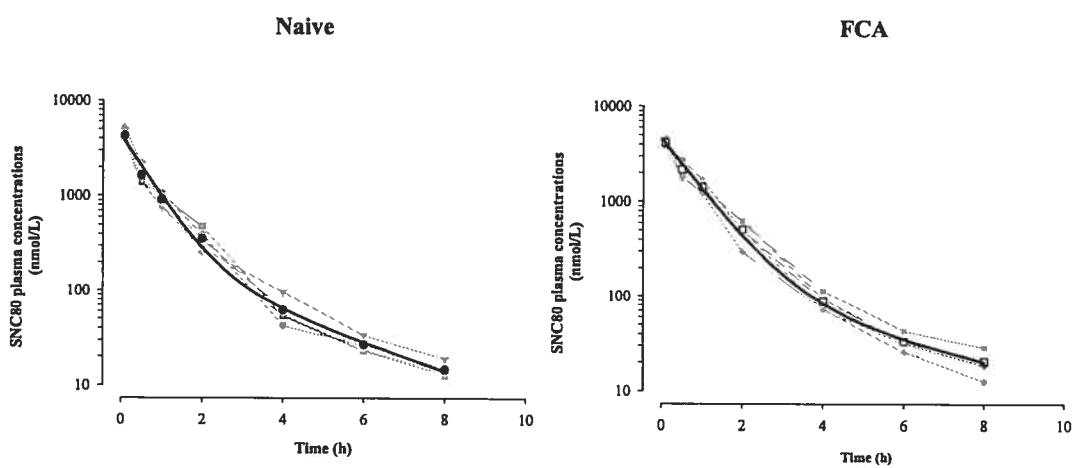


Figure 4. Mean plasma concentration-time profiles of SNC80 following a single intravenous administration ($10 \mu\text{mol/kg}$) to Naive (\bullet) and FCA-treated (\square) rats.

Solid lines represent the fit and the pale grey dashed lines and symbols represent individual animals

Table II. SNC80 pharmacokinetic parameters obtained following an intravenous (10 $\mu\text{mol/kg}$) administration of SNC80 to naïve and FCA-treated rats

	Naïve (n=4)		FCA (n=4)	
	Non-compartmental	Compartmental	Non-compartmental	Compartmental
	Mean (SD)	estimates	Mean (SD)	estimates
C_{max} (nmol/L)		4355		4591
$\text{AUC}_{\text{inf,iv}}$ (hr*nmol/L)	3226 (247)		4141 (435)*	
CL (L/hr/kg)	3.11 (0.25)	3.07	2.44 (0.27)*	2.44
$T_{1/2}$ (hr)	2.00 (0.25)	1.82	1.88 (0.21)	2.03
V_{ss} (L/kg)	3.54 (0.71)	3.25	2.97 (0.26)	3.02

* $P < 0.05$: Naïve vs FCA-treated rats

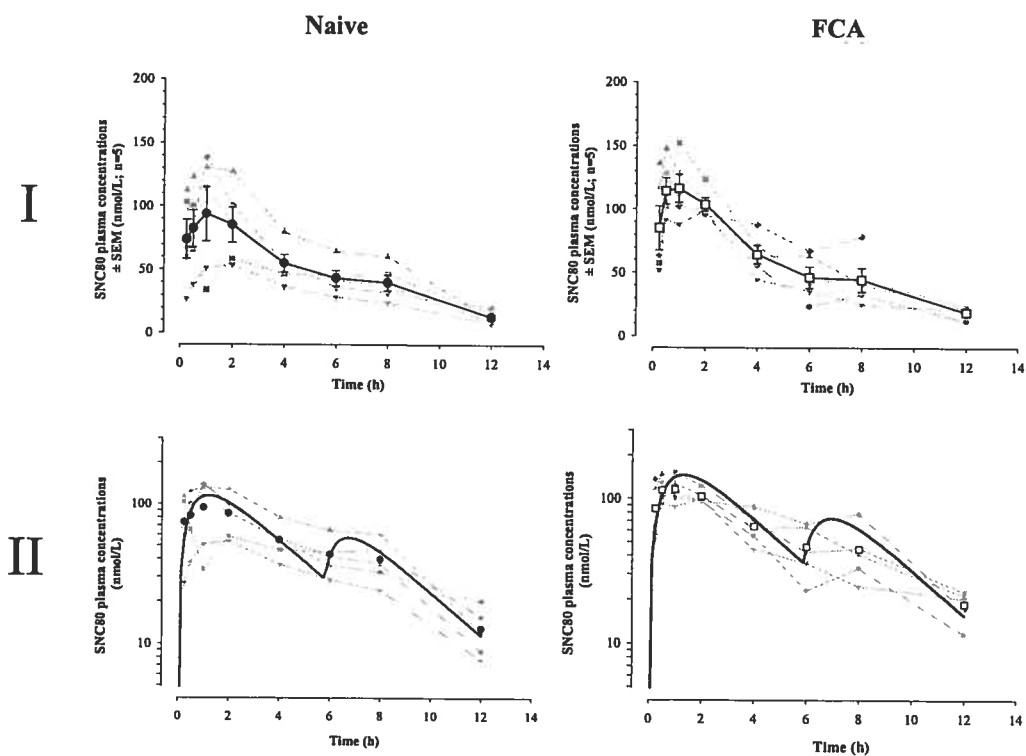


Figure 5. Mean plasma concentration-time profiles of SNC80 following a single oral administration (50 $\mu\text{mol/kg}$) to Naive (\bullet) and FCA-treated (\square) rats.

Solid lines represent linear interpolation (I) or the fit (II) and the pale grey dashed lines and symbols represent individual animals

Table III. SNC80 pharmacokinetic parameters obtained following an oral (50 $\mu\text{mol/kg}$) administration of SNC80 to naive and FCA-treated rats

	Naïve (n=5)				FCA (n=5)	
	Non-compartmental		Compartmental estimates		Non-compartmental Compartmental estimates	
	Mean (SD)				Mean (SD)	
C_{max} (nmol/L)	108 (33)		115; 57		129 (23)	146; 73
t_{max} (h)	1.05 (0.6)		1.18; 6.9		0.95 (0.7)	1.18; 6.9
K_a (h ⁻¹)	1.05 (0.6)		0.42		0.95 (0.7)	0.44
$AUC_{\text{inf,po}}$ (hr*nmol/L)	650 (194)				815 (131)	
CL/F (L/hr/kg)	84 (29)				63 (12)	
F (%)	4.0		4.1		4.0	4.2

* $P < 0.05$: Naïve vs FCA-treated rats

DISCUSSION

In the present study, data obtained *in vitro* and *in vivo* support the hypothesis that the main elimination pathway of SNC80 in rats is CYP-mediated liver metabolism. In agreement with previous findings, SNC80 was extensively metabolized in rat liver microsomes via an NADPH-dependent process (11; 12). Our results also show that the renal clearance of SNC80 in rats is low, amounting to less than 1% of the plasma clearance, indicating that SNC80 is mainly eliminated via a non-renal process. Moreover, the excretion of SNC80 into the gastro-intestinal tract is probably minor as only a small proportion of the intravenous dose (1%) was found in feces.

In vivo, the plasma clearance of SNC80 is high ($CL = 3.12$ L/h/kg) and in good agreement with that predicted from liver microsome Cl_{int} values (2.6 L/h/kg). Assuming predominant hepatic metabolism and a blood-to-plasma ratio of 1, our results suggest that SNC80 is acting as an intermediate-to-high extraction drug in rats ($CL > 70\%$ of the hepatic blood flow). SNC80 is also characterized by a large volume of distribution ($V_{ss} = 3.22$ L/kg), which exceeds total body water. The distribution of SNC80 is reflected on its terminal half-life, which is about 2h despite extensive plasma clearance. *In vitro*, SNC80 has a high affinity for rat and human plasma proteins with a fraction bound of more than 90%.

When SNC80 was administered orally to rats, only 4% of the dose reached the systemic circulation. The low oral bioavailability could be attributed to extensive first-pass metabolism in the liver as hepatic drug metabolism contributes significantly to the elimination of SNC80. However, our results show that hepatic metabolism may not be the sole determinant of SNC80 poor oral bioavailability in the rat. Indeed, when oral bioavailability is predicted from the plasma clearance of SNC80 obtained following intravenous administration or from *in vitro* data, estimates average 27% rather than the experimentally measured 4%. This points to another barrier potentially contributing to the loss of SNC80, probably one related to the gastrointestinal tract

(21). More specifically, this may be due to poor absorption of the compound or extensive metabolism within the intestinal mucosa. The latter is probably the most likely since we found that the absorption of SNC80 was nearly complete (98%) after oral administration to rats.

Our compartmental analysis evidenced the presence of a double peak in the plasma concentration-time profile of SNC80 following oral administration. In rats, multiple peak pharmacokinetics have been observed for many drugs administered orally, such as acebutolol and alprazolam (22; 23). Factors contributing to atypical absorption may include pre-systemic metabolism/efflux (enterohepatic cycling), the presence of an "absorption window" along the gastrointestinal tract or variable gastric emptying (24). For SNC80, enterohepatic recycling is unlikely, as the plasma concentration-time profiles did not show the presence of a late peak after its intravenous administration. Although the double peak seen with the oral plasma profile could be due to differential rates of absorption along the gastrointestinal tract, data obtained from the literature suggest that this atypical profile is more likely to result from a decrease in gastro-intestinal motility. Hence, SNC80 has been shown to inhibit small intestine peristalsis in the guinea pig and colonic transit in the mouse and rat (25-27).

In this study, pharmacokinetic results showed differences in the plasma disposition of SNC80 after intravenous administration to FCA-treated rats compared to naive controls. These modifications were essentially found in the elimination processes and led to a 22% decrease in the plasma clearance of SNC80. In the literature, FCA-induced arthritic rats appear to show unchanged or decreased clearance depending on the drug administered. Consistent with our data, the clearance of R-hydroxychloroquine, a low to intermediate extraction drug in rats, was decreased (28). In contrast, the clearance of propranolol, a high extraction drug, was not significantly altered (10).

According to the well-stirred model, the clearance of intermediate to high extraction drugs such as SNC80 should depend on any of these physiological parameters: liver blood flow, f_u or CL_{int} (29). Accordingly, the observed decrease in the plasma clearance of SNC80 in FCA-treated rats could be the result of one or many factors affecting these parameters. First, altered plasma protein levels could be responsible for the decrease in clearance as SNC80 is highly bound to plasma proteins and FCA administration led to a 3-fold increase in AGP levels. Indeed, the f_u was significantly decreased in rat plasma 24h after FCA injection. As with SNC80, the plasma protein binding of many basic drugs has been shown to increase under inflammatory conditions where AGP levels are elevated (30). Another cause of reduced clearance could be a decrease in drug metabolism. This is likely as total CYP contents were decreased in liver microsomes obtained from FCA-treated rats. Other inflammatory stimuli were also found to decrease CYP contents and some NADPH-dependent activities in liver microsomes obtained from rats injected with different inflammatory stimuli (8; 31). Since we showed that the *in vitro* CL_{int} of SNC80 was decreased in liver microsomes from FCA-treated rats, decreased metabolism could underlie the decrease in the plasma clearance of SNC80. Finally, the contribution of altered blood flow is unlikely as it was shown not to be altered in FCA-arthritic rats (32).

The same scaling approach that was used to predict the *in vivo* clearance of SNC80 in naive rats correctly predicted a decrease in the plasma clearance of SNC80 in FCA-treated rats, when protein binding and *in vitro* CL_{int} values obtained from FCA-treated rat plasma/liver microsomes were used. These observations suggest that an increase in protein binding and a decrease in the *in vitro* CL_{int} may have converged towards a significant reduction in the plasma clearance of SNC80 in FCA-treated rats.

Following the oral administration of SNC80 plasma levels were consistently higher in FCA-treated rats in comparison with naive rats. However, interindividual variability, which is not unexpected for a compound with low oral bioavailability, precluded the differences from reaching statistical significance. The higher plasma concentrations

can probably be attributed to the lower oral clearance of SNC80 in FCA-treated rats, which in turn, probably results from a modification in its plasma clearance, as no changes in its oral bioavailability were observed. The latter observation is rather unexpected since the oral bioavailability of molecules principally eliminated by hepatic metabolism, such as SNC80, is typically found to be quite sensitive to factors affecting their elimination (29). According to our prediction of oral bioavailability, which assumes that oral absorption is complete and that liver metabolism represents the main driver of plasma clearance, we should have observed a 1.6-fold increase in the oral bioavailability of SNC80 in FCA-treated compared to naive rats ($F_{\text{pred}} = 42\%$ (FCA) vs 27% (naive)). Since this was not the case, it is likely that other non-hepatic mechanisms are involved and compensate for the decrease in metabolic clearance, preventing an increase in the oral bioavailability of SNC80 in FCA-treated rats.

Considering the potential role of intestinal metabolism in limiting the bioavailability of SNC80 in naive and FCA-treated rats, one could suggest that intestinal metabolism/uptake could be increased in FCA-treated rats, possibly as a result of decreased gastric emptying or gastrointestinal motility (33), thereby increasing the residence time of the molecule in the gastrointestinal tract. Further studies are needed to address this issue.

This is the first study assessing the metabolism and disposition of SNC80 *in vivo*. Our results show that, in the rat, SNC80 is mainly eliminated by the liver via CYP-mediated metabolism and demonstrates a high plasma clearance and a low oral bioavailability. Its low bioavailability is likely to result from extensive first-pass metabolism in the liver and/or gastrointestinal tract rather than from poor absorption. Our study also demonstrates that an acute inflammatory response induced by FCA administration triggers alterations in SNC80 pharmacokinetics in rats, particularly at the clearance level. Together the metabolic and pharmacokinetic changes found in our study support the importance of characterizing disease models in a pre-clinical setting.

ACKNOWLEDGEMENT

AstraZeneca R&D Montreal is acknowledged for studentship assistance to Denis Projean. The authors would like to thank Paul Jones and H el ene Desfoss es for preparing the bis-hydrochloride salt of SNC80 and Heli Parenteau and H el ene Maurice for their excellent technical assistance in the rat PK studies.

NOTATIONS

AGP; α -1-acid-glycoprotein; AUC_{0-t} , area under the curve from time 0 to the last measurable plasma concentration; AUC_{inf} , area under the curve extrapolated to infinity; BCG, bromocresol green; C_{last} , the last measurable plasma concentration; CL, plasma clearance; CL/F, oral clearance; CF_{SNC80} , unbound concentration of SNC80 in ultrafiltrate; CF_{SNC80} , plasma concentration of SNC80; CL_{int} , *in vitro* intrinsic clearance; CL'_{int} , scaled *in vivo* intrinsic clearance; CYP, cytochrome P-450; D, dose; F, bioavailability; F_{pred} , predicted bioavailability; FCA, Freund's complete adjuvant; f_u , fraction unbound in plasma; IV, intravenous; K_a , apparent absorption constant; K_{el} , rate constant of elimination; LC/MS, liquid chromatography/mass spectrometry, M, mass of the parent compound; MH^+ , molecular ion; m/z, mass over charge ratio; MRT, mean residence time; NADPH, nicotinamide adenosine diphosphate reduced form; PO, oral; Q, hepatic blood flow; $T_{1/2}$, elimination half-life; T_{lag} , lag time; V_{ss} , volume of distribution.

REFERENCES

1. T. L. Yaksh. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models, *Trends Pharmacol. Sci.*, 20:329-337 (1999).
2. C. J. Woolf and M. Costigan. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96:7723-7730 (1999).
3. C. M. Cahill, A. Morinville, C. Hoffert, D. O'Donnell, and A. Beaudet. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control, *Pain*, 101:199-208 (2003).
4. E. J. Bilsky, S. N. Calderon, T. Wang, R. N. Bernstein, P. Davis, V. J. Huby, R. W. McNutt, R. B. Rothman, K. C. Rice, and F. Porreca. SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273:359-366 (1995).
5. L. A. Pohorecky, A. Skiandos, X. Zhang, K. C. Rice, and D. Benjamin. Effect of chronic social stress on delta-opioid receptor function in the rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290:196-206 (1999).
6. G. L. Fraser, G. A. Gaudreau, P. B. Clarke, D. P. Menard, and M. N. Perkins. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation, *Br. J. Pharmacol.*, 129:1668-1672 (2000).
7. C. Q. Cao, Y. Hong, A. Dray, and M. Perkins. Spinal delta-opioid receptors mediate suppression of systemic SNC80 on excitability of the flexor reflex in normal and inflamed rat, *Eur. J. Pharmacol.*, 418:79-87 (2001).

8. E. T. Morgan. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection, *Drug Metab Rev.*, 29:1129-1188 (1997).
9. E. J. Lewis, J. Bishop, and S. J. Aspinall. A simple inflammation model that distinguishes between the actions of anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs, *Inflamm. Res.*, 47:26-35 (1998).
10. M. Piquette-Miller and F. Jamali. Selective effect of adjuvant arthritis on the disposition of propranolol enantiomers in rats detected using a stereospecific HPLC assay, *Pharm. Res.*, 10:294-299 (1993).
11. N. Plobeck, D. Delorme, Z. Y. Wei, H. Yang, F. Zhou, P. Schwarz, L. Gawell, H. Gagnon, B. Pelcman, R. Schmidt, S. Y. Yue, C. Walpole, W. Brown, E. Zhou, M. Labarre, K. Payza, S. St Onge, A. Kamassah, P. E. Morin, D. Projean, J. Ducharme, and E. Roberts. New diarylmethylpiperazines as potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonists with increased In vitro metabolic stability, *J. Med. Chem.*, 43:3878-3894 (2000).
12. Z. Y. Wei, W. Brown, B. TaKasaki, N. Plobeck, D. Delorme, F. Zhou, H. Yang, P. Jones, L. Gawell, H. Gagnon, R. Schmidt, S. Y. Yue, C. Walpole, K. Payza, S. St Onge, M. Labarre, C. Godbout, A. Jakob, J. Butterworth, A. Kamassah, P. E. Morin, D. Projean, J. Ducharme, and E. Roberts. N,N-Diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidenemethyl)benzamide: a novel, exceptionally selective, potent delta opioid receptor agonist with oral bioavailability and its analogues, *J. Med. Chem.*, 43:3895-3905 (2000).
13. J. A. Schetz, S. N. Calderon, C. M. Bertha, K. Rice, and F. Porreca. Rapid in vivo metabolism of a methylether derivative of (+/-)-BW373U86: the metabolic fate of [3H]SNC121 in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279:1069-1076 (1996).

14. R. E. Pearce, C. J. McIntyre, A. Madan, U. Sanzgiri, A. J. Draper, P. L. Bullock, D. C. Cook, L. A. Burton, J. Latham, C. Nevins, and A. Parkinson. Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity, *Arch. Biochem. Biophys.*, 331:145-169 (1996).
15. T. Omura and R. Sato. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature., *J. Biol. Chem.*, 239:2370-2378 (1964).
16. Ciba-Geigy. Composition of blood Blood-plasma proteins. In Lentner C. (ed), *Geigy Scientific Tables*, Ciba-Geigy, New Jersey, 1984, pp. 135-162.
17. R. S. Obach, J. G. Baxter, T. E. Liston, B. M. Silber, B. C. Jones, F. MacIntyre, D. J. Rance, and P. Wastall. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283:46-58 (1997).
18. J. B. Houston and D. J. Carlile. Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes, and liver slices, *Drug Metab Rev.*, 29:891-922 (1997).
19. M. D. Delp, M. V. Evans, and C. Duan. Effects of aging on cardiac output, regional blood flow, and body composition in Fischer-344 rats, *J. Appl. Physiol.*, 85:1813-1822 (1998).
20. M. Gibaldi and D. Perrier. Noncompartmental analysis based on statistical moment, pharmacokinetics. In M. Gibaldi and D. Perrier (eds), Marcel-Dekker, New York, 1982

21. V. J. Wacher, L. Salphati, and L. Z. Benet. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46:89-102 (2001).
22. M. Piquette-Miller and F. Jamali. Pharmacokinetics and multiple peaking of acebutolol enantiomers in rats, *Biopharm. Drug Dispos.*, 18:543-556 (1997).
23. Y. Wang, A. Roy, L. Sun, and C. E. Lau. A double-peak phenomenon in the pharmacokinetics of alprazolam after oral administration, *Drug Metab Dispos.*, 27:855-859 (1999).
24. H. Zhou. Pharmacokinetic strategies in deciphering atypical drug absorption profiles, *J. Clin. Pharmacol.*, 43:211-227 (2003).
25. M. Broccardo, G. Improta, and A. Tabacco. Central effect of SNC 80, a selective and systemically active delta-opioid receptor agonist, on gastrointestinal propulsion in the mouse, *Eur. J. Pharmacol.*, 342:247-251 (1998).
26. L. Negri, M. Broccardo, R. Lattanzi, and P. Melchiorri. Effects of antisense oligonucleotides on brain delta-opioid receptor density and on SNC80-induced locomotor stimulation and colonic transit inhibition in rats, *Br. J. Pharmacol.*, 128:1554-1560 (1999).
27. A. Shahbazian, A. Heinemann, H. Schmidhammer, E. Beubler, U. Holzer-Petsche, and P. Holzer. Involvement of mu- and Kappa-, but not delta-, opioid receptors in the peristaltic motor depression caused by endogenous and exogenous opioids in the guinea-pig intestine, *Br. J. Pharmacol.*, 135:741-750 (2002).

28. J. Emami, F. M. Pasutto, and F. Jamali. Effect of experimental diabetes mellitus and arthritis on the pharmacokinetics of hydroxychloroquine enantiomers in rats, *Pharm. Res.*, 15:897-903 (1998).
29. J. H. Lin and A. Y. Lu. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41:535-567 (2001).
30. Z. H. Israili and P. G. Dayton. Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs, *Drug Metab Rev.*, 33:161-235 (2001).
31. A. Toda, N. Ishii, T. Kihara, A. Nagamatsu, and H. Shimeno. Effect of adjuvant-induced arthritis on hepatic drug metabolism in rats, *Xenobiotica*, 24:603-611 (1994).
32. K. A. Walker, H. E. Barber, and G. M. Hawksworth. Mechanism responsible for altered propranolol disposition in adjuvant-induced arthritis in the rat, *Drug Metab Dispos.*, 14:482-486 (1986).
33. W. S. Nimmo. Drugs, diseases and altered gastric emptying, *Clin. Pharmacokinet.*, 1:189-203 (1976).

CHAPITRE V

*A highly selective delta receptor agonist with
improved metabolic profile and oral
bioavailability in the rat*

A HIGHLY SELECTIVE DELTA RECEPTOR
AGONIST WITH IMPROVED METABOLIC
PROFILE AND ORAL BIOAVAILABILITY IN
THE RAT

Denis Projean*, Dominic Salois*, Lynda Adam, Sophie
Dautrey, Pierre-Emmanuel Morin, Kemal Payza and Julie
Ducharme

* The authors contributed equally to the manuscript

British Journal of Pharmacology

Soumis, 2003

SUMMARY

1. In the present study, we characterized the *in vitro* pharmacology, biotransformation and *in vivo* pharmacokinetics profile of a new δ -receptor agonist, ARM390, and compared it to that of SNC80, a commonly used tool of δ -receptor mediated pharmacology.
2. ARM390 is an extremely selective (>4000-fold vs. μ and κ -receptors) δ -receptor agonist, at the cloned human receptor (EC_{50} 137 nM; E_{max} 80%) and in rat brain membranes (EC_{50} 336 nM; E_{max} 84%). Compared to ARM390, SNC80 is only 245 and 1890-fold selective for δ compared to μ and κ -receptors, respectively.
3. In rat liver microsomes, ARM390 is 15 times more stable than SNC80. Its major metabolic pathway *in vitro* and *in vivo* is *N*-desethylation into a metabolite that does not possess significant pharmacological activity. In contrast, SNC80 is biotransformed into several metabolites, predominantly *N*-desallyl-SNC80 and *O*-desmethyl-SNC80 (SNC86). In addition to being 100-200 fold more potent than SNC80 at the δ -receptor, SNC86 is also an agonist at μ and κ -receptors.
4. Following oral administration to rats, ARM390 is highly bioavailable (70%) whereas SNC80 has negligible bioavailability (<5%), leading to significant levels of SNC86 in plasma. In contrast, ARM827 plasma concentrations never surpassed that of ARM390, making it very unlikely to interfere with the pharmacological action of the parent compound.
5. In summary, ARM390 is a highly selective δ -receptor agonist with good oral bioavailability in rats. Its main metabolite does not possess δ , μ , or κ activity,

making it a more useful tool than SNC80 to investigate δ -receptor-mediated pharmacology and physiology *in vivo*.

KEYWORDS: ARM390, SNC80, SNC86, active metabolite, rat brain membrane, liver microsomes, opioid receptors

List of non-standard abbreviations used in this paper:

AUC_{0-t}, area under the curve from time 0 to the last measurable plasma concentration; AUC_{inf}, area under the curve extrapolated to infinity; C_{last}, the last measurable plasma concentration; CL, plasma clearance; CL/F, oral clearance; CF, unbound concentration of ARM390 in ultrafiltrate; CF, free plasma concentration of ARM390; CL_{int}, *in vitro* intrinsic clearance; CL'_{int}, scaled *in vivo* intrinsic clearance; CTOP, D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂; DAMGO, H₂N-Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol; D, dose; F, bioavailability; f_u, fraction unbound in plasma; i.v., intravenous; K_{el}, rate constant of elimination; HPLC/MS, liquid chromatography/mass spectrometry; M, mass of the parent compound; MH⁺, molecular ion; m/z, mass over charge ratio; MRT, mean residence time; p.o., oral; Q, hepatic blood flow; T_{1/2}, elimination half-life; V_{ss}, volume of distribution; SIM, selected ion monitoring; TIPP, Tyr-Tic-Phe-Phe; U-69593, ((+)-(5 α ,7 α ,8 β)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl]-benzene acetamide).

Opioid agonists produce their effects by acting at three main types of receptors, namely μ , κ and δ , present in both the central and peripheral nervous systems of many species including man (Bovill, 1997; Stein *et al.*, 2001). These receptors are activated either by exogenous opioids or endogenous peptides, modulating nociception, reward pathways, and response to stress (Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2002). Stimulation of opioid receptors also influences respiration, gastrointestinal motility, as well as endocrine and immune physiology (Kieffer & Gaveriaux-Ruff, 2002). Results obtained from laboratory animals suggest that the introduction of selective δ receptor agonists into therapeutics would allow the relief of pain without causing any of the μ and κ agonist-related side effects such as constipation, sedation, respiratory depression or dysphoria (Quock *et al.*, 1999). When administered centrally, selective δ -receptor agonists have been found to be potent antihyperalgesic agents in chronic inflammatory pain models (Fraser *et al.*, 2000a; Brandt *et al.*, 2001; Cahill *et al.*, 2003). These findings indicate that the δ -receptor may represent a promising target for the treatment of pain, especially that arising from inflammatory conditions.

One of the first non-peptidic agonists used to study δ -receptors, SNC80 (figure 1), suffers from limited potency and short-lived antinociceptive effects *in vivo* following s.c., i.m. or oral administration to rodents or monkeys (Bilsky *et al.*, 1995; Negus *et al.*, 1998). This could be due to suboptimal pharmacokinetic properties since SNC80 is extensively metabolized in rat liver microsomes via an NADPH-dependent system (Plobeck *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2000). In addition, data obtained with SNC121, a structural analogue of SNC80, suggest that SNC80 would be hepatically-cleared *in vivo* and form at least one metabolite with δ -receptor affinity (Schetz *et al.*, 1996). In agreement with these findings, we recently showed that SNC80 is mainly cleared via cytochrome P450-mediated pathways, which results in high plasma clearance *in vivo* and poor oral bioavailability in the rat (Projean *et al.*, submitted). These results

confirm that the pharmacokinetic properties of SNC80 represent a major limitation to its use as an *in vivo* pharmacological tool.

Arylxylidenemethylpiperidines such as ARM390 (figure 1) represent a new class of potent and exceptionally selective non-peptidic δ agonists (Wei *et al.*, 2000). The rigidity of the structure imposed by the double bond connected to the piperidine cycle appears to dramatically increase the selectivity of these compounds toward δ receptors. When compared to SNC80, ARM390 and a limited number of its derivatives showed much improved stability in rat liver microsomes (Wei *et al.*, 2000). This suggests that ARM390 could have a good pharmacokinetic profile *in vivo*.

The purpose of our study was threefold: i) to characterize the biotransformation of ARM390 and SNC80 in rat liver microsomes, ii) to compare the *in vivo* body disposition and metabolism of ARM390 and SNC80 after single intravenous (i.v.) and oral (p.o.) administration to rats and, finally, iii) to assess the possible contribution of the major metabolites of ARM390 and SNC80 to the *in vivo* activity of the parent compound by characterizing their full pharmacological profiles using rat brain membranes or cells expressing human μ , κ and δ -receptors.

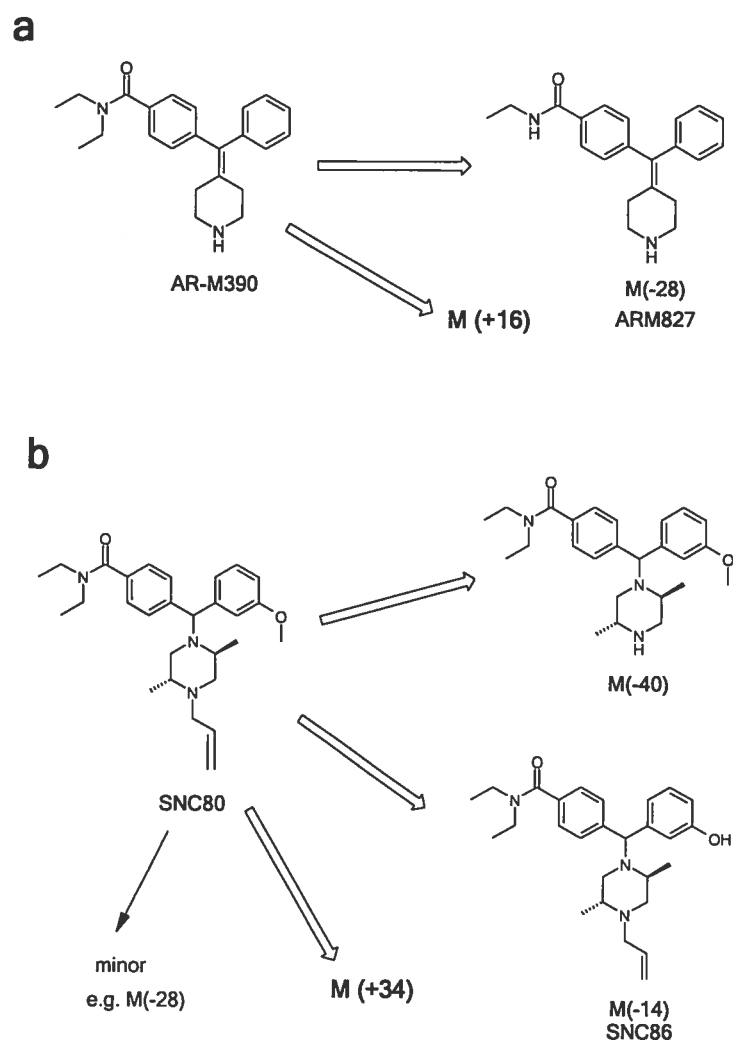


Figure 1. Proposed major metabolic pathways of ARM390 (a) and SNC80 (b) in rat liver microsomes.

MATERIAL AND METHODS

***In vitro* protein binding of ARM390 in rat plasma.** A micropartition system (Amicon, Millipore Corp, Bedford, MA) was used to determine the unbound fraction (f_u) of ARM390 by ultrafiltration in heparinized rat plasma. Briefly, a 1.5 ml sample was spiked with an aqueous solution of the compound to give final concentrations of 2.5 μ M. Aliquots (400 μ l) were placed into a centrifugal filter device. Samples were centrifuged at 2000 g for 20 min using a fixed angle rotor. The centrifuge temperature was set at 22°C. Concentrations in the ultrafiltrate (unbound; CF) and in plasma (bound + unbound; CT) were determined by HPLC-MS (see below for methods). Non-specific binding (NSB) to the membrane of the filter device was always less than 30 %. The fraction unbound (f_u) was calculated using the following equation (1):

$$f_u = \{CF/(CT \times NSB)\} \times 100 \quad (1)$$

***In vitro* intrinsic clearance of ARM390 in rat liver microsomes (RLM).** The *in vitro* intrinsic clearance (CL_{int}) of ARM390 was obtained using the rate of disappearance of the compound over time (*in vitro* “half-life” approach) (Obach *et al.*, 1997). All incubations [rat liver microsomes (0.1 mg ml⁻¹ of proteins), test article (1 μ M), 0.1M KH₂PO₄ buffer at pH 7.4 and NADPH (1 mM)] were performed in duplicate at 37°C. The final assay volume was 500 μ l and final solvent concentration (DMSO) was less than 1 %. After a 5 min pre-incubation at 37°C, the reaction was started by the addition of NADPH. At T=0 and at 10, 20 and 30 min, aliquots were collected and transferred into a vial that contained an equivalent volume of acidified acetonitrile (0.1% formic acid + internal standard SNC121). Samples were vortex-mixed, put at 4°C for 10 min, centrifuged at 10 000 g for 30 min and stored at -80°C until HPLC/MS analysis. The CL_{int} was scaled up to an *in vivo* intrinsic clearance (CL'_{int}) using published values of physiological scaling factors [45 mg of microsomal

proteins per gram of liver, and 40 g of liver per kg of body weight (Houston & Carlile, 1997; Obach *et al.*, 1997)], as described in the following equation:

$$CL'_{int} = CL_{int} (45 \text{ mg microsomes g}^{-1}) \cdot (40 \text{ g liver kg}^{-1} \text{ body weight}) \quad (2)$$

The CL'_{int} was entered in equation 3, along with estimates of rat hepatic blood flow ($Q = 4.2 \text{ l h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) (Delp *et al.*, 1998) and the experimentally determined f_u in plasma, to predict the *in vivo* hepatic clearance (CL_h) of ARM390 using the well-stirred model.

$$CL_h = (Q \cdot f_u \cdot CL'_{int}) \cdot (Q + f_u CL'_{int}) \quad (3)$$

The oral bioavailability of SNC80 was predicted assuming complete absorption and predominant hepatic drug metabolism using the following equation (Obach *et al.*, 1997):

$$F = 1 - (CL_h Q^{-1}) \quad (4)$$

***In vitro* metabolic profiling studies of ARM390 and SNC80 in RLM.** All incubations [RLM (0.1 mg ml^{-1} proteins), substrate at 100 nM, 1 mM NADPH, 0.1M KH_2PO_4 buffer at pH 7.4] were performed in duplicate in disposable 96-well plates on a gently shaking platform maintained at 37°C. Control incubations were carried out by incubating the same substrate concentrations in KH_2PO_4 buffer without rat liver microsomes or NADPH. The final assay volume was 500 μL , containing 1% DMSO. Incubations were started by the addition of NADPH (or buffer for NADPH-free controls) and were stopped after 0 and 60 min by the addition of 500 μL of ice-cold acetonitrile. Samples were vortex-mixed, put at 4 °C for 10 min, centrifuged at 10 000 x g for 30 min and stored at -80°C until HPLC-MS analysis.

Pharmacokinetics.

Animals. Male Sprague-Dawley rats catheterized (300-350 g) or not (170-220 g) were used (Charles River Laboratories, St-Constant, Canada or Wilmington, MA, USA). Catheterized rats had a catheter surgically implanted into the carotid artery by the vendor. Animals were housed under standard conditions (light/dark cycle of 12h; humidity 30-70%, room temperature: $21 \pm 1.5^\circ\text{C}$) with food and water *ad libitum*. Catheterized rats were individually housed in metabolic cages in an automated sample collection system (Culex[®]) and the cannula was connected to sterile heparinized saline lines in the automated system (Bioanalytical Systems Inc, West Lafayette, IN, USA). The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of AstraZeneca R&D Montréal. All procedures were conducted according to CCAC (Canadian Council on Animal Care) and AAALAC (Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) guidelines.

Pharmacokinetics of SNC80. The pharmacokinetics of SNC80 in rats have been published elsewhere (Projean *et al.*, submitted). However, metabolite data were not reported. All samples were re-assayed for bionalysis of both SNC80 and its *O*-demethylated metabolite.

Pharmacokinetics of ARM390. ARM390 monohydrochloride was dissolved in saline (iv) or in 11.25% hydroxypropylcyclodextrin in 0.05M sodium phosphate buffer pH 3 (p.o.). A first group of rats (n=4) received an intravenous bolus of ARM390 ($10 \mu\text{mol kg}^{-1}$) while another group (n=5) received a dose of $10 \mu\text{mol kg}^{-1}$ by oral gavage. Blood (250-300 μl) was obtained from the tail vein or removed automatically by catheter linked to the Culex system. Samples were collected at the following time points after drug administration at (0.083; i.v. only), 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, (16; p.o. only) and 24h. Each blood sample was centrifuged immediately (10 min, $3000 \times g$) and the plasma was separated and stored at -80°C until analysis. Sodium heparin was used as anticoagulant.

HPLC-MS analysis. Samples were analyzed using a single quadrupole mass spectrometric detector (HP1100/Benchtop MS detector with an API-ES source, Agilent technologies, Québec, Canada) operated in positive ion mode.

Metabolic profiling studies (qualitative analyses). Chromatographic separations of SNC80, ARM390 and their respective metabolites were achieved on a reversed-phase HPLC column (3.5- μ m particle-size Luna C18, 75 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of a linear gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid (0 to 75% v/v from 2 to 10 min). The flow rate was set at 1 ml min⁻¹. The MS was operated in scan mode for analysis of the incubates (m/z from 200 to 500). Nebulizer pressure was 60 psi while the drying gas (nitrogen) was delivered at 13 l min⁻¹. Capillary voltage was 3500V and the fragmentor collision-induced dissociation cell was set at 70V.

Metabolic stability, plasma protein binding and pharmacokinetic studies (quantitative analyses). An aliquot of each sample (5-10 μ l) was injected onto an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 \times 30 mm: 3.5- μ m particle size). The mobile phase consisted of a mixture of 0.1% formic acid in water (A) with 0.1% formic acid in acetonitrile (B) and was delivered at a flow rate of 1 ml min⁻¹. A step-wise gradient of B into A was run over 7 min. It consisted of a linear gradient increasing to 50 % of B over 5.4 min, followed by a rapid increase to 95 % of B over 1 min. Retention times were 3.6 min for ARM827, 4.2 min for SNC86, 4.2 min for ARM390, 4.8 min for SNC80 and 4.9 min for the internal standard SNC121. The MS was operated in selected ion monitoring (SIM) mode [m/z = MH⁺, M being the mass of the parent compound; m/z = 328 for ARM827, m/z = 349 for ARM390, m/z = 436 for SNC86, m/z = 450 for SNC80 and m/z = 452 for SNC121]. Nebulizer pressure was 60 psi while the drying gas (nitrogen) was delivered at 13 l min⁻¹. Capillary voltage was 3500V and the fragmentor collision-induced dissociation cell was set at 70V. The dynamic ranges of the SNC80, ARM390, ARM827 and SNC86 were from 4.88-9.77 to 5000 nM. Calibration curves were constructed using a quadratic regression of the analyte/internal standard peak area ratio vs concentration curves (using a weighting factor of 1/concentration). Mean intra-day precision was more than 90%,

mean accuracy approximately 95% and coefficients of regression were always better than 0.995. The limits of quantification of ARM827, ARM390 and SNC86 were 4.88 nM, while for SNC80, the limit of quantification was 9.77 nM.

***In vitro* pharmacology.**

Cell culture and membrane preparation. Human HEK-293S cells (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA) were subjected to stable transfections with cDNA encoding the human μ , κ and δ opioid receptors. Cell lines were grown in suspension at 37°C and 5% CO₂ in spinner flasks containing calcium-free DMEM, 10% FBS, and 600 $\mu\text{g ml}^{-1}$ G418. Human HEK-293S cells were harvested at 1 to 1.2 million cells ml^{-1} , pelleted, and resuspended in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.0, 2.5 mM EDTA, 0.5 mM PMSF). After lysis on ice for 15 min, cells were homogenized with a polytron for 10 S. The suspension was spun (1000 $\times g$) for 10 min at 4°C. The supernatant was kept on ice and the pellets resuspended and spun as before. The supernatants from both spins were combined and spun at 46 000 $\times g$ for 30 min. The pellets were resuspended in cold Tris buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.0) and centrifuged a second time at 46 000 $\times g$. The final pellets were resuspended in 50 mM Tris/ 0.32 M sucrose buffer pH 7.0. Aliquots were snap-frozen in dry ice/ethanol and stored at -80°C until use. Protein contents were determined by the modified Lowry assay with sodium dodecyl sulfate (Chin *et al.*, 1994). Rat brain membranes (minus cerebellum) were prepared as described previously (Fraser *et al.*, 1999).

Opioid receptor binding assays. Receptor binding assays were performed in duplicate as previously described (Plobbeck *et al.*, 2000). Membranes obtained from cell lines expressing human δ receptors (9.7 pmol mg^{-1} of protein), human μ receptors (0.29 pmol mg^{-1} of protein) or human κ receptors (3.4 pmol mg^{-1} of protein) were used for binding experiments (Plobbeck *et al.*, 2000). Membranes were added to 96 deep-well plates with appropriate concentrations of test compounds and 0.03-0.06 nM of the appropriate radioligand in binding buffer (50 mM Tris buffer, 3 mM MgCl₂,

and 0.1% BSA (pH 7.4): [125 I]-[D-Ala $_2$]deltorphin II ($K_d = 0.93$ nM at human δ -receptor), [125 I]-FK33824 ($K_d = 1.14$ nM at human μ -receptor), and [125 I]-D-Pro $_{10}$ -dynorphin A $_{[1-11]}$ ($K_d = 0.16$ nM at human κ -receptor). Total (TB) and nonspecific (NS) binding were determined in the absence and presence of naloxone (10 μ M), respectively. All samples were incubated 1h at room temperature (25°C) before being vacuum-filtered (Filtermate Harvester from PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada) through GF/B Unifilter plates (Perkin Elmer) presoaked in 0.1% PEI for 1h. After filtration, Unifilter plates were washed 3 times with ice-cold wash buffer (50 mM Tris, 5 mM MgCl $_2$, pH 7.0) and oven-dried at 55°C for 1h. Iodine-125 was measured in a TopCount Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer) after the addition of 65 μ l of MS-20 scintillation fluid (PerkinElmer) to each Unifilter plate well.

[35 S]GTP $_{\gamma}$ S binding assays. Since δ receptors were highly expressed in the HEK-293S cell clone used for binding assays than in rat brain membranes (9.7 pmol mg $^{-1}$ vs. 0.076 pmol mg $^{-1}$ of protein), we used membranes from a cell line having a lower receptor expression (0.633 pmol mg $^{-1}$ of protein) to assess δ agonist activity of compounds (Payza K., in press). The [35 S]GTP $_{\gamma}$ S assay on human μ and κ -receptors were performed on the same membranes used for the binding. The experimental procedure was modified from Fraser *et al.*, (1999). All membranes were thawed at 37°C, cooled on ice, passed 3 times through a 25-gauge needle, and diluted in GTP assay buffer. GTP assay buffer for rat brain, cloned human μ and κ -receptor membranes contained: 50 mM HEPES, 20 mM NaOH, pH 7.4, 5 mM MgCl $_2$, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.1% BSA. For the cloned δ -receptor, the concentrations of NaCl and BSA in the assay buffer were 200 mM and 0.5%, respectively. Test compounds (150 μ l; 2X of the final concentration), [35 S]GTP $_{\gamma}$ S (70 μ l; final concentration of 0.13-0.17 nM), and membrane (80 μ l) containing 10 (human μ - or κ -receptor) or 20 μ g of protein (rat brain or human δ -receptor) were combined in a 96-deep well plate to give a final volume of 300 μ l. Prior to addition to the plate wells, membranes were pre-incubated 10 min at room temperature (25°C)

with GDP, resulting in a final assay concentration of 3 (α -receptors, 15 (μ and β -receptors), or 120 μ M (rat brain membranes). Where appropriate, membranes were pre-incubated (25°C) 10 min with CTOP, or TIPP, giving a final concentration of 1 or 0.5 μ M, respectively. For δ -, μ -, and κ -receptors, the reference compounds were SNC80 (3 μ M final), DAMGO (30 μ M final) and U-69593 (3 μ M final), respectively. Reference compounds were used to define the maximal stimulated [35 S]GTP $_{\gamma}$ S binding. Basal [35 S]GTP $_{\gamma}$ S binding to membranes was determined in the absence of any test substance. All samples were incubated for 1h at room temperature (25°C) before being vacuum-filtered through GF/B Unifilter plates presoaked for 1h in water. After filtration, Unifilter plates were washed 3 times with ice-cold wash buffer (50 mM Tris, 5 mM MgCl $_2$, 50 mM NaCl, pH 7.0) and then oven-dried at 55°C for 1h. [35 S]GTP $_{\gamma}$ S was measured in a TopCount Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer) after the addition of 65 μ l of MS-20 scintillation fluid (PerkinElmer) to each Unifilter plate well.

Data analysis.

In vitro pharmacology. All *in vitro* analyses were performed using Prism version 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) unless otherwise stated. ***Receptor binding analyses.*** Receptor binding data were interpreted using nonlinear regression analyses appropriate for one-site competitive binding. The IC $_{50}$ values of test compounds were determined from 2-parameter logistic curve fits of percent specific binding vs log concentrations of the ligand (molar), solving for IC $_{50}$ and Hill slope.

[35 S]GTP $_{\gamma}$ S binding analyses. The E $_{max}$ values of the reference agonists (SNC80, DAMGO or U-69593) were set at 100% and were used to calculate percent relative E $_{max}$ values of all the other compounds. Values of EC $_{50}$ and E $_{max}$ for ligands were obtained from 3-parameter logistic curve fits of percent stimulated [35 S]GTP $_{\gamma}$ S binding vs log concentration of the ligand (molar), solving for EC $_{50}$, Hill slope and %E $_{max}$. The theoretical EC $_{50}$ value obtained in presence of an antagonist was calculated with the following equation (Kenakin, 1993):

$$EC_{50, \text{expected}} = EC_{50, \text{measured}} [1 + ((\text{antagonist concentration}) / (K_i))] \quad (5)$$

Pharmacokinetic analyses. Pharmacokinetic parameters were calculated using noncompartmental methods. The area under the curve from time 0 to the last measurable plasma concentration (AUC_{0-t}) was calculated using the linear trapezoidal rule (Gibaldi & Perrier, 1982). A rate constant of elimination (k_{el}) was calculated using the last three plasma concentrations, and the elimination half-life ($T_{1/2}$) was calculated using $0.693(k_{el})^{-1}$. The area under the curve extrapolated to infinity (AUC_{inf}) was calculated using $AUC_{0-t} + C_{last}(k_{el})^{-1}$; C_{last} being the last measurable plasma concentration. The clearance (CL) and oral clearance ($CL F^{-1}$) were calculated by dividing the dose (D) by the appropriate AUC_{inf} . The mean residence time (MRT) was obtained after i.v. administration by dividing the area under the first moment-time curve ($AUMC_{inf}$) by the AUC_{inf} , and the total volume of distribution (V_{ss}) was calculated using $CL \times MRT$. The bioavailability (F) was calculated using $(AUC_{inf p.o.} D_{i.v.}) \times (AUC_{inf i.v.} D_{p.o.})^{-1}$.

Opioid peptides and drugs. Mono-hydrochloride salts of ARM390 and its *N*-desethylated metabolite (ARM827) (Figure 1) were synthesized by the department of Chemistry at AstraZeneca R&D Montréal (Wei *et al.*, 2000a). Selective μ -receptor agonist H_2N -Tyr-D-Ala-Gly-N-Me-Phe-Gly-ol (DAMGO) and antagonist D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP) were purchased from Bachem Bioscience (King of Prussia, PA, USA). Selective δ -receptor agonist SNC80 and antagonist Tyr-Tic-Phe-Phe (TIPP) were obtained from Tocris Cookson (Ellisville, MO, USA) and Peninsula Laboratories (San Carlos, CA, USA), respectively. The bis-hydrochloride salt of SNC80 was prepared at AstraZeneca R&D Montreal. Selective κ -receptor agonist ((+)-(5 α ,7 α ,8 β)-N-methyl-N-[7-(1-pyrrolidiny)]-1-oxaspiro[4.5]dec-8-yl]-benzene acetamide) (U-69593) was purchased from Research Biochemicals International, (Natick, MA, USA). SNC86 bis-hydrochloride was a gift from Dr Kenner C. Rice (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Peptides: [D-Ala₂]deltorhin II, FK33824, and D-Pro₁₀-dynorphin A_[1-11] were purchased from Bachem Bioscience and radiolabelled with ¹²⁵I in house according to the method described by Fraser *et al.* (1999). Unless specified otherwise, all the compounds were dissolved in DMSO and stored at -40°C until use.

Chemicals and reagents. [³⁵S]GTPγS (specific activity, 1250 Ci/mmol; 46.3 TBq/mmol) was purchased from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA). Nicotinamide adenosine di-phosphate reduced form (NADPH), bovine serum albumin (BSA), dithiothreitol (DTT), guanosine diphosphate (GDP), polyethyleneimine (PEI) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were purchased from Sigma Chemicals (St-Louis, MO, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and G418 were obtained from Wysesent Inc. (St-Bruno, Quebec, Canada). Rat brains were purchased from HillTop Animals (Scottsdale, PA, USA). Rat liver microsomes (RLM) were obtained from CTBR (Senneville, Québec, Canada). All other chemicals were purchased from VWR international (Montréal, Québec, Canada) and were of analytical grade.

RESULTS

***In vitro* protein binding of ARM390 in rat plasma and *in vitro* intrinsic clearance in RLM.** The protein binding of ARM390 was moderate to high in rat plasma, with a bound fraction amounting to $80 \pm 4\%$ ($n=3$) of its total concentration. The *in vitro* CL_{int} of ARM390 calculated from its rate of disappearance in RLM was $75 \pm 7 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein and 15 times slower than obtained with SNC80 ($1200 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein; Projean et al., submitted). The *in vitro* CL_{int} of ARM390 allowed us to predict an hepatic clearance (CL_h) of $1.22 \text{ l h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ and an oral bioavailability of 70%.

Metabolic stability and major metabolites of ARM390 and SNC80 in RLM.

Control incubations were carried out to ensure that metabolite formation required microsomal enzymes and NADPH. HPLC-MS analysis of microsomal incubations of ARM390 (Figure 2a) revealed the presence of two metabolites, M(-28) and M(+16), indicating possible *N*-desethylation of the amide and oxygen incorporation, respectively. The monodesethylated metabolite M(-28) was identified as ARM827 on the basis of its retention time and mass spectra compared to a standard solution (Figure 1a). For SNC80, microsomal incubations (Figure 2b) showed two main metabolites with *m/z* ratios of 410 (-40) and 436 (-14), indicating possible *N*-deallylation of the piperazine nitrogen and *O*-demethylation of the methoxyphenyl moiety, respectively. The peak areas of both metabolites were clearly higher than that of the parent itself. The M(-40) metabolite was tentatively identified as *N*-deallyl-SNC80 according to its mass spectra, while the (-14) metabolite was identified as SNC86 (*O*-desmethyl-SNC80) on the basis of its retention time and mass spectra compared to a standard solution (Figure 1b). Detailed MS analysis also revealed the presence of significant amounts of M(+34), minor amounts M(+16) (oxidation) and M(-28) (*N*-desethylation) and even a possible secondary metabolite [e.g. M(-40/-14)] (Figure 2). In a preliminary study, a limited number of plasma samples was analyzed by HPLC-MS. All metabolites identified *in vitro* following the incubation of SNC80

in RLM were present in plasma obtained from rats administered with a single dose of SNC80 (i.v. or p.o.) (data not shown). Irrespective of the administration route, SNC86 and, to a lesser extent M(-40), were the major metabolites present in rat plasma. When ARM390 was administered to rats, only the M(-28) metabolite could be found (data not shown). Following the identification of the major metabolites *in vitro* and *in vivo*, all rat plasma samples were analyzed in SIM mode targeting the relevant m/z ratios. ARM827 and SNC86 were quantified in addition to the parent compound.

Pharmacokinetics of SNC80 and ARM390 in rats. Figure 3 displays the mean plasma concentration-time profiles of ARM390 and SNC80 in rats after i.v., and p.o. administration. The resulting pharmacokinetic parameters are summarized in Table I. Compared to SNC80, ARM390 had a higher systemic clearance ($CL = 4.5 \text{ l h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) and a larger volume of distribution ($V_{ss} = 9.1 \text{ l kg}^{-1}$) (Table I). Although the initial decline in plasma concentrations was faster with ARM390, both compounds presented comparable apparent terminal elimination half-lives (~2h) (Figure 3a and 3b). ARM827 and SNC86 were rapidly detected following i.v. administration of their respective parent compound and their concentrations were always lower than those of the parent compound (Figure 3a and 3b). When ARM390 was administered orally, the fraction of the dose that reached the systemic circulation was considerably higher than that of SNC80 (70 % vs. 5%) (Table I). When corrected for the initial dose, the maximal plasma concentrations of ARM390 were 15 times higher than peak levels of SNC80 (Figure 3c and 3d). SNC86 was rapidly detected following the oral administration of SNC80 and its concentrations exceeded those of the parent compound at all time points (Figure 3d). In comparison, ARM827 concentrations never surpassed that of ARM390 (Figure 3c).

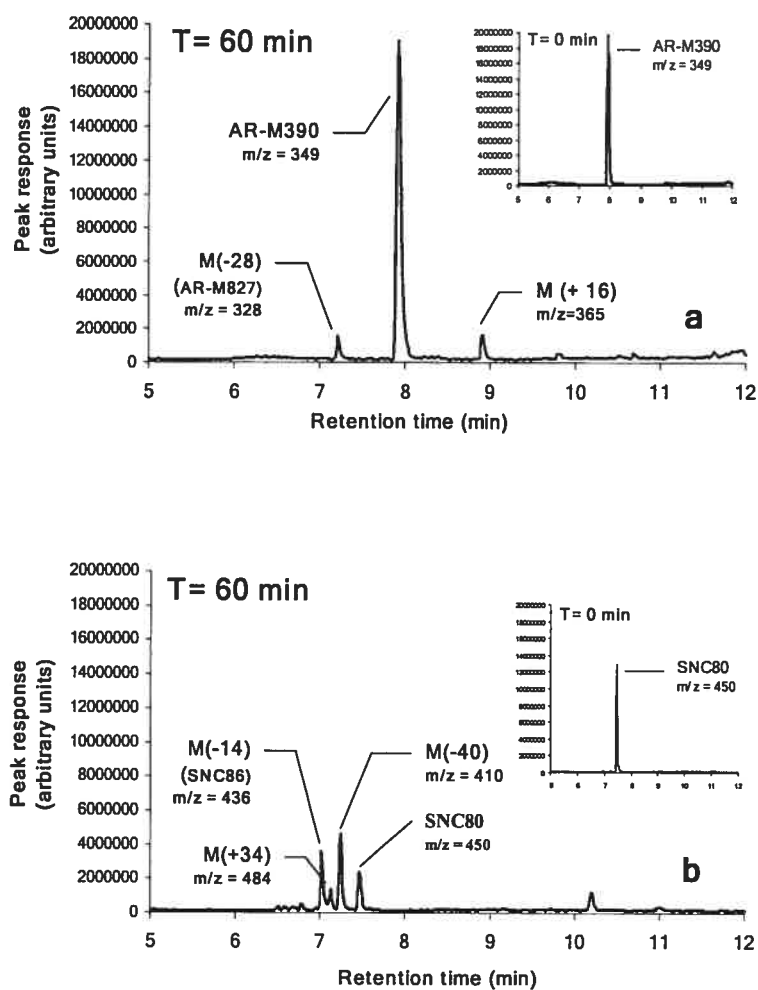


Figure 2. HPLC-MS chromatograms of RLM incubated 60 min in the presence of NADPH and ARM390 (a) or SNC80 (b). Inserts show the compounds incubated without NADPH.

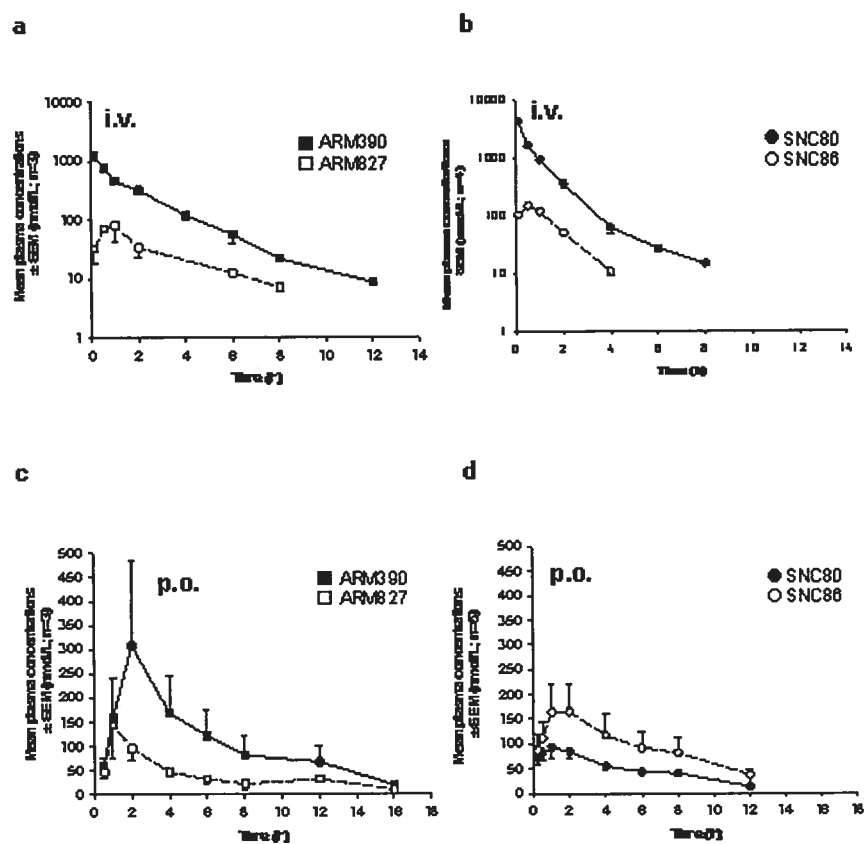


Figure 3. I. Mean plasma concentration-time profiles of ARM390 and ARM827 following an intravenous (10 $\mu\text{mol/kg}$) (a) or oral (10 $\mu\text{mol/kg}$) (c) administration of ARM390 to rats. II. Mean plasma concentration-time profile of SNC80 (●) and SNC86 (○) following an intravenous (10 $\mu\text{mol/kg}$) (b) or oral (50 $\mu\text{mol/kg}$) (d) administration of SNC80 to rats.

Table I. Mean (\pm *s.e.mean*) pharmacokinetic parameters of ARM390 and SNC80 obtained following a intravenous or oral administration to rats

Intravenous	ARM390 (10 μmol/kg) (n=3)	SNC80 (10 μmol/kg)* (n=4)
AUC _{inf,iv} (h nM)	2107 \pm 131	3226 \pm 124*
CL (l h ⁻¹ kg ⁻¹)	4.53 \pm 0.32	3.11 \pm 0.13*
T _{1/2} (h)	1.97 \pm 0.37	2.00 \pm 0.13*
V _{ss} (l kg ⁻¹)	9.10 \pm 1.45	3.54 \pm 0.36*
AUC _{0-4h} (SNC86/SNC80)		0.08
AUC _{0-8h} (ARM827/ARM390)	0.12	
Oral	ARM390 (10 μmol/kg) (n=3)	SNC80 (50 μmol/kg) (n=5)
C _{max} (nM)	302 \pm 96	108 \pm 15*
t _{max} (h)	3.0	1.0*
AUC _{inf,po} (h nM)	1576 \pm 537	650 \pm 291*
AUC _{0-12h} (SNC86/SNC80)		1.8
AUC _{0-16h} (ARM827/ARM390)	0.51	
F (%)	71	4*

* Projean et al., submitted

Binding affinity of ARM827 to μ , δ and κ receptors. Table II presents the binding affinity (IC_{50}) of ARM827 to the δ , μ , and κ -receptors. ARM827 exhibited high affinity for the δ -receptor, with a mean IC_{50} of 14 nM, but rather poor selectivity (selectivity ratios =16 (μ/δ) and 18 (κ/δ)).

Table II. Binding affinities of SNC80, ARM390 and their main metabolite to membranes prepared from HEK-293S cells clones stably expressing δ -, μ -, or κ -receptors

	IC_{50} (nM)			Selectivity ratio	
	δ	μ	κ	μ/δ	κ/δ
ARM827	14 \pm 1	233 \pm 40	261 \pm 41	16	18
SNC80*	1.3 \pm 0.2	320 \pm 58	2480 \pm 378	245	1890
SNC86*	0.23 \pm 0.02	2.1 \pm 0.2	20 \pm 3	9	87
ARM390*	0.87 \pm 0.23	3800 \pm 172	7470 \pm 606	4370	8590

Values represent the mean (\pm s.e.mean) determined from three individual experiments performed in duplicate

**Wei et al.,2000*

Potency and efficacy in the [35 S]GTP γ S binding assay performed with membranes prepared from HEK-293S cells stably expressing the human δ , μ , and κ -receptor. Figure 4 shows the [35 S]GTP γ S binding to HEK-293S cells membrane stably expressing the human δ , μ , and κ -receptor in response to SNC80, SNC86 ARM390 and ARM827. EC_{50} and E_{max} values are presented in Table III. SNC80 and ARM390 were both full agonists at the δ -receptor, and their EC_{50} value was 34 and 150 nM, respectively. Both ligands demonstrated very weak agonism at the μ -receptor ($E_{max} < 10\%$) and did not activate the κ -receptor. When the metabolites were assayed, SNC86 exhibited full agonist properties at the δ and κ -receptors. Its

EC₅₀ values for δ and κ -receptors were in the low (0.26 nM) to medium (68.4 nM) nanomolar range, respectively. This compound was also a partial agonist at the μ -receptor and had an EC₅₀ value averaging 600 nM. In contrast, ARM827 only partially activated the δ -receptor (62 %) and was less potent than the parent compound, with an EC₅₀ value in the micromolar range. In addition, ARM827 was nearly unable to activate the μ -receptor (EC₅₀ = 632 nM and E_{max} = 7 %) and was completely inactive at the κ -receptor.

Potency and efficacy in the [³⁵S]GTP γ S binding assay performed with rat brain membranes in the absence or presence of opioid antagonists. Figure 5 shows the [³⁵S]GTP γ S binding to rat brain membranes in response to SNC80, SNC86, ARM390 and ARM827. In decreasing order of potency (nM), SNC86 (0.33 nM), SNC80 (69 nM) and ARM390 (336 nM) could all efficiently (E_{max} > 80 %) stimulate the [³⁵S]GTP γ S binding to rat brain membranes (Fig 5a, table IV). The only exception was ARM827, which was clearly a partial agonist (E_{max} = 45 %) with low potency (EC₅₀ = 1545 nM). The addition of CTOP had no effect on their activity, except for DAMGO, which had a 96 fold right-shift of its dose response curve (Figure 5b, Table 4). The [³⁵S]GTP γ S binding stimulation by SNC80, ARM390 or ARM827 was completely blocked in the presence of TIPP (Figure 5c, Table IV). TIPP shifted the dose response curve of SNC86 by 2057 folds to the right (EC₅₀ = 679 \pm 32.2 nM), a factor close to that expected from equation 5 (3877 fold; theoretical EC₅₀ = 1278 nM) using a K_i value of 0.129 nM for TIPP.

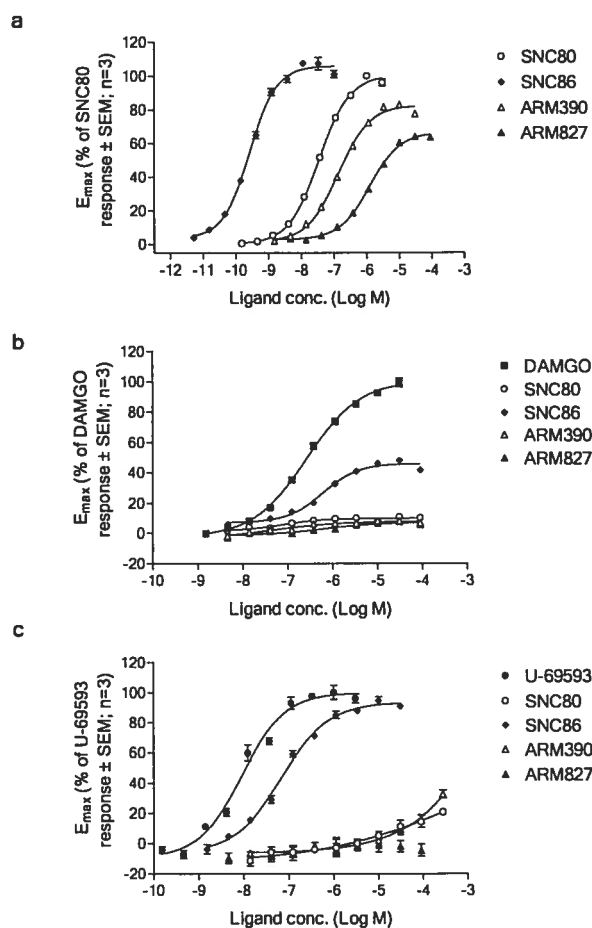


Figure 4. Stimulation of $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding to membranes (human HEK-293S cells stably transfected with δ -, μ -, or κ -receptor) in response to SNC80, SNC86, ARM390 and ARM827. (a) human δ - (SNC80 as reference full agonist), (b) human μ - (DAMGO as reference full agonist), (c) human κ - (U-69593 as reference full agonist).

$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding was performed as described in Material and Methods. Data were normalized to the response of respective reference full agonists. Each value represents the mean \pm s.e.mean of at least three independent experiments performed in duplicate. EC_{50} and E_{max} values are summarized in Table III.

Table III. Efficacies and potencies of SNC80, AR-M390 and their main metabolite in stimulating [³⁵S]GTP_γS binding to membranes prepared from HEK-293S cells clones stably expressing δ-, μ-, or κ-receptors

	δ ^a			μ			κ		
	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>E</i> _{max} (%)	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>E</i> _{max} (%)	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>E</i> _{max} (%)	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>E</i> _{max} (%)	
SNC80*	35 ± 3	100	116 ± 34	10 ± 1	>270000	>20			
SNC86	0.26 ± 0.01	102 ± 4	588 ± 56	45.5 ± 0.4	68 ± 6	94 ± 4			
ARM390	137 ± 17	80 ± 1	98 ± 19	7.4 ± 0.1	>270000	0			
ARM827	1090 ± 84	62 ± 3	632 ± 251	6.9 ± 0.4	>900000	0			
DAMGO*			265 ± 30	100					
U-69593*					9	100			

*SNC80, DAMGO and U-69593 were used as reference full agonists for the δ-, μ- and the κ-receptors, respectively. Data were derived from the curves in Figure 4.

^a[³⁵S]GTP_γS binding were performed with 20 μg of membrane expressing a lower amount of δ receptor (0.633 ± 47 pmol mg⁻¹ protein) than in the binding study.

Values represent the mean (±SEM) determined from three individual experiments performed in duplicate.

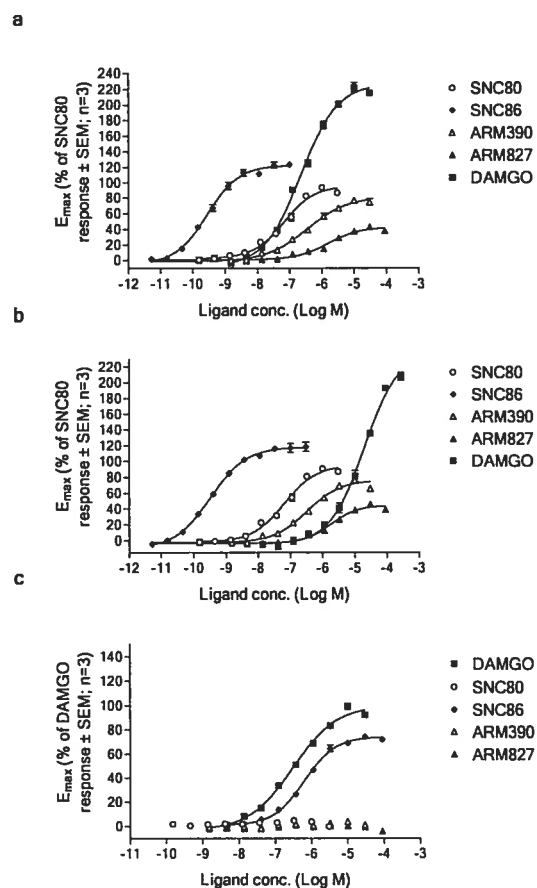


Figure 5. Stimulation of $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding to rat brain membranes in response to SNC80, SNC86, ARM390, ARM827 and DAMGO. (a) in absence of opioid antagonist (SNC80 as reference full agonist), (b) in the presence of 1 μM CTOP (SNC80 as reference full agonist) (c) in the presence of 0.5 μM TIPP (DAMGO as reference full agonist).

$[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding was performed as described in Material and Methods. Data were normalized to the response of the reference full agonists; SNC80 and DAMGO for δ - and μ -receptors, respectively. Each value represents the mean \pm s.e.mean of at least three independent experiments performed in duplicate. EC_{50} and E_{max} values are summarized in Table IV.

Table IV. Efficacies and potencies of SNC80, ARM390 and their main metabolite in stimulating [³⁵S]GTP_γS binding to rat brain membranes (with or without antagonists (CTOP) for the μ- or (TIPP) for the δ- receptor)

	Rat brain		Rat brain + CTOP		Rat brain + TIPP	
	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>E</i> _{max} (%)	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>E</i> _{max} (%)	<i>EC</i> ₅₀ (nM)	<i>E</i> _{max} (%)
SNC80*	69 ± 8	100	67 ± 12	100	> 3000	0
SNC86	0.33 ± 0.02	124 ± 2	0.32 ± 0.01	123 ± 82	679 ± 32	73 ± 1
ARM390	336 ± 38	84 ± 4	349 ± 64	82 ± 5	> 30000	0
ARM827	1545 ± 51	45 ± 2	1832 ± 55	47 ± 4	> 90000	0
DAMGO*	226 ± 13	235.6 ± 0.8	21675 ± 985	251.8 ± 0.7	307 ± 18	100

DAMGO and SNC80 were used as reference full agonists for the μ- and δ-receptors, respectively. Data were derived from the curves in

Figure 5.

Values represent the mean (±SEM) determined from three individual experiments performed in duplicate.

DISCUSSION

In the present study, we compared the *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic profile of ARM390 to that of the classic non-peptidic δ -receptor agonist SNC80. The properties of ARM390 presented herein integrate pharmacological, pharmacokinetic and metabolic information and highlight its potential as an interesting *in vivo* tool for further exploration of δ -receptor-mediated mechanisms and their implication in various disease states.

The development of more selective and orally available ligands represents a major objective in research programs aiming at the synthesis of new non-peptidic δ -receptor agonists (Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2002). ARM390 represents one of the most selective δ -receptor agonists reported to date. This selectivity was confirmed in binding (Wei *et al.* 2000) and functional assays (present study), as ARM390 did not bind nor activate [³⁵S]GTP _{γ} S binding in the cloned human μ and κ -receptors. In addition, the activity of ARM390 in rat brain membranes was independent of μ -receptor activation since the selective μ -antagonist (CTOP) was unable to inhibit its action. In contrast, the pharmacological effect of ARM390 was completely blocked by the addition of a selective δ -receptor antagonist (TIPP), indicating that its action is exclusively mediated via the δ -receptor in rat brain membrane preparations. We observed the same *in vitro* findings with SNC80, in agreement with published data *in vivo* showing that i.c.v. antisense to the δ receptor blocked SNC80-induced antinociception in rats whereas CTOP did not (Fraser *et al.*, 2000b). Considering its pharmacological and structural similarities to SNC80, ARM390 should also maintain good δ selectivity *in vivo* as well as *in vitro*. In addition, because of its 4370 to 8590-fold selectivity toward μ and κ -receptors, its effect should remain specific for the δ -receptor over a wide range of concentrations.

Our [³⁵S]GTP_γS binding results confirmed that ARM390 is an agonist, albeit less potent than SNC80, at the cloned human δ-receptor and in rat brain membranes. The EC₅₀ values obtained in this study were higher than those previously reported (Wei *et al.*, 2000), as cells expressing lower, more physiological levels of δ-receptors were used. The pharmacological characteristics of ARM390 observed with the low expressing clone were comparable to those obtained in rat brain membranes, corroborating its physiological relevance as an assay for δ-receptor activation. The findings of Marie *et al.*, (2003) supported our observation further by showing that ARM390 inhibited forskolin-stimulated cAMP accumulation with comparable potency (EC₅₀ = 111 nM) in a neuroblastoma cell line endogenously expressing the human δ receptor (SK-N-BE).

This study also demonstrated that the improved oral pharmacokinetic properties of ARM390 represent a major advantage over SNC80. The high oral bioavailability of ARM390 in the rat contrasted with the poor oral pharmacokinetic characteristics of SNC80. Since the oral bioavailability of ARM390 was well predicted from *in vitro* data in liver microsomes (~ 70% in both cases), the fraction lost before entering the circulation probably resulted from hepatic first-pass metabolism. A significant first pass effect was substantiated by the fact that the ARM827/ARM390 AUC ratios obtained following p.o. administration were approximately five times greater than those obtained after i.v. injection.

In vivo the total clearance of ARM390 was almost three times higher than the hepatic clearance predicted from microsomal data (4.53 vs 1.22 l h⁻¹ kg⁻¹). Several explanations could account for this discrepancy (Obach *et al.*, 1997): *In vivo*, in the rat, i) ARM390 might also be metabolized through a non-NADPH dependent metabolism, ii) metabolic clearance might not be the primary clearance mechanism (other excretion routes such as biliary or renal could also contribute) and iii) the liver might not be the major clearance organ. Further studies are needed to address this.

Our results reveal that the poor stability of SNC80 in RLM is due to its biotransformation into a multitude of metabolites. In agreement with the findings of Plobeck *et al.* (2000), *O*-desmethyl-SNC80 (SNC86) and *N*-desallyl-SNC80 were the most predominant metabolites, accounting for most of the total microsomal metabolism of the parent compound *in vitro*. These metabolites were also predominant *in vivo* in plasma obtained from rats administered with a single dose of SNC80 (iv or po). The increased metabolic stability of ARM390 compared to that of SNC80 probably arises from its lack of metabolically labile groups such as *O*-methyl and *N*-allyl. In RLM, the major metabolic pathway of ARM390 was *N*-desethylation of the diethylbenzamide, which was only a minor route of metabolism for SNC80.

We showed that SNC86 was a full agonist ($E_{\max} = 124\%$) and was at least 200 times more potent than SNC80 in activating [^{35}S]GTP $_{\gamma}\text{S}$ binding response in rat brain membrane. In addition to having subnanomolar affinity for the δ -receptor, SNC86 or its racemic mixture, (\pm)-BW373U86, display poor selectivity toward the μ - and κ -receptors (Chang *et al.*, 1993; Campa *et al.*, 1996; Plobeck *et al.*, 2000; Bishop *et al.*, 2003). Furthermore, SNC86 partially or fully activated human μ - and κ -receptors. In rat brain membranes, [^{35}S]GTP $_{\gamma}\text{S}$ binding response to SNC86 was strongly shifted to the right following the addition of TIPP or the non-selective opioid antagonist naloxone. CTOP had no effect in displacing [^3H]-SNC86 binding (Campa *et al.*, 1996) or blocking the [^{35}S]GTP $_{\gamma}\text{S}$ binding stimulation of SNC86 (our study) in rat brain membranes suggesting that SNC86 does not activate the μ -receptor in rat brain membranes.

It has been shown that opioid receptors are heterogeneously distributed throughout rat brain regions, which can result in variation in their efficiency of coupling to G-proteins varies across the brain (Mansour *et al.*, 1995; Maher *et al.*, 2000). Therefore, even though SNC86 did not activate the μ receptor in rat brain membrane, we cannot completely exclude the possibility that SNC86 could activate μ

or κ -receptors *in vivo*, where high regional receptor densities are present and where effective coupling to signal transduction pathways occurs. This could explain why (\pm) BW373U86 acted as a partial agonist at both δ and μ -receptor in mice subjected to the acetic acid constriction assay (Wild *et al.*, 1993) and why it was effective as an antinociceptive agent in δ -receptor knockout mice subjected to the radiant tail flick assay (Zhu *et al.*, 1999).

Major circulating metabolites have the capacity to alter the primary pharmacological response of the parent compound, potentiate its secondary pharmacology (side-effects) or complicate pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships (Parkinson, 1996; Baillie *et al.*, 2002). Since we found that SNC86 was more potent and more efficacious than SNC80 in rat brain membranes and because its plasma levels following iv/po administration are significant (\sim 400-fold higher than its EC_{50} in rat brain membrane), it is likely that it contributes to the pharmacological activity of SNC80 *in vivo*. In addition, contributions from other metabolites, such as *N*-desallylSNC80, should not be ruled out as Furness *et al.* (2000) showed that as *N*-desallylSNC80 was binding selectively to the δ -receptor in rat and guinea pig brain membranes with only slightly lower affinity than SNC80. In addition, *N*-desallylSNC80 demonstrated the capacity to stimulate [35 S]GTP $_{\gamma}$ S binding in rat brain membranes, albeit being less efficient than SNC80 (60 % vs 128 % stimulation, respectively) (Furness *et al.*, 2000). Unfortunately, the effect of metabolites is often overlooked in pharmacodynamic or mechanistic studies involving pharmacological "standards" not fully characterized pharmacokinetically.

In contrast, ARM827, the major metabolite of ARM390, does not possess significant pharmacological activity. Without the ethyl substituent, ARM827 has much less binding affinity, selectivity and activity toward the δ receptor than the parent drug. Similar effects were also observed with *N*-desethylated analogues of SNC80 or structurally-related diarylpiperazines (Furness *et al.*, 2000; Plobeck *et al.*,

2000). In addition, ARM827 plasma concentrations never surpassed that of ARM390 following p.o. or i.v. administration to rats, making it very unlikely to interfere with the pharmacological action of the parent compound.

In summary, ARM390 has been identified as a highly selective δ -receptor agonist. The unique selectivity of this δ -receptor agonist and its good oral bioavailability represent major improvements over SNC80. One should exercise caution when using SNC80 as a pharmacological tool *in vivo*, as it releases pharmacologically active metabolite(s) that can contribute to its pharmacological activity. In contrast, the contribution of metabolites is very unlikely to be problematic with ARM390 as its main metabolite (ARM827) presented poor *in vitro* activity and low levels in plasma.

ACKNOWLEDGEMENTS

AstraZeneca R&D Montreal is acknowledged for studentship assistance to Denis Projean. The authors would like to thank the department of Chemistry at AstraZeneca R&D Montréal for synthesizing ARM390, Paul Jones for preparing ARM827 and the bis-hydrochloride salt of SNC80, Stéphane St-Onge for the binding studies of ARM827, Joanne Butterworth for clonal selection and Mélanie Duchesne for membrane preparations. We are thankful to Heli Parenteau and Hélène Maurice for their excellent technical assistance in the rat PK studies. We wish to thank Dr. Kenner C. Rice (NIH) for providing SNC86.

REFERENCES

BAILLIE, T.A., CAYEN, M.N., FOU DA, H., GERSON, R.J., GREEN, J.D., GROSSMAN, S.J., KLUNK, L.J., LEBLANC, B., PERKINS, D.G. & SHIPLEY, L.A. (2002). Drug metabolites in safety testing. *Toxicol.Appl.Pharmacol*, **182**, 188-196.

BILSKY, E.J., CALDERON, S.N., WANG, T., BERNSTEIN, R.N., DAVIS, P., HRUBY, V.J., MCNUTT, R.W., ROTHMAN, R.B., RICE, K.C. & PORRECA, F. (1995). SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **273**, 359-366.

BISHOP, M.J., GARRIDO, D.M., BOSWELL, G.E., COLLINS, M.A., HARRIS, P.A., MCNUTT, R.W., O'NEILL, S.J., WEI, K. & CHANG, K.J. (2003). 3-(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-hydroxybenzyl)-N-alkyl-N-arylbenzamides: potent, non-peptidic agonists of both the micro and delta opioid receptors. *J.Med.Chem.*, **46**, 623-633.

BOVILL, J.G. (1997). Mechanisms of actions of opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur.J.Anaesthesiol.Suppl*, **15**, 9-15.

BRANDT, M.R., FURNESS, M.S., MELLO, N.K., RICE, K.C. & NEGUS, S.S. (2001). Antinociceptive effects of delta-opioid agonists in Rhesus monkeys: effects on chemically induced thermal hypersensitivity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **296**, 939-946.

BROOM, D.C., NITSCHKE, J.F., PINTAR, J.E., RICE, K.C., WOODS, J.H. & TRAYNOR, J.R. (2002). Comparison of receptor mechanisms and efficacy

requirements for delta-agonist-induced convulsive activity and antinociception in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **303**, 723-729.

CAHILL, C.M., MORINVILLE, A., HOFFERT, C., O'DONNELL, D. & BEAUDET, A. (2003). Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain*, **101**, 199-208.

CAMPA, M.J., MCNUTT, R.W., HILL, J.A., PATZ, E.F. & CHANG, K.J. (1996). Binding of [3H](+)-BW373U86 to delta-opioid receptors in rat brain membranes. *Eur.J.Pharmacol.*, **310**, 263-267.

CHANG, K.J., RIGDON, G.C., HOWARD, J.L. & MCNUTT, R.W. (1993). A novel, potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonist BW373U86. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **267**, 852-857.

CHIN, G.J., PAYZA, K., PRICE, D.A., GREENBERG, M.J. & DOBLE, K.E. (1994). Characterization and solubilization of the FMRFamide receptor of squid. *Biol.Bull.*, **187**, 185-199.

DELP, M.D., EVANS, M.V. & DUAN, C. (1998). Effects of aging on cardiac output, regional blood flow, and body composition in Fischer-344 rats. *J.Appl.Physiol.*, **85**, 1813-1822.

FRASER, G.L., GAUDREAU, G.A., CLARKE, P.B., MENARD, D.P. & PERKINS, M.N. (2000a). Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br.J.Pharmacol.*, **129**, 1668-1672.

FRASER, G.L., LABARRE, M., GODBOUT, C., BUTTERWORTH, J., CLARKE, P.B., PAYZA, K. & SCHMIDT, R. (1999). Characterization of [¹²⁵I]AR-M100613, a high-affinity radioligand for delta opioid receptors. *Peptides*, **20**, 1327-1335.

FRASER, G.L., PRADHAN, A.A., CLARKE, P.B. & WAHLESTEDT, C. (2000b). Supraspinal antinociceptive response to [D-Pen(2,5)]-enkephalin (DPDPE) is pharmacologically distinct from that to other delta-agonists in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **295**, 1135-1141.

FURNESS, M.S., ZHANG, X., COOP, A., JACOBSON, A.E., ROTHMAN, R.B., DERSCH, C.M., XU, H., PORRECA, F. & RICE, K.C. (2000). Probes for narcotic receptor-mediated phenomena. 27. Synthesis and pharmacological evaluation of selective delta-opioid receptor agonists from 4-[(alphaR)-alpha-(2S,5R)-4-substituted-2, 5-dimethyl-1-piperazinyl-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamides and their enantiomers. *J.Med.Chem.*, **43**, 3193-3196.

GAVERIAUX-RUFF, C. & KIEFFER, B.L. (2002). Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides*, **36**, 62-71.

GIBALDI, M, AND PERRIER, D. (1982) Noncompartmental analysis based on statistical moment, pharmacokinetics, (Gibaldi M and Perrier D eds) Marcel-Dekker, New York.

HOUSTON, J.B. & CARLILE, D.J. (1997). Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes, and liver slices. *Drug Metab Rev.*, **29**, 891-922.

Kenakin T. (1993). Competitive antagonism. In *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. ed. Terry Kenakin. pp. 278-322. New-York: Raven-Press, Ltd.

KIEFFER, B.L. & GAVERIAUX-RUFF, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog.Neurobiol.*, **66**, 285-306.

MAHER, C.E., SELLEY, D.E. & CHILDERS, S.R. (2000). Relationship of mu opioid receptor binding to activation of G-proteins in specific rat brain regions. *Biochem.Pharmacol*, **59**, 1395-1401.

MANSOUR, A., FOX, C.A., AKIL, H. & WATSON, S.J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.*, **18**, 22-29.

MARIE, N., LANDEMORE, G., DEBOUT, C., JAUZAC, P. & ALLOUCHE, S. (2003). Pharmacological characterization of AR-M1000390 at human delta opioid receptors. *Life Sci.*, **73**, 1691-1704.

NEGUS, S.S., GATCH, M.B., MELLO, N.K., ZHANG, X. & RICE, K. (1998). Behavioral effects of the delta-selective opioid agonist SNC80 and related compounds in rhesus monkeys. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **286**, 362-375.

OBACH, R.S., BAXTER, J.G., LISTON, T.E., SILBER, B.M., JONES, B.C., MACINTYRE, F., RANCE, D.J. & WASTALL, P. (1997). The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **283**, 46-58.

PARKINSON, A. (1996). Biotransformation of xenobiotics, In *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic of Science of Poisons*. ed. Klaassen C.D. pp. 113-186. New-York: Mc-Graw-Hill.

PLOBECK, N., DELORME, D., WEI, Z.Y., YANG, H., ZHOU, F., SCHWARZ, P., GAWELL, L., GAGNON, H., PELCMAN, B., SCHMIDT, R., YUE, S.Y., WALPOLE, C., BROWN, W., ZHOU, E., LABARRE, M., PAYZA, K., ST ONGE, S., KAMASSAH, A., MORIN, P.E., PROJEAN, D., DUCHARME, J. & ROBERTS, E. (2000). New diarylmethylpiperazines as potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonists with increased In vitro metabolic stability. *J.Med.Chem.*, **43**, 3878-3894.

PAYZA, K. (in press) Binding and Activity of Opioid Ligands at the Cloned Human Delta, Mu, and Kappa Receptors, In *The Delta Receptor, Ligands, Pharmacology, and Physiology* (Chapter 16). Ed.Chang *et al.* pp.4031-9. New York: Marcel Dekker, Pub.

QUOCK, R.M., BURKEY, T.H., VARGA, E., HOSOHATA, Y., HOSOHATA, K., COWELL, S.M., SLATE, C.A., EHLERT, F.J., ROESKE, W.R. & YAMAMURA, H.I. (1999). The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol.Rev.*, **51**, 503-532.

STEIN, C., MACHELSKA, H., BINDER, W. & SCHAFER, M. (2001). Peripheral opioid analgesia. *Curr.Opin.Pharmacol.*, **1**, 62-65.

WEI, Z.Y., BROWN, W., TAKASAKI, B., PLOBECK, N., DELORME, D., ZHOU, F., YANG, H., JONES, P., GAWELL, L., GAGNON, H., SCHMIDT, R., YUE, S.Y., WALPOLE, C., PAYZA, K., ST ONGE, S., LABARRE, M., GODBOUT, C., JAKOB, A., BUTTERWORTH, J., KAMASSAH, A., MORIN, P.E., PROJEAN, D., DUCHARME, J. & ROBERTS, E. (2000). N,N-Diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidenemethyl)benzamide: a novel, exceptionally selective, potent delta opioid receptor agonist with oral bioavailability and its analogues. *J.Med.Chem.*, **43**, 3895-3905.

WILD K.D., MCCORMICK J., BILSKY E.J., VANDERAH T., MCNUTT R.W.,
CHANG K.J. AND PORRECA F. (1993). Antinociceptive actions of BW373U86 in
the mouse. *J Pharmacol Exp Ther.*; **267**: 858-865.

ZHU, Y., KING, M.A., SCHULLER, A.G., NITSCHKE, J.F., REIDL, M., ELDE,
R.P., UNTERWALD, E., PASTERNAK, G.W. & PINTAR, J.E. (1999). Retention of
supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid
receptor knockout mice. *Neuron*, **24**, 243-252.

CHAPITRE VI

Discussion générale et Conclusion

DISCUSSION GÉNÉRALE

PARTIE I: APPROCHES *IN VITRO* PERMETTANT L'IDENTIFICATION DES CYPS IMPLIQUÉS DANS LA N-DÉMÉTHYLATION DE LA MORPHINE CHEZ L'HOMME

1.1. DÉTERMINATION QUANTITATIVE DE LA MORPHINE ET DE SES MÉTABOLITES DANS LE PLASMA DE RAT PAR HPLC-MS

Les études de métabolisme ou de phénotypage demandent la mise au point de méthodes analytiques fiables permettant de séparer, d'identifier et de quantifier les composés d'intérêt et leurs métabolites. Un des objectifs de cette thèse était donc la mise au point d'une méthode analytique pouvant nous permettre de mesurer la morphine et certains de ses métabolites dans divers milieux biologiques. Puisque la morphine est souvent utilisée à titre de produit de référence dans les programmes de recherche visant au développement de nouveaux analgésiques, il était aussi d'intérêt de mesurer précisément et rapidement ses concentrations et celles de ses métabolites dans le plasma de rat.

Plusieurs méthodes analytiques visant à quantifier la morphine et ses métabolites dans les fluides biologiques ont été publiées (Milnes et coll., 1996). Les premières approches par immuno-essais, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (MS) ou par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (UV, fluorescence, électrochimie) souffrent toutes d'inconvénients qui limitent leur utilisation. Alors que certaines présentent une sélectivité et/ou une sensibilité insuffisante (HPLC-UV), d'autres ont le désavantage d'utiliser plus d'une méthode de détection (HPLC-électrochimie+UV), ce qui augmente le travail et la consommation d'échantillons de façon considérable. De plus, la plupart des méthodes de type HPLC (UV, fluorescence, électrochimie) demandent des temps d'analyse

assez longs et des phases mobiles très complexes afin de permettre une séparation adéquate. Ces méthodes n'étaient donc pas compatibles avec l'analyse rapide de multiples échantillons et/ou d'échantillons de faibles volumes que nous recherchions.

La MS représente probablement la méthode de détection de choix pour un dosage précis et sensible des petites molécules organiques. La HPLC-MS/MS avec interface de type « electrospray » offre une sensibilité et une sélectivité accrue et d'autre part, elle nécessite habituellement peu de travail d'optimisation des conditions chromatographiques. Ceci s'explique principalement par le fait que les masses ou les ions de transition spécifiques peuvent être mesurés de façon sélective. Ceci n'est cependant pas le cas pour le dosage de la morphine et de ses deux métabolites glucuroconjugués (M3G, M6G) puisque ces derniers possèdent un rapport masse sur charge identique et les mêmes ions de transition. De plus, l'ion de transition des deux glucuroconjugués correspond à l'ion quasi-moléculaire de la molécule mère, compliquant davantage la détection par MS. En conséquence, la séparation chromatographique de la morphine et de ses métabolites glucuroconjugués demeure une étape essentielle en dépit de la grande sélectivité de la détection par MS.

Notre méthode HPLC-MS offre une séparation chromatographique efficace de la morphine et de ses métabolites sur une période temps relativement courte. La résolution et la spécificité combinées de la chromatographie et de la MS offrent un maximum de sensibilité tout en utilisant seulement un quadripôle. En effet, la sensibilité de notre méthode analytique (limite de quantification 2,44 à 4,88 nM) est meilleure ou comparable à celle rapportée par d'autres méthodes HPLC-MS ou HPLC-MS/MS obtenues sur triple quadripôle.

En HPLC-MS ou MS/MS, la préparation des échantillons (extraction liquide-liquide ou solide-liquide) contenant la morphine et ses métabolites est souvent une étape limitante en raison des caractéristiques physicochimiques très différentes de ces molécules. De bons rendements d'extraction sont souvent difficiles à obtenir et les

permutations de colonnes et/ou solvants demandent des étapes de validation supplémentaires. Grâce à la méthode développée dans notre laboratoire, les échantillons peuvent être injectés directement dans le système de HPLC-MS après une simple précipitation des protéines, évaporation et reconstitution dans la phase mobile. Les recouvrements obtenus avec cette méthode (> 70 % pour tous les analytes) sont comparables ou supérieurs à ceux obtenus avec des méthodes analytiques utilisant des extractions liquide-liquide ou des colonnes d'extraction qui sont coûteuses et plus longues à réaliser. De plus, les volumes d'échantillons utilisés sont beaucoup plus faibles, ce qui en fait une méthode idéale pour des études pharmacocinétiques chez les rongeurs. Elle nous permet de quantifier les analytes sur une gamme importante de concentrations et ce, sans effet mémoire, ce qui évite donc la dilution préalable d'échantillons. Ainsi, la nouvelle méthode analytique développée au cours de mes travaux de doctorat peut donc être considérée comme un apport technologique important. Grâce à cette méthode, il nous a été possible de mesurer la morphine et ses métabolites dans le plasma de rat et dans les incubations *in vitro*.

1.2. IDENTIFICATION DES CYPs RESPONSABLES DE LA N-DÉMÉTHYLATION DE LA MORPHINE DANS LES MICROSOMES DE FOIE HUMAIN

Que ce soit pour prédire la clairance *in vivo* d'un médicament ou évaluer la contribution de certains CYPs à une voie enzymatique donnée, la caractérisation du métabolisme dans les microsomes de foie humain est une étape nécessaire au développement de nouvelles entités chimiques (Masimirembwa et coll., 2001 ; Bjornsson et coll., 2003 ; Roberts, 2003). Grâce à ces approches, le chercheur élimine les entités chimiques ayant un profil métabolique ou pharmacocinétique défavorable et essaie d'anticiper d'éventuelles interactions médicamenteuses. De façon générale, il valide ses expériences et les méthodes qu'il emploie à l'aide de molécules dont les propriétés pharmacocinétiques sont déjà connues chez l'homme. Grâce à ces études,

le chercheur s'assure que les méthodes utilisées sont suffisamment adéquates pour être employées avec des composés dont la pharmacocinétique est encore inconnue.

Le but principal de notre étude était l'identification et la caractérisation des CYPs hépatiques impliqués dans la *N*-déméthylation de la morphine chez l'homme à l'aide de différentes approches *in vitro* utilisant des microsomes de foie humain et des microsomes de cellules d'insecte exprimant des CYPs humains recombinants. Nous avons aussi évalué si ces approches *in vitro* étaient valables à titre prédictif, même pour une voie enzymatique mineure.

Nos études de cinétique enzymatique montrent qu'en conditions initiales, la(les) enzyme(s) qui métabolise(nt) la morphine en normorphine a(ont) une très faible affinité pour leur substrat (K_m apparent = 12,4 mM). À partir de la clairance intrinsèque obtenue *in vitro*, nous avons prédit une clairance partielle de *N*-déméthylation de $0,08 \pm 0,01$ ml/min/kg, ce qui correspondrait à moins de 0,4 % de la clairance totale de la morphine. Ces résultats sont en accord avec les données *in vivo* puisque la *N*-déméthylation de la morphine semble représenter moins de 1 % de sa clairance totale (Zhou et coll., 1993). Ceci suggère donc que l'utilisation de systèmes *in vitro* aussi simples que des microsomes de foie combinés à des modèles de prédiction offrent une représentation assez précise du métabolisme oxydatif de la morphine *in vivo*.

Une des étapes les plus importantes lors de la mise en place d'études de phénotypage *in vitro* est l'estimation de concentrations *in vitro* qui seront cliniquement pertinentes. Lorsque le K_m d'une enzyme est très élevé, il est recommandé de faire les expériences à des concentrations se rapprochant le plus possible des concentrations hépatiques (Bjornsson et coll., 2003). Ces concentrations hépatiques peuvent être estimées en multipliant les concentrations plasmatiques par un ratio foie-sang obtenu à partir d'études de distribution chez l'animal ou après une autopsie chez l'homme. Bien que les concentrations plasmatiques de morphine dépassent rarement 1 μ M chez

les sujets traités de façon chronique (Faura et coll., 1996), des études de distribution effectuées chez des animaux ayant reçu une ou plusieurs doses de morphine montrent que cette dernière se concentre dans les tissus bien vascularisés. Chez l'homme, des analyses post-mortem suggèrent que les concentrations de morphine sont quatre fois plus élevées dans le foie que dans le sang (Felby et coll. 1974). De plus, les concentrations hépatiques pourraient être encore plus élevées peu de temps après l'administration de morphine par voie orale car cette dernière est rapidement et complètement absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal et subit un effet de premier passage métabolique important. Des concentrations hépatiques de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} M étaient donc appropriées pour étudier le métabolisme *in vitro* de la morphine.

L'identification des CYPs impliqués dans le métabolisme d'une entité chimique est accomplie en utilisant une combinaison de trois approches de base. Elles ne peuvent être utilisées seules pour identifier les CYPs impliqués puisqu'elles ne représentent qu'un élément de la solution.

La première approche consiste à déterminer, à l'aide de systèmes hétérologues, les CYPs humains ayant la capacité de catalyser la réaction d'intérêt. Les systèmes tels que les cellules d'insecte exprimant un seul isoforme enzymatique ont l'avantage de permettre à l'expérimentateur de déterminer avec un haut degré de certitude si un CYP est capable de catalyser une réaction métabolique donnée. Nous avons pu de cette façon identifier que le CYP3A4 et le CYP2C8 catalysent efficacement la *N*-déméthylation de la morphine.

Une deuxième approche demande l'évaluation de la réaction métabolique d'intérêt en présence ou en absence d'inhibiteurs chimiques sélectifs pour un isoforme particulier et/ou d'anticorps immunoinhibiteurs spécifiques. Dans ce genre d'études, les inhibiteurs chimiques doivent être utilisés à des concentrations assurant une sélectivité et une efficacité d'inhibition adéquate. Ces dernières conditions dépendent

essentiellement du mécanisme d'inhibition de l'inhibiteur (réversible vs. irréversible). Par exemple, l'inhibition par un inhibiteur chimique irréversible (ex : troléandomycine) est essentiellement indépendante de la concentration en substrat. En revanche, les inhibiteurs réversibles compétitifs ou mixtes (ex : quercétine) dépendront des concentrations en substrat seulement si ce dernier est incubé à des concentrations supérieures à son K_m (Rodrigues, 1999). Il n'y a pas de restriction quant aux méthodes d'inhibition employées car l'important est de couvrir une gamme importante de CYPs. Grâce à l'utilisation judicieuse d'inhibiteurs chimiques spécifiques (dont la quercétine et la troléandomycine), nous avons pu confirmer le rôle des CYP3As et du CYP2C8 dans la formation de normorphine à partir de la morphine.

La troisième approche s'attache à corréler la vitesse de réaction de la voie métabolique d'intérêt avec l'activité d'un marqueur spécifique des CYPs à partir d'un panel de microsomes de foies provenant de différents donneurs et caractérisés pour leur niveau d'activité en CYPs. Il est recommandé d'utiliser des microsomes provenant d'au moins dix donneurs différents et possédant un minimum de co-variables qui pourraient fausser les résultats (faux positifs). Ces dernières peuvent avoir de multiples causes allant de la co-régulation (associée ou non à des facteurs environnementaux) au hasard. Heureusement, le panel utilisé dans notre étude ne montrait aucune co-variable pouvant avoir un impact significatif sur les résultats obtenus. La qualité de notre panel de microsomes de foie nous a permis de mettre en évidence la contribution des CYP3As et du CYP2C8 sans aucune ambiguïté. Les études de corrélation souffrent tout de même de certaines faiblesses justifiant l'utilisation d'approches complémentaires, à savoir un manque de sélectivité envers certains substrats (ex : substrats CYP3A4/CYP3A5) ou l'incapacité d'identifier quantitativement la contribution de plus d'un CYP.

Grâce aux recombinants, il est possible d'identifier les enzymes possédant une haute affinité (faible K_m) ou celles possédant une haute capacité (V_{max} élevé) pour le

substrat étudié. Par exemple, nous avons montré que le CYP2C8 était un système à plus haute affinité que le CYP3A4 pour la *N*-déméthylation. Le fait que la présence de deux systèmes enzymatiques n'ait jamais été détectée dans les microsomes de foie humain pourrait s'expliquer par l'implication d'une combinaison d'enzymes ayant un comportement cinétique similaire ou par l'importance prépondérante d'un CYP sur un autre pour une réaction particulière.

À la différence des préparations microsomales qui contiennent tous les CYPs dans leurs proportions réelles, les systèmes recombinants ne peuvent déterminer à eux seuls si une voie enzymatique donnée apporte une contribution quantitativement prépondérante au métabolisme global (CL_{int}) d'une même réaction enzymatique. D'autres méthodes sont donc nécessaires afin d'établir le lien entre ces systèmes et les microsomes de foie humain. Parmi les approches utilisées pour évaluer la contribution d'un CYP donné à une voie enzymatique donnée, il est possible de corriger la clairance intrinsèque obtenue dans les systèmes hétérorologiques en fonction de l'abondance relative des CYPs individuels (mesurés par immunoquantification; cf. chapitre I) dans les microsomes d'un foie humain dit « moyen » (Rodrigues et al., 1999). Bien qu'elle apparaisse simple et facile à appliquer, cette approche est très dépendante de la technique d'immunodétection utilisée (disponibilité et spécificité des anticorps, détection d'enzyme inactive, etc.) et des systèmes d'expression choisis pour préparer les microsomes de CYPs recombinants (concentrations non physiologiques des CYPs et de leurs protéines accessoires). Dans notre cas, les niveaux de CYP3A4 et de CYP2C8 hépatiques obtenus de la littérature étaient tellement variables que les contributions pouvaient changer du simple au double selon les valeurs choisies. Devant une telle situation, l'utilisation de l'approche des "relative activity factor" (RAF) est recommandée. Celle-ci est basée sur l'hypothèse que tout effet observé sur la vitesse de formation d'un métabolite est indépendant du substrat, et que tout facteur pouvant affecter le taux de métabolisme d'un substrat donné affectera également d'autres substrats. Elle est une excellente alternative à l'approche de correction à partir de l'abondance relative en CYPs dans un foie moyen

car elle a l'avantage de tenir compte des différences entre les systèmes recombinants et les microsomes de foie humain. Grâce à l'approche des RAF, nous avons pu estimer la contribution du CYP3A4 à 60 % et celle du CYP2C8 à 30 % dans les microsomes de foie humains.

Toutes nos observations tentent donc à confirmer la participation du CYP3A4 et du CYP2C8 dans la *N*-déméthylation de la morphine dans les microsomes de foie humains. Il est reconnu que les CYP3As ont la possibilité de participer au métabolisme secondaire de plusieurs molécules. Les CYP3As humains, en particulier le CYP3A4, présentent peu de restrictions quant à la structure de leur substrat (en fait, la seule condition semble qu'ils soient lipophiles). De plus, le CYP3A4 est l'isoforme la plus abondante du foie humain et le site actif des CYP3As serait large et très permissif, permettant ainsi l'accueil d'une ou plusieurs molécules à la fois. Nos résultats sont en accord avec certaines données cliniques puisqu'une augmentation des concentrations urinaires de normorphine est observée lorsque la morphine est administrée par voie orale à des volontaires sains pré-traités avec de la rifampine, un ligand du PXR et un inducteur bien connu des CYP3As. Le rôle du CYP2C8 dans le métabolisme des médicaments et des endobiotiques revêt un intérêt particulier puisque sa contribution a longtemps été sous-estimée. D'ailleurs, la morphine n'a jamais été mentionnée dans des interactions médicamenteuses impliquant des substrats du CYP2C8. Ceci n'est pas étonnant puisque le CYP2C8 serait tenu à jouer un rôle mineur si une quelconque interaction se présentait, en raison de la contribution majoritaire du CYP3A4 et des proportions relativement faibles en CYP2C8 au niveau du foie humain. Cependant, nos observations *in vitro* confirment un certain degré de chevauchement entre les substrats du CYP2C8 et ceux du CYP3A4. En effet, la contribution partielle du CYP2C8 au métabolisme de substrats principalement métabolisés par CYP3A4 a été observée avec des médicaments tels que la carbamazépine, la zopiclone et le vérapamil (Kerr *et al.* 1994, Becquemont *et al.* 1998, Tracy *et al.* 1999). À la lumière des données obtenues lors de notre étude, nous pouvons émettre l'hypothèse que le CYP2C8 pourrait contribuer, quoique

faiblement, à la *N*-déalkylation d'autres opioïdes substrats du CYP3A4, tels que la dihydrocodéine et la codéine.

PARTIE II: INFLUENCE DE L'INFLAMMATION SUR LE MÉTABOLISME CATALYSÉ PAR LES CYPs CHEZ LE RAT ET IMPLICATIONS SUR LA PHARMACOCINÉTIQUE D'AGONISTES δ

Les résultats des travaux effectués dans la partie I montrent qu'il est possible d'identifier avec précision les CYPs impliqués dans le métabolisme d'une entité chimique donnée. Ils révèlent aussi l'utilité de la HPLC-MS comme outil analytique sensible et performant et supportent l'utilisation des microsomes dans la prédiction de paramètres pharmacocinétiques *in vivo*. En raison de l'importance majeure des CYPs dans le métabolisme et la pharmacocinétique des médicaments et grâce à la disponibilité de sondes métaboliques fiables, le phénotypage de microsomes de foie représente une approche intéressante nous permettant de vérifier l'effet de certaines conditions physiopathologiques sur l'activité des CYPs, comme l'inflammation.

2.1. RÉPRESSION DU CONTENU ET DE L'ACTIVITÉ DES CYPs DANS UN MODÈLE D'INFLAMMATION INDUITE PAR L'ADMINISTRATION D'ADJUVANT COMPLET DE FREUND (ACF)

En raison de la stabilité du stimulus généré et de son utilité dans la caractérisation pharmacodynamique de nombreux analgésiques, la douleur induite par administration d'ACF représente l'un des modèles de douleur les plus utilisés en recherche préclinique. En favorisant la libération de médiateurs inflammatoires endogènes, les stimuli inflammatoires ont cependant la capacité de créer des altérations autant au niveau physiologique que biochimique, altérations qui peuvent provoquer à leur tour des changements au niveau de l'activité et de l'expression de plusieurs enzymes de biotransformation.

Les enzymes qui catalysent les réactions de biotransformation déterminent souvent l'intensité et la durée d'action des médicaments. Elles jouent aussi un rôle clé dans la toxicité et le pouvoir carcinogène d'une multitude d'entités chimiques. Puisque la

régulation des enzymes de biotransformation est sous le contrôle de facteurs génétiques, environnementaux, hormonaux ou physiopathologiques, ces derniers auront le potentiel d'affecter de façon favorable ou défavorable les effets thérapeutiques ou toxiques des xénobiotiques. L'hypothèse des travaux présentés au Chapitre III de cette thèse était que l'ACF utilisé pour provoquer un état d'hyperalgésie inflammatoire chez le rat pouvait entraîner une chute du contenu et de l'activité des CYPs hépatiques et que ces modifications seraient liées à l'intensité de la réaction engendrée par la présence de médiateurs inflammatoires.

En accord avec notre hypothèse, nous avons montré que l'administration d'ACF entraîne une répression de l'expression hépatique des CYPs dans les premiers jours suivant son injection à des rats. La diminution du contenu total en CYPs hépatiques observée avec notre modèle (30-45 % de diminution, 2 ou 3 jours post-ACF) est modeste en comparaison de celle obtenue chez des rats souffrant d'arthrite induite par l'administration d'ACF (85 % de diminution, 14 jours post-FCA) mais comparable à celle présente dans les 24 à 48 heures suivant l'administration de térébenthine à des rats (un modèle d'inflammation locale aiguë) (Morgan, 1989). En utilisant les niveaux plasmatiques de NOx et d'AGP comme biomarqueurs de l'inflammation, nous avons été en mesure de déterminer que le contenu en CYPs hépatiques était négativement corrélé à l'intensité de l'inflammation. De façon générale, nos résultats suggèrent que plus la sévérité de l'inflammation engendrée par l'ACF sera grande, plus la diminution du contenu total en CYPs sera importante.

Notre étude montre également que l'inflammation engendrée par l'administration d'ACF a un effet sélectif sur l'expression de certains CYPs dans le foie de rat. Par rapport aux animaux non-traités, les niveaux hépatiques de CYP2E1 et de CYP3A2 demeurent inchangés chez les rats traités avec une dose unique d'ACF. En revanche, le contenu en CYP2B et CYP2C11 est diminué de façon importante. Puisque le CYP2C11 est le principal CYP exprimé de façon constitutive dans le foie de rat mâle (Morgan, 1989; Nedelcheva et Gut, 1994), la diminution observée au niveau du

contenu en total en CYPs dans le foie de rats ayant reçu une dose unique d'ACF est susceptible d'être le résultat de la chute du contenu hépatique en CYP2C11. En accord avec nos résultats, le contenu hépatique en CYP2C11 est sévèrement diminué 24 à 48 heures après injection de térébenthine à des rats (Morgan, 1989). Malheureusement, aucun autre isoforme n'avait été phénotypé dans cette étude. Chez les rats soumis à une stimulation des macrophages péritonéaux par des particules irritantes comme la cérite ou le BaSO₄ (un modèle d'inflammation locale aiguë), l'expression du CYP2C11 hépatique (ARN_m et protéine) est profondément réprimée, tandis que celle du CYP2E1 et du CYP3A2 reste inchangée (Sewer et coll., 1997). Le CYP2C11 et le CYP2B1/2 (expressions d'ARN_m/protéine), mais également le CYP3A2, sont diminués de façon importante dans les microsomes de foie de rats traités avec du LPS (un modèle d'inflammation systémique) (Morgan, 1989; Khatsenko et Kikkawa, 1997; Sewer et coll., 1997). À la lumière de ces observations, notre modèle de douleur inflammatoire s'approche probablement beaucoup plus des modèles d'inflammation locale aiguë que d'un modèle d'inflammation chronique comme l'arthrite induite par l'ACF ou d'inflammation systémique comme l'endotoxémie engendrée par administration de LPS.

L'inflammation engendre non seulement des changements sélectifs au niveau du contenu en protéines, mais aussi au niveau de l'activité enzymatique. En accord avec les résultats observés au niveau des contenus protéiques en CYP3A2 et en CYP2C11, les vitesses de formation de la 2 α et de la 16 α -hydroxy-testostérone (activités spécifiques du CYP2C11) sont sévèrement diminuées chez les rats traités avec de l'ACF alors que l'activité spécifique des CYP3As demeure inchangée (6- β hydroxylation de la testostérone).

Bien qu'aucune modification significative des niveaux hépatiques de CYP2E1 n'ait été observée après administration d'ACF, l'hydroxylation du *p*-nitrophénol (CYP2E1) apparaît sensiblement diminuée. D'un point de vue mécanistique, la discordance entre le contenu en CYP2E1 et le changement d'activité de la *p*-nitrophénol hydroxylase est

très intéressante. Cette observation suggère que l'inflammation induite par l'administration d'ACF déclencherait des mécanismes qui affecteraient l'activité des protéines sans en changer leur contenu. En accord avec cette proposition, quelques CYPs sont inactivés de façon posttraductionnelle (sans aucune diminution de leur contenu par phosphorylation) via des protéines kinases dépendantes de l'AMPc (Oesch-Bartlomowicz et coll., 2003). Selon des études récentes, la phosphorylation se produirait au niveau de résidus sérine présents chez plusieurs membres de la famille CYP2, particulièrement les CYP2Bs et le CYP2E1. Ce dernier processus n'est pas accompagné d'une dégradation de la protéine mais fait plutôt place à un processus de stabilisation (Oesch-Bartlomowicz et coll., 2003).

Il est reconnu que les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α sont impliquées dans l'induction du iNOS et la synthèse de PPA's comme l'AGP. Puisque la diminution du contenu en CYPs engendrée par l'administration d'ACF est accompagnée d'une augmentation de la production de NO, nous avons caractérisé le profil de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF- α dans le plasma obtenu à partir de rats témoins et de rats traités avec de l'ACF. En aucun cas, les niveaux plasmatiques d'IL-1 β ou de TNF- α ne se sont révélés différents entre les rats traités avec l'ACF et les rats témoins. En revanche, les concentrations d'IL-6 ont été sensiblement augmentées dans le plasma de rats traités, 8 heures après l'injection d'ACF. Ces résultats sont en accord avec la littérature où les niveaux d'IL-1 β et de TNF- α se sont avérés très élevés localement (dans la patte de rat) mais non de façon systémique (dans le plasma) après un traitement avec de l'ACF (Woolf et coll., 1997; Samad et coll., 2001).

Des études comparant des lapins traités avec de la térébenthine à des contrôles ont montré que l'IL-6, et non l'IL-1 β ou le TNF- α , était responsable de la diminution du contenu total en CYPs dans les hépatocytes obtenus à partir du groupe de lapins traités avec la térébenthine (Bleau et coll., 2000). *In vitro*, l'incubation de cultures primaires d'hépatocytes de rats en présence d'IL-6 est associée à une diminution des

niveaux d'ARN_m et/ou du contenu protéique en CYP2B et en CYP2C11 (Chen et coll., 1995; Carlson et coll., 1996). *In vivo*, l'administration d'IL-6 conduit aussi à la diminution du contenu en CYP2C11 hépatique (ARN_m et/ou protéine), mais n'a aucun effet sur les niveaux protéiques de CYP3A2 ou de CYP2E1 (Morgan et coll., 1994). Finalement, chez des souris n'exprimant pas l'IL-6, le contenu en ARN_m de plusieurs CYPs (Cyp1a2, Cyp2a5 et Cyp3a11) n'est pas affecté par le traitement de térébenthine malgré une inflammation locale soutenue (Siewert et coll., 2000). Il semble donc que l'altération de l'expression d'IL-6 mène, d'une part, à une séquestration de l'événement local et conduit, d'autre part, à la diminution de l'intensité de la réponse inflammatoire au niveau du foie. Ceci corrobore le rôle prédominant de l'IL-6 dans la répression des CYPs après l'administration d'un stimulus inflammatoire. Cependant, nous ne pouvons exclure la participation de l'IL-1 β ou du TNF- α puisque ces cytokines favorisent la sécrétion d'IL-6 (Luheshi et coll., 1997).

Le mécanisme par lequel les cytokines (IL-6 et/ou autres) entraînent une répression des CYPs après un traitement avec de l'ACF requiert une analyse plus poussée. D'une part, beaucoup d'études suggèrent que la plupart des CYPs peuvent être modifiés au niveau prétraductionnel et que dans la plupart des cas, les cytokines sont impliquées comme médiateurs de cette réponse (Renton, 2001). D'autre part, la suppression engendrée par les cytokines pourrait également être posttraductionnelle pour au moins un isoforme (CYP2E1). Enfin, nous ne pouvons exclure la participation d'autres médiateurs, libérés directement ou indirectement pendant la réaction inflammatoire. Par exemple, l'expression du CYP2C11 est régulée par plusieurs hormones et facteurs de croissance, ce qui pourrait expliquer sa susceptibilité élevée aux stimuli inflammatoires lorsque comparée aux autres CYPs (Iber et coll., 1999).

Grâce aux résultats obtenus au cours de cette étude, nous pouvons suggérer la séquence d'événements suivante (Figure 1) : i) la réaction inflammatoire engendrée par l'administration d'ACF provoquerait la libération précoce de cytokines dans le

plasma, ii) ces cytokines se distribueraient dans l'organisme et atteindraient différentes cellules (immunitaires ou non) qui libèreraient à leur tour des médiateurs inflammatoires secondaires, iii) ensemble, les cytokines et les médiateurs inflammatoires agiraient de façon directe ou indirecte sur des organes comme le foie et entraîneraient (a) une augmentation de la synthèse des protéines de la phase aiguë comme l'AGP et (b) une altération sélective de la synthèse et de l'activité des CYPs, particulièrement le CYP2C11. Ces modifications biochimiques précoces pourraient avoir des conséquences pharmacocinétiques et pharmacodynamiques lorsque des molécules sont administrées à des rats préalablement traités avec de l'ACF, en particulier pour les composés principalement éliminés par métabolisme hépatique.

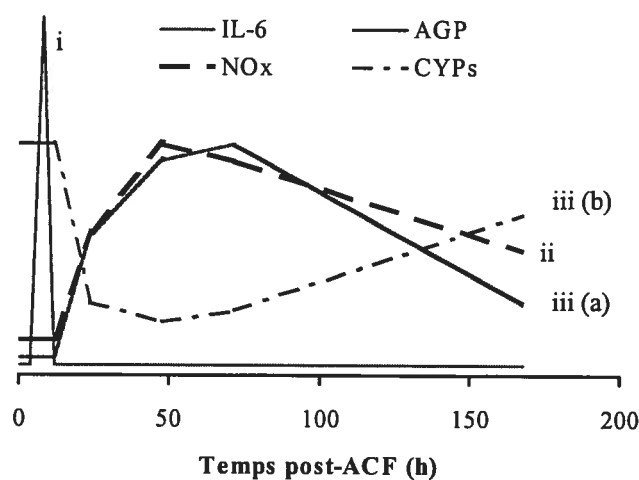


Figure 1. Représentation graphique de la séquence d'événements proposée.

2.2. CARACTÉRISATION DU MÉTABOLISME ET DE LA PHARMACOCINÉTIQUE DU SNC80 CHEZ LE RAT TÉMOIN ET LE RAT TRAITÉ AVEC DE L'ACF

L'objectif premier de l'étude présentée au Chapitre IV était de caractériser la pharmacocinétique du SNC80. Nos résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* supportent l'hypothèse que la voie d'élimination principale du SNC80 chez le rat est le métabolisme hépatique par les CYPs. Les points suivants le confirment : i) le SNC80 est fortement métabolisé ($CL_{int} > 1000 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protéines microsomales) par un processus NADPH-dépendant dans les microsomes de foie de rats, ii) moins de 5 % de la dose est retrouvé sous forme inchangée dans les urines et dans les fèces après une administration orale ou intraveineuse de SNC80 et iii) dans des CYPs recombinants de rat, le CYP3A2, le CYP2C11 et le CYP2D1 ont tous montré la capacité de métaboliser le SNC80 de façon très efficace (résultats non publiés).

In vivo, la clairance plasmatique du SNC80 est élevée (3,11 L/h/kg) et en accord avec sa clairance prédite à partir de la CL_{int} obtenue *in vitro* (~ 2,6 L/h/kg) dans les microsomes de foie de rats. Compte tenu du rôle prédominant du métabolisme hépatique, et en présumant un ratio sang-plasma de 1 et un débit hépatique de 4,2 L/h/kg, le SNC80 peut être considéré comme un composé possédant un coefficient d'extraction hépatique (E_H) intermédiaire à élevé chez le rat ($E_H \sim 0,7$). Le SNC80 est caractérisé par un volume de distribution élevé ($V_{ss} \sim 3,5 \text{ L}/\text{kg}$) qui excède celui de l'eau corporelle. La distribution extensive du SNC80 se reflète sur sa demi-vie plasmatique terminale, qui est de 2 heures en dépit de sa clairance plasmatique élevée. *In vitro*, le SNC80 est fortement lié aux protéines plasmatiques et moins de 6 % de la concentration totale est retrouvé dans le plasma de rat sous forme libre.

Lorsque le SNC80 est administré par voie orale, moins de 5 % de la dose atteint la circulation systémique. En raison du rôle prédominant du métabolisme hépatique dans l'élimination du SNC80, la faible biodisponibilité orale du SNC80 pourrait être

le résultat d'un effet de premier passage hépatique important. Cependant, bien qu'il contribue de façon significative au métabolisme du SNC80 chez le rat, le métabolisme hépatique ne permet pas d'expliquer complètement la faible biodisponibilité orale du SNC80. En effet, en tenant compte du coefficient E_H calculé à partir de la clairance totale ($\sim CL_H$), nous obtenons une biodisponibilité orale prédite d'environ 27 %. Ceci suggère donc qu'une barrière supplémentaire contribue à la faible biodisponibilité orale du SNC80 chez le rat.

La biodisponibilité orale représente, globalement, la fraction de la dose absorbée à partir de l'intestin ayant réussi à éviter le métabolisme hépatique et/ou intestinal. Ainsi, le tractus gastro-intestinal pourrait aussi contribuer à l'effet de premier passage du SNC80. De façon plus spécifique, l'effet de premier passage intestinal pourrait être dû à une absorption incomplète du SNC80 ou à son métabolisme par des enzymes présentes dans la muqueuse intestinale. La contribution du métabolisme est probablement plus importante car l'absorption du SNC80 est presque complète chez le rat. En effet, moins de 3 % de la dose est retrouvé sous forme inchangée dans les fèces après administration orale (en comparaison, seulement 1,5 % de la dose après une administration intraveineuse). Ceci suggère donc que plus de 98 % de la dose orale arrive à traverser la paroi intestinale. En accord avec ces données, des études mécanistiques effectuées dans notre laboratoire à l'aide de systèmes *in vitro* (lignée cellulaire de type Caco-2) suggèrent que le SNC80 pénètre bien les membranes et subit très peu l'influence de systèmes d'efflux tels que la P-glycoprotéine (résultats non publiés). Puisque l'absorption ne semble pas influencer la biodisponibilité orale du SNC80 de façon significative chez le rat et que l'extraction hépatique n'explique pas complètement cette dernière, nous pouvons donc en déduire que le métabolisme intestinal pourra être significatif et contribuera à l'élimination présystémique du SNC80. Des études plus approfondies sont cependant nécessaires afin d'évaluer la contribution réelle du métabolisme intestinal à l'effet de premier passage du SNC80.

Notre modèle compartimental nous a permis de mettre en évidence la présence d'un double-pic dans le profil pharmacocinétique du SNC80 après une administration orale. La présence de multiples pics d'absorption n'est pas un phénomène inconnu en pharmacocinétique. En effet, plusieurs médicaments tels que l'acébutolol, l'épinastine, la nifédipine, la ranitidine et l'alprazolam montrent ce profil plasmatique après administration orale chez le rat (Mummaneni et Dressman, 1994; Grundy et coll, 1998; Wang et coll. 1999; Ogiso et coll, 2001; Mostafavi et Foster 2003). Ces molécules sont pour la plupart mal absorbées et présentent un premier pic de petite taille et un deuxième pic, tardif, représentant essentiellement toute la portion de la dose absorbée oralement. Le profil atypique du SNC80 diffère sensiblement de celui de ces molécules car il est presque complètement absorbé et, d'autre part, près de 75 % de sa fraction absorbée est présente dans le premier pic d'absorption. Plusieurs facteurs pourraient contribuer à la mise en place d'un tel profil d'absorption. Ils incluent le métabolisme et les phénomènes d'efflux pré-systémiques (cycle entérohépatique), la présence de « fenêtres d'absorption » le long du tractus gastro-intestinal ou encore une vidange gastrique variable.

En ce qui concerne le SNC80, la présence d'un cycle entérohépatique est peu probable car le même phénomène n'est pas observé après administration intraveineuse. Bien que l'hypothèse d'une absorption différentielle le long du tractus gastro-intestinal ne puisse être écartée, la probabilité que le double pic d'absorption observé au niveau des concentrations plasmatiques après administration orale soit causé par une réduction de la motilité gastrique provoquée par le SNC80 est plus élevée. En effet, des publications ont montré que cette entité chimique provoque un ralentissement du péristaltisme au niveau du petit intestin et diminue la motilité du côlon chez le cobaye et le rat, respectivement (Broccardo et coll., 1998; Negri et coll., 1999; Shahbazian et coll., 2002). Bien que son mécanisme d'action demeure controversé, il semble que l'inhibition péristaltique engendrée par le SNC80 dépende à la fois de l'activation du récepteur δ et d'autres cibles locales non opioïdes. D'autres

études, autant au niveau pharmacodynamique que pharmacocinétique, sont nécessaires afin de cerner correctement cette nouvelle problématique.

Un second objectif des travaux présentés au Chapitre IV était, d'une part, de vérifier l'effet de l'ACF administré 24 heures au préalable sur la pharmacocinétique du SNC80 et, d'autre part, d'évaluer si les modifications observées étaient en accord avec les données expérimentales obtenues au Chapitre III. Notre étude montre en effet des différences au niveau de la pharmacocinétique du SNC80 après une administration intraveineuse à des rats traités avec de l'ACF. Ces modifications se retrouvent principalement au niveau des processus d'élimination et conduisent à une diminution de la clairance plasmatique du SNC80.

Selon le modèle d'équilibre veineux, la clairance d'entités chimiques possédant un coefficient d'extraction hépatique intermédiaire à élevé peut être changée par des modifications survenant à la suite d'altérations de l'un des paramètres physiologiques suivants: débit sanguin hépatique, f_u ou CL_{int} . Par conséquent, l'ensemble des modifications observées au niveau de l'élimination du SNC80 pourrait être le résultat de facteurs affectant l'un ou la totalité de ces paramètres.

Tout d'abord, la présence d'un déséquilibre du contenu en protéines dans le plasma de rat pourrait contribuer aux modifications de clairance du SNC80, car ce dernier s'y lie fortement. La séquence d'observations suivantes justifie cette affirmation : i) chez le rat, l'administration d'ACF engendre une augmentation des concentrations plasmatiques d'AGP à des niveaux correspondant approximativement au triple de ceux obtenus chez le groupe témoin et ce 24 heures suivant l'injection d'ACF, ii) le SNC80, une base faible, se lie fortement à l'AGP et iii) la liaison aux protéines plasmatiques de plusieurs médicaments possédant beaucoup d'affinité pour l'AGP est augmentée dans certaines conditions inflammatoires lorsque les niveaux plasmatiques d'AGP sont élevés (Israeli et Dayton, 2001). En résumé, la diminution de la f_u du SNC80 engendrée par l'augmentation des niveaux d'AGP plasmatique contribue

probablement à la diminution de sa clairance plasmatique chez les rats traités avec une dose unique d'ACF.

Une autre cause de la modification de clairance plasmatique pourrait être un changement au niveau des enzymes du métabolisme hépatique. Les résultats obtenus au Chapitre III ont prouvé que le contenu et l'activité enzymatique de plusieurs CYPs sont diminués dans les microsomes de foie obtenus à partir de rats traités avec de l'ACF. En utilisant ces mêmes microsomes, nous avons observé que cette baisse du contenu/activité était accompagnée d'une diminution de la CL_{int} *in vitro* du SNC80. La chute de Cl_{int} engendrée par la réduction du contenu et de l'activité des CYPs hépatiques contribue donc probablement aussi à la diminution de la clairance plasmatique du SNC80 chez les rats traités avec une dose unique d'ACF. Ensemble, ces observations suggèrent qu'une diminution de la capacité métabolique du foie combinée avec une diminution substantielle de la fraction non liée converge vers une diminution significative de la clairance plasmatique du SNC80.

Enfin, la possibilité d'une modification de clairance occasionnée par un changement du débit sanguin hépatique peut être exclue puisqu'il a été démontré que ce dernier demeure inchangé chez le rat souffrant d'arthrite induite par l'administration d'ACF (Walker et coll., 1985).

Le SNC80 montre également une augmentation de ses concentrations plasmatiques après administration orale à des rats traités avec l'ACF par rapport aux animaux normaux. Malheureusement, la variabilité inter-individuelle observée dans les deux groupes de rats ne nous a pas permis d'observer de différences statistiquement significatives. Cette augmentation est essentiellement attribuable à la diminution de la clairance orale du SNC80 chez le rat traité. Celle-ci semble être uniquement le résultat d'altérations de la clairance plasmatique puisque aucun changement substantiel de sa biodisponibilité orale n'a pu être constaté. Cette observation est plutôt inattendue puisque la biodisponibilité orale de la plupart des molécules

éliminées par métabolisme hépatique, comme le SNC80, est sensible aux facteurs affectant leur élimination (Lin et Lu, 1998). En effet, si les changements de clairance obtenus *in vitro* et *in vivo* sont considérés pour estimer une biodisponibilité orale prédite du SNC80 chez les rats traités avec de l'ACF, cette dernière devrait augmenter d'un peu moins du double en comparaison aux animaux non-traités. Il doit donc exister un (des) mécanisme(s) qui interfère(nt) avec la diminution du métabolisme hépatique induit par l'ACF et qui contrecarrent toute augmentation de la biodisponibilité orale du SNC80 chez les rats traités avec l'ACF.

Nos résultats montrent que l'absorption du SNC80 demeure presque complète (> 98%) chez le rat traité avec de l'ACF. Ainsi, en raison du rôle potentiel du métabolisme intestinal dans l'effet de premier passage, nous pouvons suggérer que le phénomène observé serait dû à un métabolisme accru résultant de l'exposition prolongée de la molécule aux enzymes de la muqueuse gastro-intestinale (augmentation du temps de séjour de la molécule dans l'intestin dû à une diminution supplémentaire de la vidange gastrique ou de la motilité gastro-intestinale (Nimmo, 1976)).

En résumé, nos résultats montrent que chez le rat, le SNC80 est principalement éliminé par métabolisme hépatique dépendant des CYPs, et qu'il possède une clairance plasmatique élevée et une biodisponibilité orale faible. La faible biodisponibilité orale de cet agoniste non peptidique des récepteurs δ est probablement le résultat d'un métabolisme pré-systémique important à la fois au niveau du foie et de l'intestin. Notre étude montre également qu'une réponse inflammatoire aiguë induite par l'administration d'ACF entraîne des modifications de la pharmacocinétique du SNC80 chez le rat. Les prédictions *in vitro-in vivo* employées dans cette étude se sont avérées précises et représentent de précieux outils pour évaluer l'impact d'une maladie et/ou de modifications physiologiques sur la pharmacocinétique de médicaments éliminés par voie hépatique. Les changements métaboliques et pharmacocinétiques observés au cours de notre étude montrent donc

l'importance de caractériser les modèles pathologiques utilisés dans un contexte préclinique.

2.3. CARACTÉRISATION MÉTABOLIQUE, PHARMACOCINÉTIQUE ET PHARMACOLOGIQUE D'UN NOUVEL AGONISTE NON PEPTIDIQUE SÉLECTIF DU RÉCEPTEUR δ

Le processus menant au développement de nouveaux médicaments est long et coûteux. Ceci est dû en majeure partie au taux d'échec élevé que les nouvelles entités chimiques rencontrent lors de leur développement clinique (seulement 10 % de toutes ces molécules atteindront le marché). Au début des années 90, un groupe de chercheurs s'est intéressé à l'identification des raisons sous-jacentes à ces échecs (Prentis et coll., 1988). Après une analyse détaillée, Prentis et coll. ont évalué que plus de 40 % des molécules candidates éliminées possédaient des propriétés pharmacocinétiques inacceptables. Ces observations suggéraient donc que le processus de recherche et développement de nouveaux médicaments pourrait grandement bénéficier d'une présélection plus rigoureuse des molécules candidates en se basant, entre autres, sur les facteurs affectant leur profil pharmacocinétique chez l'homme. La plupart des laboratoires pharmaceutiques ont suivi ce conseil et, avec l'implication précoce du métabolisme et de la pharmacocinétique dans les programmes de recherches, la proportion d'échecs associés à un profil pharmacocinétique défavorable a chuté de 40 % à moins de 10% (Palmer, 2003). Ce succès est attribuable non seulement à l'identification des principaux facteurs affectant l'élimination des médicaments chez l'homme mais aussi à l'utilisation d'outils *in vitro*, de modèles de prédiction et de données pharmacocinétiques obtenues chez l'animal.

En raison du potentiel thérapeutique important associé aux agonistes δ , le SNC80 a été choisi comme molécule chef de file pour la synthèse d'une nouvelle génération d'analgésiques chez AstraZeneca R&D Montréal. Les arylxylidèneméthylpipéridines

comme l'ARM390 représentent donc une nouvelle classe d'agonistes δ avec des propriétés pharmacologiques égales ou supérieures à celle du SNC80 (Wei et coll., 2000). Parce qu'elles possèdent une structure globalement similaire au SNC80, ces entités chimiques montrent des propriétés physico-chimiques [ex : lipophilicité, propriétés acido-basiques, nombre de donneurs de liens hydrogène, nombre d'azotes, etc.] qui les rendent susceptibles d'être éliminées (comme le SNC80) par un métabolisme hépatique dépendant des CYPs chez l'homme ou l'animal.

Les études de Obach et coll (1999) ont montré qu'il existe une corrélation entre les clairances prédites *in vitro* à partir des microsomes de foie et celle observées *in vivo* (animal/homme) pour des molécules dont l'élimination par métabolisme hépatique est prédominante. Les microsomes de foie provenant de différentes espèces sont donc utilisés à titre d'outils de criblage (« screening ») de première intention permettant d'éliminer les composés indésirables d'une nouvelle série de molécules, d'optimiser leur structure face à la molécule chef de file et de minimiser le nombre d'essais *in vivo* chez l'animal et chez l'homme. Tel que démontré dans les chapitres précédents, les études de métabolisme *in vitro* dans les microsomes de foie représentent une première étape vers la prédiction de la clairance et de la biodisponibilité orale *in vivo*.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la pharmacologie *in vitro* de l'ARM390 comparativement à celle du SNC80. Nous avons démontré que l'ARM390 est un agoniste capable d'activer de façon sélective les protéines G associées au récepteur δ dans les membranes de cellules exprimant uniquement le récepteur δ humain cloné et dans les membranes de cerveau de rat. Ces études ont montré que l'ARM390 possédait les propriétés pharmacologiques *in vitro* nécessaires pour devenir un outil pharmacologique sélectif pour les récepteurs δ . Bien que le SNC80 représente la référence en matière d'agonistes non peptidiques des récepteurs δ , les résultats *in vitro* et *in vivo* présentés au Chapitre IV montrent qu'il possède plusieurs lacunes pharmacocinétiques, du moins chez le rat. Le second objectif des travaux présentés au Chapitre V de cette thèse était de vérifier si la synthèse de nouveaux

agonistes δ avec une stabilité métabolique *in vitro* accrue, comme l'ARM390, pouvait permettre d'obtenir des molécules avec un profil pharmacocinétique favorable chez le rat par rapport au SNC80.

Chez le rat, les propriétés pharmacocinétiques de l'ARM390 diffèrent largement de celles obtenues avec le SNC80. Tout d'abord, sa biodisponibilité orale (70 %) contraste de façon importante avec celle obtenue avec le SNC80 (4 %). Ces caractéristiques pharmacocinétiques orales représentent un avantage certain en faveur de l'utilisation de l'ARM390 à titre d'outil pharmacologique pour des études chez le rat. La fraction de la dose orale d'ARM390 qui n'atteint pas la circulation sanguine (30 %) résulte probablement d'un effet de premier passage hépatique car la biodisponibilité orale de l'ARM390 extrapolée à partir des données *in vitro* (f_u , Cl_{int}) est correctement prédite par rapport à la biodisponibilité orale mesurée. De plus, un effet de premier passage important est supporté par le fait que les ratios de l'aire sous la courbe de son métabolite majeur (ARM827) sur celle du parent sont cinq fois plus élevés après administration orale qu'après injection intraveineuse.

En revanche, contrairement au SNC80, le métabolisme microsomal NADPH-dépendant ne représenterait pas l'unique voie d'élimination de l'ARM390 chez le rat. Ceci est suggéré par le fait que la clairance hépatique prédite du ARM390 est presque trois fois plus faible que la clairance plasmatique mesurée *in vivo* après administration intraveineuse chez le rat. Plusieurs possibilités pourraient expliquer cette différence: i) la clairance métabolique de l'ARM390 ne serait pas le mécanisme majeur d'élimination chez le rat (d'autres voies d'excrétion telles que l'excrétion rénale ou biliaire pourraient contribuer à son élimination), ii) le métabolisme microsomal NADPH-dépendant ne serait pas la voie prédominante de métabolisme de l' ARM390 dans le foie de rat ou, enfin, iii) le foie ne serait pas l'organe principal de clairance métabolique. Des études effectuées avec un analogue structural du ARM390 suggèrent que moins de 10 % de la dose administrée par voie intraveineuse pourrait être excrétée dans l'urine et dans les fèces chez le rat (résultats non publiés). De plus,

la prédiction de la clairance métabolique obtenue à partir de la Cl_{int} déterminée dans des hépatocytes de rats est semblable à celle obtenue avec les microsomes de foie, ce qui suggère que le métabolisme oxydatif NADPH-dépendant serait la voie de métabolisme majeure de l'ARM390 dans le foie de rat (résultats non publiés). Ceci laisse donc présager la contribution d'une voie d'élimination non-hépatique chez le rat et d'autres études seront nécessaires afin de résoudre cette question.

Grâce à l'avènement de la HPLC-MS et l'amélioration des techniques *in vitro*, la caractérisation précoce des métabolites d'entités chimiques synthétisées au cours d'un programme de recherche est devenue beaucoup plus facile. Celle-ci est maintenant considérée comme essentielle à l'interprétation des données pharmacocinétiques et à l'élaboration de stratégies de design moléculaire visant à améliorer les qualités pharmacocinétiques des nouvelles entités chimiques (Baillie et coll., 2002). Les guides de recommandation des agences réglementaires (ex : FDA) demandent d'ailleurs de prendre en considération le ou les métabolites lors de la préparation de documents visant à l'homologation de nouvelles entités chimiques. Les métabolites ont tous le potentiel d'être pharmacologiquement ou toxicologiquement actifs (Parkinson et coll., 1996). Ils dépendent aussi de l'espèce étudiée, autant au niveau qualitatif que quantitatif et peuvent donc représenter une source de complexité supplémentaire lors de l'interprétation des données *in vivo* de la substance mère. Les métabolites actifs peuvent altérer la réponse pharmacologique primaire et secondaire du composé d'intérêt, compliquer les relations pharmacocinétique-pharmacodynamie et même être responsables presque en totalité de l'effet du médicament. Le dernier objectif des travaux présentés au Chapitre V de cette thèse était de vérifier et de comparer le profil métabolique de l'ARM390 et celui du SNC80 *in vitro* et *in vivo* chez le rat.

Nos résultats indiquent que la forte Cl_{int} obtenue avec le SNC80 après incubation dans les microsomes de foie de rats est due à sa biotransformation en une multitude de métabolites dont le *N*-desallyl-SNC80 et le SNC86, qui représentent à eux deux la

majorité de son métabolisme microsomal. Ces métabolites sont également prédominants *in vivo* dans le plasma obtenu à partir de rats ayant reçu une dose unique de SNC80 par voie orale ou intraveineuse. La meilleure stabilité métabolique obtenue avec l'ARM390 dans les microsomes de foie de rat est probablement attribuable au fait que, par rapport au SNC80, les groupements labiles tels que le *O*-méthyl ou le *N*-allyl ont été éliminés. En effet, lorsque ces mêmes groupements sont apposés sur la structure du ARM390, la stabilité métabolique de la molécule diminue de façon considérable (résultats non publiés). Nous avons aussi constaté que l'élimination des groupements méthoxy et *N*-allyl de la structure centrale du ARM390 a conduit à une réorientation du métabolisme en faveur de la *N*-déséthylation de la fonction diéthylbenzamide, une voie métabolique mineure du SNC80 chez le rat. Ceci illustre donc l'importance de tenir compte des métabolites lors du design moléculaire.

Nous avons démontré grâce à nos études de pharmacologie *in vitro* que le SNC86, le métabolite prédominant du SNC80 *in vivo*, est un très puissant agoniste des récepteurs δ ($EC_{50}=0,28$ nM) avec une sélectivité mitigée face aux récepteurs μ et κ . Alors qu'il active partiellement le récepteur μ , le SNC86 est un agoniste de puissance modeste (80 nM) des récepteurs κ . Des études dans les membranes de cerveau de rats montrent qu'il est au moins 130 fois plus puissant que le SNC80 pour activer les récepteurs endogènes couplés aux protéines G. Des expériences avec des antagonistes sélectifs ont de plus révélé que son activité est essentiellement associée au récepteur δ . Des études ont aussi montré que l'autre métabolite majeur (le *N*-desallylSNC80) se lie de façon sélective au récepteur δ (Furness et coll., 2000). Furness et coll. ont démontré que ce métabolite est presque deux fois moins efficace que le SNC80 pour activer la liaison du $GTP\gamma S$ dans les membranes de cerveau de rats.

Malheureusement, cet aspect est souvent laissé de côté dans les études de pharmacodynamie qui utilisent des « standards » pharmacologiques dont la pharmacocinétique n'a pas été caractérisée. Considérant les ratios métaboliques de SNC86/SNC80 obtenus chez le rat (0,12 i.v. ; 1,8 p.o.) et l'activité pharmacologique

du SNC86 obtenue *in vitro* dans les membranes de cerveau de rat, le SNC86 pourrait contribuer à l'action pharmacologique de la molécule mère, et ce de façon partielle ou prédominante, selon la voie d'administration. Quand ces considérations sont prises en ligne de compte, il est discutable de conclure que les propriétés analgésiques obtenues avec le SNC80 administré par voie systémique à des rongeurs proviennent uniquement du SNC80 ou même du récepteur δ . Il nous est donc permis de s'interroger sur les résultats de l'étude de Bilsky et coll. (1995) où l'effet analgésique obtenu après administration orale du SNC80 à des souris pouvait provenir à la fois du SNC80 et du SNC86.

Les résultats obtenus dans notre étude montrent en revanche que l'élimination du substituant éthyle de la structure du ARM390 (formation du métabolite ARM827) conduit à une diminution importante de l'affinité, de la sélectivité et de l'activité du métabolite face au récepteur δ . Cette altération des propriétés pharmacologiques par modification de la fonction diéthylbenzamide n'est pas exclusive à cette classe de composés puisque des analogues *N*-déséthylés du SNC80 ou d'autres diarylpipérazines présentent aussi une chute d'affinité et d'activité face au récepteur δ (Furness et coll., 2000; Plobeck et coll., 2000). Puisque, chez le rat, les concentrations plasmatique de l'ARM827 n'ont jamais dépassé celles du ARM390 après une administration intraveineuse ou orale et que le métabolite est moins efficace et puissant que l'ARM390 dans les membranes de cerveau de rats, il est peu probable que ce métabolite interfère avec l'action pharmacologique de la molécule mère.

L'analyse détaillée de relations structure-activité combinée avec des expériences d'amarrage de ligands spécifiques au récepteur δ et des études de mutagenèse dirigée ont montré qu'il existe une liaison hydrogène importante entre la fonction diéthylbenzamide d'analogues diarylpiperazines du SNC80 et un résidu tryptophane (Trp 284) présent sur la troisième boucle extracellulaire du récepteur δ humain (Valiquette et autres, 1996 ; Pepin et autres, 1997). À la lumière de nos résultats et de

ceux obtenus par Wei et coll., l'ARM390 et ses congénères semblent interagir avec le site actif du récepteur δ de manière semblable aux diarylpipérazines, suggérant qu'ils présentent essentiellement le même pharmacophore (Calderon et coll., 1997; Wei et coll., 2000).

En résumé, nos études montrent que l'ARM390 possède les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques nécessaires pour devenir un outil précieux pour la caractérisation des processus associés au récepteur δ dans les modèles animaux. D'autre part, en raison de la présence de métabolites actifs et/ou du manque de sélectivité observée avec ces molécules, les chercheurs impliqués se doivent de considérer les limites associées à l'utilisation du SNC86 (et de son racémique (\pm)-BW373U86) et du SNC80 en tant qu'outils pharmacologiques *in vivo*. Notre étude introduit aussi des informations supplémentaires sur la compréhension du pharmacophore de cette nouvelle classe d'agonistes, nous permettant de confirmer la fonction diéthylbenzamide comme élément structural important de l'affinité et de l'activité envers le récepteur δ . Les données obtenues dans nos travaux seront donc utiles aux chercheurs qui oeuvrent dans le domaine de la pharmacologie et de la physiologie des récepteurs δ .

CONCLUSION

Le présent programme de recherche s'est attaché à donner une représentation de la multidisciplinarité à laquelle le chercheur en métabolisme et pharmacocinétique est exposé en milieu industriel. Nous nous sommes principalement attardés aux systèmes *in vitro* et aux CYPs hépatiques, déterminants majeurs de l'élimination de plusieurs molécules chez l'homme et le rat. Grâce aux travaux effectués au cours de cette thèse, nous avons contribué à l'avancement de la recherche dans le domaine de la douleur sur plusieurs fronts: i) en procurant une nouvelle méthode HPLC-MS pour la mesure de la morphine et ses métabolites, ii) en identifiant les enzymes responsables de la *N*-déméthylation de la morphine chez l'homme, iii) en mettant en évidence l'impact des différences physiopathologiques induites par l'inflammation sur le métabolisme et la pharmacocinétique d'entités chimiques, et, enfin, iv) en faisant reconnaître l'importance du métabolisme et de la pharmacocinétique dans l'interprétation des données avec des agonistes non peptidiques des récepteurs δ . À la lumière des résultats obtenus, nous avons été en mesure de documenter les découvertes suivantes :

- Nous avons prouvé que l'utilisation d'une méthode HPLC-MS accompagnée d'étapes simples de précipitation-reconstitution représente une alternative aux méthodes classiques de HPLC-MS ou MS/MS utilisant l'extraction liquide-liquide ou en phase solide-liquide pour quantifier la morphine et ses métabolites dans les liquides biologiques. La sensibilité élevée, les temps d'exécution rapides et la simplicité de notre méthode analytique la rendent particulièrement attrayante pour des études de métabolisme et de pharmacocinétique *in vitro* ou *in vivo*.
- Nous avons montré que le CYP3A4 et le CYP2C8 ont un rôle important à jouer dans la *N*-déméthylation de la morphine chez l'homme grâce à une approche classique faisant intervenir divers systèmes *in vitro*. En raison de la faible contribution la *N*-déméthylation à la biotransformation de la morphine, nous croyons que les interactions médicamenteuses résultant du CYP3A4 ou du

CYP2C8 ne devraient pas être problématiques en clinique à moins que des voies d'éliminations principales telles que la glucuroconjugaison soient également affectées.

- Nous avons confirmé une diminution du contenu en CYPs dans le foie et une augmentation concomitante de la concentration plasmatique de marqueurs inflammatoires tels que l'AGP et en NOx dans le modèle de douleur induite par l'injection d'une dose unique d'ACF. De plus, la chute du contenu en CYPs hépatique est sélective pour certains isoformes, tel qu'illustré par la diminution du contenu et/ou des activités des CYP2B, CYP2C6, CYP2C11 (l'isoforme le plus affecté de tous) et CYP2E1 dans les microsomes de foie de rat. Enfin, l'IL-6 aurait un rôle majeur dans les changements observés au niveau du contenu en CYPs et des concentrations plasmatiques d'AGP. En tenant compte de l'utilisation répandue des modèles de douleur inflammatoire chez les rongeurs, la connaissance de ces modifications permettra aux chercheurs d'expliquer, du moins en partie, la variabilité pharmacocinétique observée et du, même coup, nous permettre d'améliorer les relations pharmacocinétique/pharmacodynamie de nouvelles entités chimiques.
- Nous avons contribué significativement à élargir les connaissances sur le SNC80 en caractérisant sa pharmacocinétique chez le rat. En effet, nous avons confirmé que le SNC80 possède plusieurs lacunes pharmacocinétiques dont une clairance plasmatique élevée (3,11 L/h/kg) et une biodisponibilité orale très faible (4 %). De plus, le SNC80 est principalement éliminé par métabolisme hépatique (dépendant des CYPs), fortement lié aux protéines plasmatiques (~94 %; en particulier à l'AGP) et son absorption après administration orale est essentiellement complète (> 98 %). Enfin, nos travaux suggèrent qu'un métabolisme gastro-intestinal pourrait contribuer à la faible biodisponibilité orale du SNC80.

- Nous avons démontré, en utilisant le SNC80 à titre de contrôle, que les modifications biochimiques observées chez le rat traité avec une dose unique d'ACF sont accompagnées d'une diminution de la fraction plasmatique libre (~30 %) et de la clairance intrinsèque (~40 %) dans les microsomes de foie. Ces différences se répercutent au niveau pharmacocinétique et se retrouvent principalement au niveau des processus d'élimination où elles conduisent à une diminution de la clairance plasmatique du SNC80. Grâce aux approches de prédiction *in vitro-in vivo*, nous avons été en mesure d'établir un lien entre les modifications *in vitro* et la modification de la clairance plasmatique obtenue *in vivo*. En revanche, nos résultats ne montrent aucune modification de biodisponibilité orale. Cette observation est plutôt inattendue puisque la biodisponibilité orale de la plupart des molécules éliminées par métabolisme pré-systémique, comme le SNC80, est sensible aux facteurs affectant leur élimination. D'après nos travaux, cette exception pourrait être le fruit de modifications au niveau de l'absorption et/ou du métabolisme intestinal du SNC80 chez l'animal traité avec une dose unique d'ACF.
- Nos travaux ont montré que l'ARM390 possède les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques nécessaires pour devenir un outil pharmacologique de choix pour la caractérisation des processus associés au récepteur δ dans les modèles animaux. La sélectivité unique de cette molécule et les faibles propriétés agonistiques de son métabolite majeur (ARM827) la rendent spécialement attrayante en comparaison aux autres agonistes δ disponibles. L'excellente biodisponibilité orale du ARM390 représente une amélioration marquée face au SNC80. En raison du manque de sélectivité de l'un et du profil métabolique de l'autre (formation de métabolite(s) actif(s) qui pourraient contribuer à leurs effets pharmacologiques), nous croyons que les chercheurs devraient considérer les limites qu'engendrent l'utilisation du (\pm)-BW373U86 (le racémique de SNC86) et du SNC80 à titre de standard pharmacologique *in vivo*.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abbadie C, Lombard MC, Besson JM, Trafton JA, et Basbaum AI (2002) Mu and delta opioid receptor-like immunoreactivity in the cervical spinal cord of the rat after dorsal rhizotomy or neonatal capsaicin: an analysis of pre- and postsynaptic receptor distributions. *Brain Res.* **930**:150-162.

Abbott FV et Palmour RM (1988) Morphine-6-glucuronide: analgesic effects and receptor binding profile in rats. *Life Sci.* **43**:1685-1695.

Abdel-Razzak Z, Corcos L, Fautrel A, et Guillouzo A (1995) Interleukin-1 beta antagonizes phenobarbital induction of several major cytochromes P450 in adult rat hepatocytes in primary culture. *FEBS Lett.* **366**:159-164.

Abramson SB, Attur M, Amin AR, et Clancy R (2001) Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr.Rheumatol.Rep.* **3**:535-541.

Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, et Watson S (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend.* **51**:127-140.

Ameer B et Weintraub RA (1997) Drug interactions with grapefruit juice. *Clin.Pharmacokinet.* **33**:103-121.

Andersson T, Holmberg J, Rohss K, et Walan A (1998) Pharmacokinetics and effect on caffeine metabolism of the proton pump inhibitors, omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **45**:369-375.

Ashburn MA et Staats PS (1999) Management of chronic pain. *Lancet* 353:1865-1869.

Bahadur N, Leathart JB, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, Houdt JV, Hendrickx J, Mannens G, Bohets H, Williams FM, Armstrong M, Crespi CL, et Daly AK (2002) CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6 α -hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem.Pharmacol.* 64:1579-1589.

Baillie SP, Bateman DN, Coates PE, et Woodhouse KW (1989) Age and the pharmacokinetics of morphine. *Age Ageing* 18:258-262.

Baillie TA, Cayen MN, Fouda H, Gerson RJ, Green JD, Grossman SJ, Klunk LJ, LeBlanc B, Perkins DG and Shipley LA (2002) Drug metabolites in safety testing. *Toxicol Appl Pharmacol.* 182:188-96.

Baldwin SJ, Clarke SE, et Chenery RJ (1999) Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of rosiglitazone. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 48:424-432.

Bandiera S, Ryan DE, Levin W, et Thomas PE (1986) Age- and sex-related expression of cytochromes p450f and P450g in rat liver. *Arch.Biochem.Biophys.* 248:658-676.

Barclay TB, Peters JM, Sewer MB, Ferrari L, Gonzalez FJ, et Morgan ET (1999) Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha dependent. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 290:1250-1257.

Barker CW, Fagan JB, et Pasco DS (1994) Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress. *J.Biol.Chem.* **269**:3985-3990.

Barouki R et Morel Y (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem.Pharmacol.* **61**:511-516.

Basbaum AI et Jessell TM (2000) The perception of pain, in *Principles of Neuroscience* (Kandel ER, Schwartz JH, et Jessell TM éditeurs) pp 472-491, McGraw-Hill, New York.

Basbaum AI et Woolf CJ (1999) Pain. *Curr.Biol.* **9**:R429-R431.

Bastien MC, Leblond F, Pichette V, et Villeneuve JP (2000) Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **78**:912-919.

Baumann H et Gauldie J (1994) The acute phase response. *Immunol.Today* **15**:74-80.

Bazzoni F et Beutler B (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N.Engl.J.Med.* **334**:1717-1725.

Beck FJ et Whitehouse MW (1973) Effect of adjuvant disease in rats on cyclophosphamide and isophosphamide metabolism. *Biochem.Pharmacol.* **22**:2453-2468.

Beck FJ et Whitehouse MW (1974) Impaired drug metabolism in rats associated with acute inflammation: a possible assay for anti-injury agents. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **145**:135-140.

Belpaire FM, de Smet F, Chindavijak B, Fraeyman N, et Bogaert MG (1989) Effect of turpentine-induced inflammation on the disposition kinetics of propranolol, metoprolol, and antipyrine in the rat. *Fundam.Clin.Pharmacol.* **3**:79-88.

Becquemont L, Mouajjah S, Escaffre O, Beaune P, Funck-Brentano C, and Jaillon P (1999) Cytochrome P-450 3A4 and 2C8 are involved in Zopiclone metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**: 1068-1073.

Bertilsson L (1995) Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin.Pharmacokinet.* **29**:192-209.

Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, et Al Shurbaji A (2002) Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **53**:111-122.

Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, et Besson JM (1990) Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res.* **521**:15-22.

Besson JM (1999) The neurobiology of pain. *Lancet* **353**:1610-1615.

Bhagwat SV, Biswas G, Anandatheerthavarada HK, Addya S, Pandak W, et Avadhani NG (1999) Dual targeting property of the N-terminal signal sequence of P4501A1. Targeting of heterologous proteins to endoplasmic reticulum and mitochondria. *J.Biol.Chem.* **274**:24014-24022.

Bhargava HN, Villar VM, Gulati A, et Chari G (1991) Analgesic and hyperthermic effects of intravenously administered morphine in the rat are related to its serum levels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **258**:511-516.

Bilsky EJ, Calderon SN, Wang T, Bernstein RN, Davis P, Hraby VJ, McNutt RW, Rothman RB, Rice KC, et Porreca F (1995) SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **273**:359-366.

Bingham CO, III (2002) The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J.Rheumatol.Suppl* **65**:3-9.

Birbaum LS (1993) Changes in cytochrome P450 in senescence, in *Cytochrome P450* (Schenkman JB et Greim H éditeurs) pp 477-492, Berlin.

Bishop H, Schneider RE, et Welling PG (1981) Plasma propranolol concentrations in rats with adjuvant-induced arthritis. *Biopharm.Drug Dispos.* **2**:291-297.

Bishop MJ, Garrido DM, Boswell GE, Collins MA, Harris PA, McNutt RW, O'Neill SJ, Wei K, et Chang KJ (2003) 3-(α R)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-hydroxybenzyl)-N-alkyl-N-arylbenzamides: potent, non-peptidic agonists of both the micro and delta opioid receptors. *J.Med.Chem.* **46**:623-633.

Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA (2003) Pharmaceutical Research and Manufacturers of America Drug Metabolism and Clinical Pharmacology Technical Working Group. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos.* **31**:815-32.

Bleau AM, Fradette C, El Kadi AO, Cote MC, et Du Souich P (2001) Cytochrome P450 down-regulation by serum from humans with a viral infection and from rabbits with an inflammatory reaction. *Drug Metab Dispos.* **29**:1007-1012.

Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H, et Du Souich P (2000) Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines. *Br.J.Pharmacol.* **130**:1777-1784.

Bleau AM, Levitchi MC, Maurice H, et Du Souich P (2000) Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines. *Br.J.Pharmacol.* **130**:1777-1784.

Bleau AM, Maurel P, Pichette V, Leblond F, du Souich P (2003) Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **473**:197-206.

Boddeke EW (2001) Involvement of chemokines in pain. *Eur.J.Pharmacol.* **429**:115-119.

Boerner U (1975) The metabolism of morphine and heroin in man. *Drug Metab Rev.* **4**:39-73.

Bondoc FY, Bao Z, Hu WY, Gonzalez FJ, Wang Y, Yang CS, et Hong JY (1999) Acetone catabolism by cytochrome P450 2E1: studies with CYP2E1-null mice. *Biochem.Pharmacol.* **58**:461-463.

Bovill JG (1997) Mechanisms of actions of opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur.J.Anaesthesiol.Suppl* **15**:9-15.

Bridges A, Gruenke L, Chang YT, Vakser IA, Loew G, et Waskell L (1998) Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J.Biol.Chem.* **273**:17036-17049.

Broccardo M, Improta G, Tabacco A (1998) Central effect of SNC 80, a selective and systemically active delta-opioid receptor agonist, on gastrointestinal propulsion in the mouse. *Eur J Pharmacol.* **342**:247-51.

Broom DC, Jutkiewicz EM, Folk JE, Traynor JR, Rice KC, et Woods JH (2002) Convulsant activity of a non-peptidic delta-opioid receptor agonist is not required for its antidepressant-like effects in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl)* **164**:42-48.

Brunk SF et Delle M (1974) Morphine metabolism in man. *Clin.Pharmacol.Ther.* **16**:51-57.

Burk O, Tegude H, Koch I, Hustert E, Wolbold R, Glaeser H, Klein K, Fromm MF, Nuessler AK, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, et Wojnowski L (2002) Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. *J.Biol.Chem.* **277**:24280-24288.

Cahill CM, Morinville A, Hoffert C, O'Donnell D, et Beaudet A (2003) Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain* **101**:199-208.

Calderon SN, Rice KC, Rothman RB, Porreca F, Flippen-Anderson JL, Kayakiri H, Xu H, Becketts K, Smith LE, Bilsky EJ, Davis P, et Horvath R (1997) Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 23. Synthesis, opioid receptor binding, and bioassay of the highly selective delta agonist (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80) and related novel nonpeptide delta opioid receptor ligands. *J.Med.Chem.* **40**:695-704.

Calderon SN, Rothman RB, Porreca F, Flippen-Anderson JL, McNutt RW, Xu H, Smith LE, Bilsky EJ, Davis P, et Rice KC (1994) Probes for narcotic receptor

mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist. *J.Med.Chem.* 37:2125-2128.

Carlson RP et Jacobson.PB (1999) Comparison of adjuvant and streptococcal cell wall-induced arthritis, in *In vivo models of inflammation* (Morgan DW et Marshall LA éditeurs) pp 1-50, Birkhäuser, Boston.

Carlson TJ et Billings RE (1996) Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol.Pharmacol.* 49:796-801.

Carr DB et Goudas LC (1999) Acute pain. *Lancet* 353:2051-2058.

Carriere V, Berthou F, Baird S, Belloc C, Beaune P, et de Wazier, I (1996) Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics* 6:203-211.

Cavaillon JM (1993) [Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms]. *Pathol.Biol.(Paris)* 41:799-811.

Cavaillon JM et Haeffner-Cavaillon N (1993) [Cytokines and inflammation]. *Rev.Prat.* 43:547-552.

Cesare P et McNaughton P (1997) Peripheral pain mechanisms. *Curr.Opin.Neurobiol.* 7:493-499.

Chang KJ, Rigdon GC, Howard JL, et McNutt RW (1993) A novel, potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonist BW373U86. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 267:852-857.

Chen C et Pollack GM (1997) Extensive biliary excretion of the model opioid peptide [D-PEN2,5] enkephalin in rats. *Pharm.Res.* **14**:345-350.

Chen J, Nikolova-Karakashian M, Merrill AH, Jr., et Morgan ET (1995a) Regulation of cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) gene expression by interleukin-1, sphingomyelin hydrolysis, and ceramides in rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.* **270**:25233-25238.

Chen JQ, Strom A, Gustafsson JA, et Morgan ET (1995b) Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol.Pharmacol.* **47**:940-947.

Chen ZR, Irvine RJ, Somogyi AA, et Bochner F (1991) Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sci.* **48**:2165-2171.

Cheng PY et Morgan ET (2001) Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states. *Curr.Drug Metab* **2**:165-183.

Chindavijak B, Belpaire FM, et Bogaert MG (1988) Effect of inflammation on the metabolism of antipyrine, lidocaine and propranolol in isolated rat hepatocytes. *Pharmacology* **36**:279-282.

Choy EH et Panayi GS (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N.Engl.J.Med.* **344**:907-916.

Ciba-Geigy (1984) Composition of blood Blood-plasma proteins, in *Geigy Scientific Tables* (Lentner C. éditeur) pp 135-162, Ciba-Geigy, New Jersey.

Clarke SE (1998) In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica* **28**:1167-1202.

Clarke SE et Jones BC (2002) Human cytochrome P450 and their role in metabolism-based drug-drug interaction, in *Drug-Drug interaction* (Rodrigues AD éditeur) pp 55-88, Marcel Dekker, New York.

Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, et Melzack R (1993) Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* **52**:259-285.

Comer SD, Hoenicke EM, Sable AI, McNutt RW, Chang KJ, De Costa BR, Mosberg HI, et Woods JH (1993) Convulsive effects of systemic administration of the delta opioid agonist BW373U86 in mice. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **267**:888-895.

Connor M et Christie MD (1999) Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **26**:493-499.

Coop A et Jacobson AE (1999) The LMC delta opioid recognition pharmacophore: comparison of SNC80 and oxymorphone. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **9**:357-362.

Coop A, Rothman RB, Dersch C, Partilla J, Porreca F, Davis P, Jacobson AE, et Rice KC (1999) delta Opioid affinity and selectivity of 4-hydroxy-3-methoxyindolomorphinan analogues related to naltrindole. *J.Med.Chem.* **42**:1673-1679.

Cotran RS, Kumar V, et Collins T (1999) Acute and chronic inflammation, in *Robbins pathologic basis of disease* pp 50-89, Saunders, Philadelphia.

Dagenais C, Ducharme J, et Pollack GM (2001) Uptake and efflux of the peptidic delta-opioid receptor agonist. *Neurosci.Lett.* **301**:155-158.

Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, et Sjoqvist F (1995) Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **274**:516-520.

Dahlstrom BE et Paalzow LK (1978) Pharmacokinetic interpretation of the enterohepatic recirculation and first-pass elimination of morphine in the rat. *J.Pharmacokinet.Biopharm.* **6**:505-519.

Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, et Goldstein JA (2001) Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics.* **11**:597-607.

Danielson PB (2002) The cytochrome p450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr.Drug Metab* **3**:561-597.

de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, et van den Anker JN (1999) Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin.Pharmacokinet.* **37**:485-505.

Decoster E, Vanhaesebroeck B, Vandenaabeele P, Grooten J, et Fiers W (1995) Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J.Biol.Chem.* **270**:18473-18478.

Degtyarenko KN et Kulikova TA (2001) Evolution of bioinorganic motifs in P450-containing systems. *Biochem.Soc.Trans.* **29**:139-147.

Delaporte E et Renton KW (1997) Cytochrome P4501A1 and cytochrome P4501A2 are downregulated at both transcriptional and post-transcriptional levels by conditions resulting in interferon-alpha/beta induction. *Life Sci.* **60**:787-796.

Desta Z, Zhao X, Shin JG, et Flockhart DA (2002) Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin.Pharmacokinet.* **41**:913-958.

Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, et Hamon M (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol.Rev.* **48**:567-592.

Dinarello CA (1992) The biology of interleukin-1. *Chem.Immunol.* **51**:1-32.

Dinarello CA (1997a) Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**:253-265.

Dinarello CA (1997b) Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* **11**:91-103.

Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**:503-508.

Ding X et Kaminsky LS (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **43**:149-173.

Domanski TL et Halpert JR (2001) Analysis of mammalian cytochrome P450 structure and function by site-directed mutagenesis. *Curr.Drug Metab* **2**:117-137.

Donato MT et Castell JV (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome p450 in drug metabolism: focus on in vitro studies. *Clin.Pharmacokinet.* **42**:153-178.

Donato MT, Guillen MI, Jover R, Castell JV, et Gomez-Lechon MJ (1997) Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon-gamma in human hepatocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **281**:484-490.

Dondio G, Ronzoni S, Eggleston DS, Artico M, Petrillo P, Petrone G, Visentin L, Farina C, Vecchiotti V, et Clarke GD (1997) Discovery of a novel class of

substituted pyrrolooctahydroisoquinolines as potent and selective delta opioid agonists, based on an extension of the message-address concept. *J.Med.Chem.* **40**:3192-3198.

Dondio G, Ronzoni S, Farina C, Graziani D, Parini C, Petrillo P, et Giardina GA (2001) Selective delta opioid receptor agonists for inflammatory and neuropathic pain. *Farmaco* **56**:117-119.

Dong MS, Yamazaki H, Guo Z, et Guengerich FP (1996) Recombinant human cytochrome P450 1A2 and an N-terminal-truncated form: construction, purification, aggregation properties, and interactions with flavodoxin, ferredoxin, and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch.Biochem.Biophys.* **327**:11-19.

Doré D (1994) Les protéines sériques, in *Biochimie clinique* (Beaudoin GJ éditeur) pp 377-433, Griffon d'argile, Sainte-Foy.

Ekins S, VandenBranden M, Ring BJ, et Wrighton SA (1997) Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetics* **7**:165-179.

Ekins S et Wrighton SA (1999) The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev.* **31**:719-754.

El Kadi AO, Bleau AM, Dumont I, Maurice H, et Du Souich P (2000) Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab Dispos.* **28**:1112-1120.

El Kadi AO et Du Souich P (1998) Depression of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: characterization of the nature of mediators in human and rabbit serum, and in the liver. *Life Sci.* **63**:1361-1370.

El Kadi AO, Maurice H, Ong H, et Du Souich P (1997) Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver. *Br.J.Pharmacol.* **121**:1164-1170.

Emami J, Pasutto FM, et Jamali F (1998) Effect of experimental diabetes mellitus and arthritis on the pharmacokinetics of hydroxychloroquine enantiomers in rats. *Pharm.Res.* **15**:897-903.

Emery P et Salmon M (1991) The immune response. 2. Systemic mediators of inflammation. *Br.J.Hosp.Med.* **45**:164-168.

Evans AM et Shanahan K (1995) The disposition of morphine and its metabolites in the in-situ rat isolated perfused liver. *J.Pharm.Pharmacol.* **47**:333-339.

Faucette SR, Hawke RL, LeCluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, et Lindley CM (2000) Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug.Metab.Dispos.* **28**:1222-1230.

Felby S, Christensen H, and Lund A (1974), Morphine concentration in blood and organs in cases of fatal poisoning. *Forensic Science.* **3**: 77-81.

Ferrari L, Jouzeau JY, Gillet P, Herber R, Fener P, Batt AM, et Netter P (1993) Interleukin-1 beta differentially represses drug-metabolizing enzymes in arthritic female rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **264**:1012-1020.

Ferrari L, Peng N, Halpert JR, et Morgan ET (2001) Role of nitric oxide in down-regulation of CYP2B1 protein, but not RNA, in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol.Pharmacol.* **60**:209-216.

Fey GH et Fuller GM (1987) Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. *Mol.Biol.Med.* 4:323-338.

Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, et Kieffer BL (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat.Genet.* 25:195-200.

Flockhart, DA <http://medicine.iupui.edu/flockhart/>. 2003.

Foley KM (2003) Opioid analgesics in clinical pain management: Opioid II, in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Herz A éditeur) pp 697-743, Springer-Verlag, Berlin.

Fontana RJ, Lown KS, Paine MF, Fortlage L, Santella RM, Felton JS, Knize MG, Greenberg A, et Watkins PB (1999) Effects of a char-grilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology* 117:89-98.

Forrester LM, Henderson CJ, Glancey MJ, Back DJ, Park BK, Ball SE, Kitteringham NR, McLaren AW, Miles JS, Skett P, et . (1992) Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem.J.* 281 (Pt 2):359-368.

Fournier T, Medjoubi N, et Porquet D (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim.Biophys.Acta* 1482:157-171.

Fraser GL, Gaudreau GA, Clarke PB, Menard DP, et Perkins MN (2000a) Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br.J.Pharmacol.* 129:1668-1672.

Fraser GL, Parenteau H, Tu TM, Ducharme J, Perkins MN, et Clarke PB (2000b) The effects of delta agonists on locomotor activity in habituated and non-habituated rats. *Life Sci.* **67**:913-922.

Fromm MF, Eckhardt K, Li S, Schanzle G, Hofmann U, Mikus G, et Eichelbaum M (1997) Loss of analgesic effect of morphine due to coadministration of rifampin. *Pain* **72**:261-267.

Frye RF, Schneider VM, Frye CS, et Feldman AM (2002) Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure. *J.Card Fail.* **8**:315-319.

Fuhr U (2000) Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin.Pharmacokinet.* **38**:493-504.

Furness MS, Zhang X, Coop A, Jacobson AE, Rothman RB, Dersch CM, Xu H, Porreca F, et Rice KC (2000) Probes for narcotic receptor-mediated phenomena. 27. Synthesis and pharmacological evaluation of selective delta-opioid receptor agonists from 4-[(alphaR)-alpha-(2S,5R)-4-substituted-2, 5-dimethyl-1-piperazinyl-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamides and their enantiomers. *J.Med.Chem.* **43**:3193-3196.

Gardmark M, Ekblom M, Bouw R, et Hammarlund-Udenaes M (1993) Quantification of effect delay and acute tolerance development to morphine in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **267**:1061-1067.

Gaveriaux-Ruff C et Kieffer BL (2002) Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* **36**:62-71.

Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntfuss D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP,

Kleine K, Meyer UA, et Wojnowski L (2001) Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* 11:111-121.

Gentry CL, Egleton RD, Gillespie T, Abbruscato TJ, Bechowski HB, Hruby VJ, et Davis TP (1999) The effect of halogenation on blood-brain barrier permeability of a novel peptide drug. *Peptides* 20:1229-1238.

George SR, Zastawny RL, Briones-Urbina R, Cheng R, Nguyen T, Heiber M, Kouvelas A, Chan AS, et O'Dowd BF (1994) Distinct distributions of mu, delta and kappa opioid receptor mRNA in rat brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 205:1438-1444.

Gerbai-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N, et Maurel P (2001) Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug.Metab.Dispos.* 29:242-251.

Ghezzi P, Saccardo B, Villa P, Rossi V, Bianchi M, et Dinarello CA (1986) Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect.Immun.* 54:837-840.

Gillum JG, Israel DS, et Polk RE (1993) Pharmacokinetic drug interactions with antimicrobial agents. *Clin.Pharmacokinet.* 25:450-482.

Glare PA et Walsh TD (1991) Clinical pharmacokinetics of morphine. *Ther.Drug Monit.* 13:1-23.

Goldstein JA (2001) Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 52:349-355.

Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, de Morais SM, Bell D, Krahn PM, et Evans DA (1997) Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics* **7**:59-64.

Gonzalez FJ (1988) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol.Rev.* **40**:243-288.

Gonzalez FJ et Fernandez-Salguero P (1998) The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* **26**:1194-1198.

Gonzalez FJ, Matsunaga T, et Nagata K (1989) Structure and regulation of P-450s in the rat P450IIA gene subfamily. *Drug Metab Rev.* **20**:827-837.

Gonzalez FJ, Song BJ, et Hardwick JP (1986) Pregnenolone 16 alpha-carbonitrile-inducible P-450 gene family: gene conversion and differential regulation. *Mol.Cell Biol.* **6**:2969-2976.

Gooderham NJ et Mannering GJ (1986) Depression of cytochrome P-450 and alterations of protein metabolism in mice treated with the interferon inducer polyribonucleosinic acid X polyribocytidylic acid. *Arch.Biochem.Biophys.* **250**:418-425.

Goodwin B, Moore LB, Stoltz CM, McKee DD, et Kliewer SA (2001) Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Mol.Pharmacol.* **60**:427-431.

Gotoh O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J.Biol.Chem.* **267**:83-90.

Gotoh O, Tagashira Y, Iizuka T, et Fujii-Kuriyama Y (1983) Structural characteristics of cytochrome P-450. Possible location of the heme-binding cysteine in determined amino-acid sequences. *J.Biochem.(Tokyo)* **93**:807-817.

Graham SE et Peterson JA (1999) How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch.Biochem.Biophys.* **369**:24-29.

Grundy JS, Eliot LA, Kulmatycki KM and Foster RT (1998) Grapefruit juice and orange juice effects on the bioavailability of nifedipine in the rat. *Biopharm Drug Dispos.* **19**:175-83.

Guengerich FP (1995a) Human cytochrome P450 enzymes, in *Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry* (Ortiz de Montellano PR éditeur) pp 473-535, Plenum Press, New York.

Guengerich FP (1995b) Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P-450 enzymes. *Am J.Clin.Nutr.* **61**:651S-658S.

Guengerich FP (1997) Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem.Biol.Interact.* **106**:161-182.

Guengerich FP (1999) Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **39**:1-17.

Guengerich FP (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem.Res.Toxicol.* **14**:611-650.

Gutstein HB et Akil H (2001) Opioid analgesics, in *Goodman & Gilman's : The pharmacological basis of therapeutics* (Hardman JG, Limbird JE, et Goodman Gilman A éditeurs) pp 569-620, McGraw-Hill, New York.

Haehner BD, Gorski JC, VandenBranden M, Wrighton SA, Janardan SK, Watkins PB, et Hall SD (1996) Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol.Pharmacol.* **50**:52-59.

Hakkola J, Hu Y, et Ingelman-Sundberg M (2003) Mechanisms of Down-Regulation of CYP2E1 Expression by Inflammatory Cytokines in Rat Hepatoma Cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **304**:1048-1054.

Hall SD, Guengerich FP, Branch RA, et Wilkinson GR (1987) Characterization and inhibition of mephenytoin 4-hydroxylase activity in human liver microsomes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **240**:216-222.

Halpert JR et He YA (1993) Engineering of cytochrome P450 2B1 specificity. Conversion of an androgen 16 beta-hydroxylase to a 15 alpha-hydroxylase. *J.Biol.Chem.* **268**:4453-4457.

Hanna MH, Peat SJ, Knibb AA, et Fung C (1991) Disposition of morphine-6-glucuronide and morphine in healthy volunteers. *Br.J.Anaesth.* **66**:103-107.

Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, et Deisenhofer J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure.* **3**:41-62.

Hasler JA, Harlow GR, Szklarz GD, John GH, Kedzie KM, Burnett VL, He YA, Kaminsky LS, et Halpert JR (1994) Site-directed mutagenesis of putative substrate recognition sites in cytochrome P450 2B11: importance of amino acid residues 114, 290, and 363 for substrate specificity. *Mol.Pharmacol.* **46**:338-345.

Hasselstrom J, Alexander N, Bringel C, Svensson JO, et Sawe J (1991) Single-dose and steady-state kinetics of morphine and its metabolites in cancer patients--a comparison of two oral formulations. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **40**:585-591.

Hasselstrom J, Eriksson S, Persson A, Rane A, Svensson JO, et Sawe J (1990) The metabolism and bioavailability of morphine in patients with severe liver cirrhosis. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **29**:289-297.

Hasselstrom J et Sawe J (1993a) Morphine pharmacokinetics and metabolism in humans. Enterohepatic cycling and relative contribution of metabolites to active opioid concentrations. *Clin.Pharmacokinet.* **24**:344-354.

Hasselstrom J, Svensson JO, Sawe J, Wiesenfeld-Hallin Z, Yue QY, et Xu XJ (1996) Disposition and analgesic effects of systemic morphine, morphine-6-glucuronide and normorphine in rat. *Pharmacol.Toxicol.* **79**:40-46.

He YA, Roussel F, et Halpert JR (2003) Analysis of homotropic and heterotropic cooperativity of diazepam oxidation by CYP3A4 using site-directed mutagenesis and kinetic modeling. *Arch.Biochem.Biophys.* **409**:92-101.

Hedlund E, Gustafsson JA, et Warner M (2001) Cytochrome P450 in the brain; a review. *Curr.Drug Metab* **2**:245-263.

Henderson CJ et Wolf CR (1992) Molecular analysis of the cytochrome P450s in the CYP2 gene family. *Prog.Drug.Metab.* **13**:73-139.

Hirano T (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int.Rev.Immunol.* **16**:249-284.

Hiroi T, Chow T, Imaoka S, et Funae Y (2002) Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug Metab Dispos.* **30**:970-976.

Hiroi T, Imaoka S, Chow T, et Funae Y (1998) Tissue distributions of CYP2D1, 2D2, 2D3 and 2D4 mRNA in rats detected by RT-PCR. *Biochim.Biophys.Acta* **1380**:305-312.

Hirota N, Ito K, Iwatsubo T, Green CE, Tyson CA, Shimada N, Suzuki H, et Sugiyama Y (2001) In vitro/in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Biopharm. Drug Dispos.* **22**:53-71.

Hoffman SM, Nelson DR, et Keeney DS (2001) Organization, structure and evolution of the CYP2 gene cluster on human chromosome 19. *Pharmacogenetics* **11**:687-698.

Horton TL et Pollack GM (1991) Enterohepatic recirculation and renal metabolism of morphine in the rat. *J. Pharm. Sci.* **80**:1147-1152.

Hruby VJ et Agnes RS (1999) Conformation-activity relationships of opioid peptides with selective activities at opioid receptors. *Biopolymers* **51**:391-410.

Hunt SP et Mantyh PW (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**:83-91.

Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmoller J, Halpert JR, Zanger UM, et Wojnowski L (2001) The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* **11**:773-779.

Iadarola MJ, Douglass J, Civelli O, et Naranjo JR (1988) Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. *Brain Res.* **455**:205-212.

Iber H, Chen Q, Cheng PY, et Morgan ET (2000) Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**:187-194.

Iber H, Chen Q, Sewer M, et Morgan ET (1997) Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 by glucocorticoids. *Arch.Biochem.Biophys.* **345**:305-310.

Iber H, Li-Masters T, Chen Q, Yu S, et Morgan ET (2001) Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 via cAMP: implications for down-regulation in diabetes, fasting, and inflammation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **297**:174-180.

Iber H, Sewer MB, Barclay TB, Mitchell SR, Li T, et Morgan ET (1999) Modulation of drug metabolism in infectious and inflammatory diseases. *Drug Metab Rev.* **31**:29-41.

Ingelman-Sundberg M (2001) Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat.Res.* **482**:11-19.

Ingelman-Sundberg M (2002) Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* **181-182**:447-452.

Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Oscarson M, et Nebert DW (2000) Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics* **10**:91-93.

Ingelman-Sundberg M et Oscarson M (2002) Human CYP allele database: submission criteria procedures and objectives. *Methods Enzymol.* **357**:28-36.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, et McLellan RA (1999) Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol.Sci.* **20**:342-349.

Inoue K, Yamazaki H, Imiya K, Akasaka S, Guengerich FP, et Shimada T (1997) Relationship between CYP2C9 and 2C19 genotypes and tolbutamide methyl

hydroxylation and S-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. *Pharmacogenetics* 7:103-113.

Inoue K, Yamazaki H, et Shimada T (2000) CYP2A6 genetic polymorphisms and liver microsomal coumarin and nicotine oxidation activities in Japanese and Caucasians. *Arch.Toxicol.* 73:532-539.

Ioannides C (1999) Effect of diet and nutrition on the expression of cytochromes P450. *Xenobiotica* 29:109-154.

Israili ZH et Dayton PG (2001) Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev.* 33:161-235.

Iwamoto K et Klaassen CD (1977) First-pass effect of morphine in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 200:236-244.

Jager W, Correia MA, Bornheim LM, Mahnke A, Hanstein WG, Xue L, et Benet LZ (1999) Ethynylestradiol-mediated induction of hepatic CYP3A9 in female rats: implication for cyclosporine metabolism. *Drug Metab Dispos.* 27:1505-1511.

Jansson I, Mole J, et Schenkman JB (1985) Purification and characterization of a new form (RLM2) of liver microsomal cytochrome P-450 from untreated rat. *J.Biol.Chem.* 260:7084-7093.

Jauregizar N, Calvo R, Suarez E, Quintana A, Raczka E, et Lukas JC (2001) Altered disposition and effect of lerisetron in rats with elevated alpha 1-acid glycoprotein levels. *Pharm.Res.* 18:838-845.

Jean A, Reiss A, Desrochers M, Dubois S, Trottier E, Trottier Y, Wirtanen L, Adesnik M, Waxman DJ, et Anderson A (1994) Rat liver cytochrome P450 2B3:

structure of the CYP2B3 gene and immunological identification of a constitutive P450 2B3-like protein in rat liver. *DNA Cell Biol.* **13**:781-792.

Jeppesen U, Gram LF, Vistisen K, Loft S, Poulsen HE, et Brosen K (1996) Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **51**:73-78.

Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, et Castell JV (2002) Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J.* **16**:1799-1801.

Judis J (1977) Binding of codeine, morphine, and methadone to human serum proteins. *J.Pharm.Sci.* **66**:802-806.

Julius D et Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**:203-210.

Jusko WJ et Gretch M (1976) Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics. *Drug Metab Rev.* **5**:43-140.

Kato R, Nakamura Y, et Chiesera E (1963) Enhanced phenobarbital induction of liver microsomal drug metabolizing enzyme in mice infected with murine hepatitis virus. *Biochem.Pharmacol.* **12**:365-370.

Katsura Y, Zhang X, Homma K, Rice KC, Calderon SN, Rothman RB, Yamamura HI, Davis P, Flippen-Anderson JL, Xu H, Becketts K, Foltz EJ, et Porreca F (1997) Probes for narcotic receptor-mediated phenomena. 25. Synthesis and evaluation of N-alkyl-substituted (α -piperazinylbenzyl)benzamides as novel, highly selective delta opioid receptor agonists. *J.Med.Chem.* **40**:2936-2947.

Kenworthy KE, Clarke SE, Andrews J, et Houston JB (2001) Multisite kinetic models for CYP3A4: simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism. *Drug Metab Dispos.* **29**:1644-1651.

Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, Klein SM, Kroetz DL, Gonzales FJ and Levy RH (1994) Human carbamazepine metabolism—role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11 epoxide formation. *Biochemical Pharmacology.* **47**: 1969-1979.

Khatsenko O (1998) Interactions between nitric oxide and cytochrome P-450 in the liver. *Biochemistry (Mosc.)* **63**:833-839.

Khatsenko O et Kikkawa Y (1997) Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **280**:1463-1470.

Khatsenko OG, Boobis AR, et Gross SS (1997) Evidence for nitric oxide participation in down-regulation of CYP2B1/2 gene expression at the pretranslational level. *Toxicol.Lett.* **90**:207-216.

Kidd BL et Urban LA (2001) Mechanisms of inflammatory pain. *Br.J.Anaesth.* **87**:3-11.

Kidd RS, Straughn AB, Meyer MC, Blaisdell J, Goldstein JA, et Dalton JT (1999) Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9*3 allele. *Pharmacogenetics* **9**:71-80.

Kieffer BL (1995) Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol.Neurobiol.* **15**:615-635.

Kieffer BL (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol.Sci.* **20**:19-26.

Kieffer BL et Gaveriaux-Ruff C (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog.Neurobiol.* **66**:285-306.

Kihara T, Toda A, Umesue I, Ono N, Shigematsu H, Soeda S, et Shimeno H (1998) Effect of interleukin 1 beta-induced fever on hepatic drug metabolism in rat. *Xenobiotica* **28**:559-569.

Kim MJ, Bertino JS, Jr., Gaedigk A, Zhang Y, Sellers EM, et Nafziger AN (2002) Effect of sex and menstrual cycle phase on cytochrome P450 2C19 activity with omeprazole used as a biomarker. *Clin.Pharmacol.Ther.* **72**:192-199.

King C, Finley B, et Franklin R (2000) The glucuronidation of morphine by dog liver microsomes: identification of morphine-6-O-glucuronide. *Drug Metab Dispos.* **28**:661-663.

Kinzig-Schippers M, Fuhr U, Zaigler M, Dammeyer J, Rusing G, Labedzki A, Bulitta J, et Sorgel F (1999) Interaction of pefloxacin and enoxacin with the human cytochrome P450 enzyme CYP1A2. *Clin.Pharmacol.Ther.* **65**:262-274.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, et Taga T (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**:1243-1254.

Kishimoto T, Taga T, et Akira S (1994) Cytokine signal transduction. *Cell* **76**:253-262.

Klutch A (1974) A chromatographic investigation of morphine metabolism in rats. Confirmation of N-demethylation of morphine and isolation of a new metabolite. *Drug Metab Dispos.* **2**:23-30.

Knapp RJ, Landsman R, Waite S, Malatynska E, Varga E, Haq W, Hruba VJ, Roeske WR, Nagase H, et Yamamura HI (1995) Properties of TAN-67, a

nonpeptidic delta-opioid receptor agonist, at cloned human delta- and mu-opioid receptors. *Eur.J.Pharmacol.* **291**:129-134.

Knowles RG (1996) Nitric oxide synthases. *Biochem.Soc.Trans.* **24**:875-878.

Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, et Chiba K (2002) Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem.Pharmacol.* **63**:889-896.

Kokwaro GO, Glazier AP, Ward SA, Breckenridge AM, et Edwards G (1993) Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on phenacetin O-deethylation by rat liver microsomes. *Biochem.Pharmacol.* **45**:1235-1241.

Kolesnick R et Golde DW (1994) The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* **77**:325-328.

Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, Gonzalez FJ, et Tracy TS (1998) Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry* **37**:4137-4147.

Koymans L, Donne-Op den Kelder GM, Koppele Te JM, et Vermeulen NP (1993) Cytochromes P450: their active-site structure and mechanism of oxidation. *Drug Metab Rev.* **25**:325-387.

Krusekopf S, Roots I, Hildebrandt AG, et Kleeberg U (2003a) Time-dependent transcriptional induction of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 mRNAs by H(+)/K(+)-ATPase inhibitors and other xenobiotics. *Xenobiotica* **33**:107-118.

Krusekopf S, Roots I, et Kleeberg U (2003b) Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *Eur.J.Pharmacol.* **466**:7-12.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, et Schuetz E (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat.Genet.* **27**:383-391.

Kulmatycki KM et Jamali F (2001) Therapeutic relevance of altered cytokine expression. *Cytokine* **14**:1-10.

Kuo CK, Hanioka N, Hoshikawa Y, Oguri K, et Yoshimura H (1991) Species difference of site-selective glucuronidation of morphine. *J.Pharmacobiodyn.* **14**:187-193.

Laethem ME, Belpaire FM, Wijnant P, Rosseel MT, et Bogaert MG (1994) Influence of endotoxin on the stereoselective pharmacokinetics of oxprenolol, propranolol, and verapamil in the rat. *Chirality* **6**:405-410.

Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, et Thummel KE (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv.Drug Deliv.Rev.* **54**:1271-1294.

Lampe JW, King IB, Li S, Grate MT, Barale KV, Chen C, Feng Z, et Potter JD (2000) Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis* **21**:1157-1162.

Lasagna L et Kornfeld TJ (1958) Analgesic potency of normorphine in patients with postoperative pain. *J.Pharmacol* **124**:260-263.

Le J et Vilcek J (1987) Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* **56**:234-248.

Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, et Pichette V (2001) Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**:326-332.

Lee CR, Goldstein JA, et Pieper JA (2002) Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* **12**:251-263.

Leow KP, Wright AW, Cramond T, et Smith MT (1993) Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. *Ther.Drug Monit.* **15**:440-447.

Levy RH (1994) Human carbamazepine metabolism—role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11 epoxide formation. *Biochemical Pharmacology.* **47**: 1969-1979.

Lewis DF (2000) On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics: towards the prediction of human p450 substrate specificity and metabolism. *Biochem.Pharmacol.* **60**:293-306.

Lewis DF (2002) Molecular modeling of human cytochrome P450-substrate interactions. *Drug Metab Rev.* **34**:55-67.

Lewis DF (2003) Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes. *Arch.Biochem.Biophys.* **409**:32-44.

Lewis DF, Dickins M, Lake BG, Eddershaw PJ, Tarbit MH, et Goldfarb PS (1999a) Molecular modelling of the human cytochrome P450 isoform CYP2A6 and investigations of CYP2A substrate selectivity. *Toxicology* **133**:1-33.

Lewis DF, Lake BG, Dickins M, Eddershaw PJ, Tarbit MH, et Goldfarb PS (1999b) Molecular modelling of CYP2B6, the human CYP2B isoform, by homology with the substrate-bound CYP102 crystal structure: evaluation of CYP2B6 substrate characteristics, the cytochrome b5 binding site and comparisons with CYP2B1 and CYP2B4. *Xenobiotica* **29**:361-393.

Lewis DF, Lake BG, George SG, Dickins M, Eddershaw PJ, Tarbit MH, Beresford AP, Goldfarb PS, et Guengerich FP (1999c) Molecular modelling of CYP1 family enzymes CYP1A1, CYP1A2, CYP1A6 and CYP1B1 based on sequence homology with CYP102. *Toxicology* **139**:53-79.

Lewis DF, Modi S, et Dickins M (2002) Structure-activity relationship for human cytochrome P450 substrates and inhibitors. *Drug Metab Rev.* **34**:69-82.

Lewis DF et Pratt JM (1998) The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab Rev.* **30**:739-786.

Lewis DF, Watson E, et Lake BG (1998a) Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat.Res.* **410**:245-270.

Lewis EJ, Bishop J, et Aspinall SJ (1998b) A simple inflammation model that distinguishes between the actions of anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs. *Inflamm.Res.* **47**:26-35.

Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Ridderstrom M, et Masimirembwa CM (2002) Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **300**:399-407.

Li-Masters T et Morgan ET (2002) Down-regulation of phenobarbital-induced cytochrome P4502B mRNAs and proteins by endotoxin in mice: independence from

nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Biochem.Pharmacol.* **64**:1703-1711.

Liaudet L, Soriano FG, et Szabo C (2000) Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med.* **28**:N37-N52.

Lin JH et Lu AY (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin.Pharmacokinet.* **35**:361-390.

Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, Schuetz EG, et Thummel KE (2002) Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol.Pharmacol.* **62**:162-172.

Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Belghiti J, Houssin D, Ballet F, Feldmann G, Guengerich FP, et Pessayre D (1993) Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology* **104**:203-216.

Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Feldmann G, Larrey D, et Pessayre D (1990) Presence of functional cytochrome P-450 on isolated rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology* **11**:850-858.

Loeser JD et Melzack R (1999) Pain: an overview. *Lancet* **353**:1607-1609.

Luheshi GN, Stefferl A, Turnbull AV, Dascombe MJ, Brouwer S, Hopkins SJ, et Rothwell NJ (1997) Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat. *Am.J.Physiol* **272**:R862-R868.

Ma Q (2001) Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr.Drug Metab* **2**:149-164.

MacKichan JJ (1984) Pharmacokinetic consequences of drug displacement from blood and tissue proteins. *Clin.Pharmacokinet.* **9 Suppl 1**:32-41.

MacMicking J, Xie QW, et Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu.Rev.Immunol.* **15**:323-350.

Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, Stoltz CA, Kliewer SA, Lambert MH, Willson TM, et Moore JT (2003) Identification of a novel human CAR agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J.Biol.Chem.*

Mansour A, Fox CA, Akil H et Watson SJ Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* **18**, 22-29.

March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR et Grabstein K (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* **315**:641-647.

Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, et Broly F (1997) Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* **7**:193-202.

Masimirembwa CM, Thompson R, Andersson TB (2001) In vitro high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* **4**:245-63.

Matsumoto T, Emi Y, Kawabata S, et Omura T (1986) Purification and characterization of three male-specific and one female-specific forms of cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *J.Biochem.(Tokyo)* **100**:1359-1371.

Matsunaga E, Umeno M, et Gonzalez FJ (1990) The rat P450 IID subfamily: complete sequences of four closely linked genes and evidence that gene conversions maintained sequence homogeneity at the heme-binding region of the cytochrome P450 active site. *J.Mol.Evol.* **30**:155-169.

Matsunaga E, Zanger UM, Hardwick JP, Gelboin HV, Meyer UA, et Gonzalez FJ (1989) The CYP2D gene subfamily: analysis of the molecular basis of the debrisoquine 4-hydroxylase deficiency in DA rats. *Biochemistry* **28**:7349-7355.

Matsushima H, Watanabe T, et Higuchi S (2000) Effect of alpha(1)-acid glycoprotein on the pharmacokinetics of tamsulosin in rats treated with turpentine oil. *J.Pharm.Sci.* **89**:490-498.

Mayo PR, Skeith K, Russell AS, et Jamali F (2000) Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **50**:605-613.

Mazoit JX, Sandouk P, Zetlaoui P, et Scherrmann JM (1987) Pharmacokinetics of unchanged morphine in normal and cirrhotic subjects. *Anesth.Analg.* **66**:293-298.

McCarthy L, Wetzel M, Sliker JK, Eisenstein TK, et Rogers TJ (2001) Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend.* **62**:111-123.

Melzack R et Wall PD (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science* **150**:971-979.

Meyer UA et Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **37**:269-296.

Millan MJ, Czlonkowski A, Morris B, Stein C, Arendt R, Huber A, Holtt V, et Herz A (1988) Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain* **35**:299-312.

Milne RW, Nation RL, et Somogyi AA (1996) The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metab Rev.* **28**:345-472.

Milne RW, Nation RL, Somogyi AA, Bochner F, et Griggs WM (1992) The influence of renal function on the renal clearance of morphine and its glucuronide metabolites in intensive-care patients. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **34**:53-59.

Mimura M, Baba T, Yamazaki H, Ohmori S, Inui Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, et Shimada T (1993) Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **21**:1048-1056.

Mistry M et Houston JB (1987) Glucuronidation in vitro and in vivo. Comparison of intestinal and hepatic conjugation of morphine, naloxone, and buprenorphine. *Drug Metab Dispos.* **15**:710-717.

Mostafavi SA and Foster RT (2003) Influence of cimetidine co-administration on the pharmacokinetics of acebutolol enantiomers and its metabolite diacetolol in a rat model: the effect of gastric pH on double-peak phenomena. *Int J Pharm.* **255** :81-6.

Monier S, Van Luc P, Kreibich G, Sabatini DD, et Adesnik M (1988) Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J.Cell Biol.* **107**:457-470.

Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM, Pijpers A, Verheijden JH, et van Miert AS (1995a) Selective effects of a bacterial infection (*Actinobacillus*

pleuropneumoniae) on the hepatic clearances of caffeine, antipyrine, paracetamol, and indocyanine green in the pig. *Xenobiotica* 25:491-499.

Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM, van Leengoed LA, Verheijden JH, et van Miert AS (1995b) Infection (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)-mediated suppression of oxidative hepatic drug metabolism and cytochrome P4503A mRNA levels in pigs. *Drug Metab Dispos.* 23:44-47.

Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM, van Leengoed LA, Vernooy HC, Verheijden JH, et van Miert AS (1996a) A lipopolysaccharide-induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J.Vet.Pharmacol.Ther.* 19:382-388.

Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM, Van Amsterdam JG, et van Miert AS (1996b) Suppression of cytochrome. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 137:237-244.

Moochhala S et Renton KW (1991) The effect of IFN-alpha-Con1 on hepatic cytochrome P-450 and protein synthesis and degradation in hepatic microsomes. *Int.J.Immunopharmacol.* 13:903-912.

Moore JT et Kliewer SA (2000) Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. *Toxicology* 153:1-10.

Moore JT, Moore LB, Maglich JM, et Kliewer SA (2003) Functional and structural comparison of PXR and CAR. *Biochim.Biophys.Acta* 1619:235-238.

Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Willson TM, Collins JL, et Kliewer SA (2000) Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J.Biol.Chem.* 275:15122-15127.

Morel Y et Barouki R (1998) Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J.Biol.Chem.* **273**:26969-26976.

Morgan ET (1989) Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin. *Mol.Pharmacol.* **36**:699-707.

Morgan ET (1991) Suppression of P450IIC12 gene expression and elevation of actin messenger ribonucleic acid levels in the livers of female rats after injection of the interferon inducer poly rI.poly rC. *Biochem.Pharmacol.* **42**:51-57.

Morgan ET (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev.* **29**:1129-1188.

Morgan ET (2001) Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos.* **29**:207-212.

Morgan ET, Li-Masters T, et Cheng PY (2002) Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology* **181-182**:207-210.

Morgan ET, MacGeoch C, et Gustafsson JA (1985) Sexual differentiation of cytochrome P-450 in rat liver. Evidence for a constitutive isozyme as the male-specific 16 alpha-hydroxylase. *Mol.Pharmacol.* **27**:471-479.

Morgan ET, Nikolova-Karakashian M, Chen JQ, et Merrill AH, Jr. (1996) Sphingolipid-dependent signaling in regulation of cytochrome P450 expression. *Methods Enzymol.* **272**:381-388.

Morgan ET, Sewer MB, Iber H, Gonzalez FJ, Lee YH, Tukey RH, Okino S, Vu T, Chen YH, Sidhu JS, et Omiecinski CJ (1998) Physiological and

pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* **26**:1232-1240.

Morgan ET, Thomas KB, Swanson R, Vales T, Hwang J, et Wright K (1994) Selective suppression of cytochrome P-450 gene expression by interleukins 1 and 6 in rat liver. *Biochim.Biophys.Acta* **1219**:475-483.

Moshage H (1997) Cytokines and the hepatic acute phase response. *J.Pathol.* **181**:257-266.

Mummaneni V and Dressman JB (1994) Intestinal uptake of cimetidine and ranitidine in rats. *Pharm Res.* **11**:1599-604.

Muntane J, Longo V, Mitjavila MT, Gervasi PG, et Ingelman-Sundberg M (1995) Effect of carrageenan-induced granuloma on hepatic cytochrome P-450 isozymes in rats. *Inflammation* **19**:143-156.

Muntane-Relat J, Ourlin JC, Domergue J, et Maurel P (1995) Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* **22**:1143-1153.

Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, et Burke MD (2001) Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **41**:297-316.

Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, et Melvin WT (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* **57**:3026-3031.

Murthy BR, Pollack GM, et Brouwer KL (2002) Contribution of morphine-6-glucuronide to antinociception following intravenous administration of morphine to healthy volunteers. *J.Clin.Pharmacol.* **42**:569-576.

Myasoedova KN (2000) Cytochrome P450 1A2: oligomers in proteoliposomes. *Biochemistry (Mosc.)* **65**:186-191.

Myasoedova KN et Magretova NN (2001) Cross-Linking study of cytochrome P450 1A2 in proteoliposomes. *Biosci.Rep.* **21**:63-72.

Myasoedova KN et Tsuprun VL (1993) Cytochrome P-450: hexameric structure of the purified LM4 form. *FEBS Lett.* **325**:251-254.

Nadin L, Butler AM, Farrell GC, et Murray M (1995) Pretranslational down-regulation of cytochromes P450 2C11 and 3A2 in male rat liver by tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology* **109**:198-205.

Nagata K, Matsunaga T, Gillette J, Gelboin HV, et Gonzalez FJ (1987) Rat testosterone 7 alpha-hydroxylase. Isolation, sequence, and expression of cDNA and its developmental regulation and induction by 3-methylcholanthrene. *J.Biol.Chem.* **262**:2787-2793.

Nebert DW et Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**:1155-1162.

Nebert DW et Weber WW (1990) Pharmacogenetics, in *Principles of drug action: The basis of pharmacology* (Pratt WB et Taylor P éditeurs) pp 469-532, Churchill Livingstone, Philadelphia.

Nedelcheva V et Gut I (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**:1151-1175.

Negri L, Broccardo M, Lattanzi R et Melchiorri P (1999) Effects of antisense oligonucleotides on brain delta-opioid receptor density and on SNC80-induced locomotor stimulation and colonic transit inhibition in rats. *Br J Pharmacol.* **128**:1554-60.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, et Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**:1-42.

Newton DJ, Wang RW, et Lu AY (1995) Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitrometabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **23**:154-158.

Niemi M, Cascorbi I, Timm R, Kroemer HK, Neuvonen PJ, et Kivisto KT (2002) Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different CYP2C9 genotypes. *Clin.Pharmacol.Ther.* **72**:326-332.

Obach RS (1999) Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos.* **27**:1350-1359.

Oesch-Bartlomowicz B and Oesch F (2003) Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch. *Arch Biochem Biophys.* **409**:228-234.

Ogiso T, Kasutani M, Tanaka H, Iwaki M and Tanino T (2001) Pharmacokinetics of epinastine and a possible mechanism for double peaks in oral plasma concentration profiles. *Biol Pharm Bull.* **24**:790-4.

Oguri K, Ida S, Yoshimura H, et Tsukamoto H (1970) Metabolism of drugs. LXIX. Studies on the urinary metabolites of morphine in several mammalian species. *Chem.Pharm.Bull.* **18**:2414-2419.

Oinonen T et Lindros KO (1998) Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem.J.* **329** (Pt 1):17-35.

Oldenburg HS, Pruitt JH, Lazarus DD, Rogy MA, Chizzonite R, Lowry SF, et Moldawer LL (1995) Interleukin 1 binding to its type I, but not type II receptor, modulates the in vivo acute phase response. *Cytokine* **7**:510-516.

Olsen GD (1975) Morphine binding to human plasma proteins. *Clin.Pharmacol.Ther.* **17**:31-35.

Omura T et Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J.Biol.Chem.* **239**:2370-2378.

Ong CE, Coulter S, Birkett DJ, Bhasker CR, et Miners JO (2000) The xenobiotic inhibitor profile of cytochrome P4502C8. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **50**:573-580.

Ortiz de Montellano PR (1999) Cytochrome P450 oxidative system, in *Handbook of drug metabolism* (Woolf TF éditeur) pp 110-130, Marcel-Dekker, New York.

Ortiz de Montellano PR et De Voss JJ (2002) Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Nat.Prod.Rep.* **19**:477-493.

Osawa Y, Davila JC, Nakatsuka M, Meyer CA, et Darbyshire JF (1995) Inhibition of P450 cytochromes by reactive intermediates. *Drug Metab Rev.* **27**:61-72.

Osborne R, Joel S, Trew D, et Slevin M (1990) Morphine and metabolite behavior after different routes of morphine administration: demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin.Pharmacol.Ther.* **47**:12-19.

Ouellet DM et Pollack GM (1995) Biliary excretion and enterohepatic recirculation of morphine-3-glucuronide in rats. *Drug Metab Dispos.* **23**:478-484.

Palmer AM (2003) New horizons in drug metabolism, pharmacokinetics and drug discovery. *Drug News Perspect.* **16**:57-62.

Parent C, Belanger PM, Jutras L, et Du Souich P (1992) Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P-450 isoenzymes: alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **261**:780-787.

Parkinson A (1996) Biotransformation of xenobiotics, in *Casarett and Doull's Toxicology. The Basic of Science of Poisons.* (Klaassen CD éditeur) pp 113-186, McGraw-Hill, New York.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, et Vilarem MJ (2003) The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim.Biophys.Acta* **1619**:243-253.

Patwardhan RV, Johnson RF, Hoyumpa A, Jr., Sheehan JJ, Desmond PV, Wilkinson GR, Branch RA, et Schenker S (1981) Normal metabolism of morphine in cirrhosis. *Gastroenterology* **81**:1006-1011.

Peckys D et Landwehrmeyer GB (1999) Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* **88**:1093-1135.

Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, et Raunio H (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **28**:1203-1253.

Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, et Pasanen M (2000) CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* **144**:139-147.

Penson RT, Joel SP, Bakhshi K, Clark SJ, Langford RM, et Slevin ML (2000) Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides. *Clin.Pharmacol.Ther.* **68**:667-676.

Penson RT, Joel SP, Clark S, Gloyne A, et Slevin ML (2001) Limited phase I study of morphine-3-glucuronide. *J.Pharm.Sci.* **90**:1810-1816.

Pepin MC, Yue SY, Roberts E, Wahlestedt C, et Walker P (1997) Novel "restoration of function" mutagenesis strategy to identify amino acids of the delta-opioid receptor involved in ligand binding. *J.Biol.Chem.* **272**:9260-9267.

Peterson JA et Graham SE (1998) A close family resemblance: the importance of structure in understanding cytochromes P450. *Structure.* **6**:1079-1085.

Peterson JA, Sevrioukova I, Truan G, et Graham-Lorence SE (1997) P450BM-3; a tale of two domains--or is it three? *Steroids* **62**:117-123.

Piafsky KM, Borga O, Odar-Cederlof I, Johansson C, et Sjoqvist F (1978) Increased plasma protein binding of propranolol and chlorpromazine mediated by disease-induced elevations of plasma alpha1 acid glycoprotein. *N.Engl.J.Med.* **299**:1435-1439.

Piquette-Miller M et Jamali F (1993) Selective effect of adjuvant arthritis on the disposition of propranolol enantiomers in rats detected using a stereospecific HPLC assay. *Pharm.Res.* **10**:294-299.

Piros ET, Hales TG, et Evans CJ (1996) Functional analysis of cloned opioid receptors in transfected cell lines. *Neurochem.Res.* **21**:1277-1285.

Plobeck N, Delorme D, Wei ZY, Yang H, Zhou F, Schwarz P, Gawell L, Gagnon H, Pelcman B, Schmidt R, Yue SY, Walpole C, Brown W, Zhou E, Labarre M, Payza K, St Onge S, Kamassah A, Morin PE, Projean D, Ducharme J, et Roberts E (2000) New diarylmethylpiperazines as potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonists with increased In vitro metabolic stability. *J.Med.Chem.* **43**:3878-3894.

Pollock SH, Matthews HW, et D'Souza MJ (1989) Pharmacokinetic analysis of cyclosporine in adjuvant arthritic rats. *Drug Metab Dispos.* **17**:595-599.

Portoghese PS (1991) An approach to the design of receptor-type-selective non-peptide antagonists of peptidergic receptors: delta opioid antagonists. *J.Med.Chem.* **34**:1757-1762.

Portoghese PS, Sultana M, et Takemori AE (1990) Design of peptidomimetic delta opioid receptor antagonists using the message-address concept. *J.Med.Chem.* **33**:1714-1720.

Poulos TL (1995) Cytochrome P450. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **5**:767-774.

Poulos TL, Finzel BC, et Howard AJ (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J.Mol.Biol.* **195**:687-700.

Pous C, Giroud JP, Damais C, Raichvarg D, et Chauvelot-Moachon L (1990) Effect of recombinant human interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha on liver cytochrome P-450 and serum alpha-1-acid glycoprotein concentrations in the rat. *Drug Metab Dispos.* **18**:467-470.

Poyhia R, Olkkola KT, Seppala T, et Kalso E (1991) The pharmacokinetics of oxycodone after intravenous injection in adults. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **32**:516-518.

Prentis RA, Lis Y, Walker SR (1988) Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *Br J Clin Pharmacol.* **25**:387-96.

Projean D, Baune B, Farinotti R, Flinois JP, Baune P, Taburet AM, et Ducharme J (2003) In vitro metabolism of chloroquine: identification of CYP2C8, CYP3A4 and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylation of chloroquine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*

Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, Slate CA, Ehlert FJ, Roeske WR, et Yamamura HI (1999) The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol.Rev.* **51**:503-532.

Quock RM, Hosohata Y, Knapp RJ, Burkey TH, Hosohata K, Zhang X, Rice KC, Nagase H, Hrubby VJ, Porreca F, Roeske WR, et Yamamura HI (1997) Relative efficacies of delta-opioid receptor agonists at the cloned human delta-opioid receptor. *Eur.J.Pharmacol.* **326**:101-104.

Raaska K et Neuvonen PJ (2000) Ciprofloxacin increases serum clozapine and N-desmethylclozapine: a study in patients with schizophrenia. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* **56**:585-589.

Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, et Flockhart DA (2001) Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **299**:849-857.

Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, et Vaught JL (1992) Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **260**:275-285.

Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, et Harris JW (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res.* **54**:5543-5546.

Ramadori G et Christ B (1999) Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Semin.Liver Dis.* **19**:141-155.

Rane A, Gawronska-Szklarz B, et Svensson JO (1985) Natural (-)- and unnatural (+)-enantiomers of morphine: comparative metabolism and effect of morphine and phenobarbital treatment. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **234**:761-765.

Raunio H, Rautio A, Gullsten H, et Pelkonen O (2001) Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **52**:357-363.

Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* **34**:83-448.

Rendic S et Di Carlo FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* **29**:413-580.

Renton KW (2001) Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol.Ther.* **92**:147-163.

Renton KW et Mannering GJ (1976) Depression of hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems with administered interferon inducing agents. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **73**:343-348.

Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, et Korzekwa KR (1994) Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* **4**:39-42.

Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, et Morgan DJ (1999) Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol.Ther.* **84**:429-445.

Roberts ES, Lin H, Crowley JR, Vuletich JL, Osawa Y, et Hollenberg PF (1998) Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1. *Chem.Res.Toxicol.* **11**:1067-1074.

Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, et Weiss M (2002) Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin.Pharmacokinet.* **41**:751-790.

Roberts SA (2003) Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **6**:66-80.

Robertson GR, Farrell GC, et Liddle C (1998) Sexually dimorphic expression of rat CYP3A9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **242**:57-60.

Robin MA, Descatoire V, Le Roy M, Berson A, Lebreton FP, Maratrat M, Ballet F, Loeper J, et Pessayre D (2000) Vesicular transport of newly synthesized

cytochromes P4501A to the outside of rat hepatocyte plasma membranes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **294**:1063-1069.

Rockich K et Blouin R (1999) Effect of the acute-phase response on the pharmacokinetics of chlorzoxazone and cytochrome P-450 2E1 in vitro activity in rats. *Drug Metab Dispos.* **27**:1074-1077.

Rodrigues AD (1999) Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem.Pharmacol.* **57**:465-480.

Roe AL, Poloyac SM, Howard G, Shedlofsky SI, et Blouin RA (2001) The effect of endotoxin on hepatocyte nuclear factor 1 nuclear protein binding: potential implications on CYP2E1 expression in the rat. *J.Pharm.Pharmacol.* **53**:1365-1371.

Ronis MJ et Ingelman-Sundberg M (1999) Induction in human drug metabolizing enzymes: mechanism and implications, in *Handbook of drug metabolism* (Woolf TF éditeur) pp 239-262, Marcel Dekker, New York.

Rost KL, Brosicke H, Heinemeyer G, et Roots I (1994) Specific and dose-dependent enzyme induction by omeprazole in human beings. *Hepatology* **20**:1204-1212.

Roussel F, Khan KK, et Halpert JR (2000) The importance of SRS-1 residues in catalytic specificity of human cytochrome P450 3A4. *Arch.Biochem.Biophys.* **374**:269-278.

Rush GF, Newton JF, et Hook JB (1983) Sex differences in the excretion of glucuronide conjugates: the role of intrarenal glucuronidation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **227**:658-662.

Sahi J, Black CB, Hamilton GA, Zheng X, Jolley S, Rose KA, Gilbert D, LeCluyse EL, et Sinz MW (2003) Comparative Effects of Thiazolidinediones on in Vitro P450 Enzyme Induction and Inhibition. *Drug Metab Dispos.* **31**:439-446.

Salmon M et Emery P (1991) The immune response 1. The local response and understanding T cell specificity. *Br.J.Hosp.Med.* **45**:89-93.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, and Woolf CJ (2001) Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* **410**:471-475.

Sanchez-Blazquez P, Gomez-Serranillos P, et Garzon J (2001) Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia. *Brain Res.Bull.* **54**:229-235.

Satoh M et Minami M (1995) Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol.Ther.* **68**:343-364.

Sawe J (1986) High-dose morphine and methadone in cancer patients. Clinical pharmacokinetic considerations of oral treatment. *Clin.Pharmacokinet.* **11**:87-106.

Sawe J, Dahlstrom B, Paalzow L, et Rane A (1981) Morphine kinetics in cancer patients. *Clin.Pharmacol.Ther.* **30**:629-635.

Sawe J, Svensson JO, et Odar-Cederlof I (1985) Kinetics of morphine in patients with renal failure. *Lancet* **2**:211.

Schaible HG, Ebersberger A, et Von Banchet GS (2002) Mechanisms of pain in arthritis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **966**:343-354.

Schaible HG et Grubb BD (1993) Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* **55**:5-54.

Schenkman JB et Jansson I (1999) Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5. *Drug Metab Rev.* **31**:351-364.

Schenkman JB et Jansson I (2003) The many roles of cytochrome b(5). *Pharmacol.Ther.* **97**:139-152.

Schetz JA, Calderon SN, Bertha CM, Rice K, et Porreca F (1996) Rapid in vivo metabolism of a methylether derivative of (+/-)-BW373U86: the metabolic fate of [3H]SNC121 in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **279**:1069-1076.

Schiller PW (1991) Development of receptor-specific opioid peptide analogues. *Prog.Med.Chem.* **28**:301-340.

Schiller PW, Nguyen TM, Weltrowska G, Chung NN, Lemieux C, Marsden BJ, et Wilkes BC (1993) The use of conformational restriction and molecular modeling techniques in the development of receptor-specific opioid peptide agonists and antagonists. *NIDA Res.Monogr* **134**:238-252.

Schneider RE et Bishop H (1982) beta-blocker plasma concentrations and inflammatory disease: clinical implications. *Clin.Pharmacokinet.* **7**:281-284.

Schneider RE, Bishop H, Kendall MJ, et Quarterman CP (1981) Effect of inflammatory disease on plasma concentrations of three beta-adrenoceptor blocking agents. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol.* **19**:158-162.

Scholz J et Woolf CJ (2002) Can we conquer pain? *Nat.Neurosci.* **5 Suppl**:1062-1067.

Schuetz JD, Kauma S, et Guzelian PS (1993) Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J.Clin.Invest* **92**:1018-1024.

Schumann RR et Zweigner J (1999) A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP). *Clin.Chem.Lab Med.* **37**:271-274.

Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl ML, Gusella M, et Padrini R (2002) Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin.Pharmacol.Ther.* **72**:702-710.

Segel IH (1975) Kinetics of unireactant enzymes, in *Enzyme Kinetics* (Segel IH éditeur) pp 18-99, John Wiley and Sons, New York.

Sellers EM, Kaplan HL, et Tyndale RF (2000) Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin.Pharmacol.Ther.* **68**:35-43.

Sevrioukova IF, Li H, Zhang H, Peterson JA, et Poulos TL (1999) Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:1863-1868.

Sevrioukova IF et Peterson JA (1995) NADPH-P-450 reductase: structural and functional comparisons of the eukaryotic and prokaryotic isoforms. *Biochimie* **77**:562-572.

Sewer MB, Barclay TB, et Morgan ET (1998) Down-regulation of cytochrome P450 mRNAs and proteins in mice lacking a functional NOS2 gene. *Mol.Pharmacol.* **54**:273-279.

Sewer MB, Koop DR, et Morgan ET (1996) Endotoxemia in rats is associated with induction of the P4504A subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* **24**:401-407.

Sewer MB, Koop DR, et Morgan ET (1997) Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **280**:1445-1454.

Sewer MB et Morgan ET (1997) Nitric oxide-independent suppression of P450 2C11 expression by interleukin-1beta and endotoxin in primary rat hepatocytes. *Biochem.Pharmacol.* **54**:729-737.

Sewer MB et Morgan ET (1998) Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450S by endotoxin in vivo occurs independently of nitric oxide production. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **287**:352-358.

Shahbazian A, Heinemann A, Schmidhammer H, Beubler E, Holzer-Petsche U, Holzer P (2002) Involvement of mu- and kappa-, but not delta-, opioid receptors in the peristaltic motor depression caused by endogenous and exogenous opioids in the guinea-pig intestine. *Br J Pharmacol.* **135**:741-50.

Shedlofsky SI, Israel BC, McClain CJ, Hill DB, et Blouin RA (1994) Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J.Clin.Invest* **94**:2209-2214.

Shedlofsky SI, Israel BC, Tosheva R, et Blouin RA (1997) Endotoxin depresses hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism in women. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **43**:627-632.

Shen DD, Kunze KL, et Thummel KE (1997) Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **27**:99-127.

Shih H, Pickwell GV, Guenette DK, Bilir B, et Quattrochi LC (1999) Species differences in hepatocyte induction of CYP1A1 and CYP1A2 by omeprazole. *Hum. Exp. Toxicol.* **18**:95-105.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, et Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**:414-423.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Wakamiya N, Ueng YF, Guengerich FP, et Inui Y (1996) Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metab Dispos.* **24**:515-522.

Shon JH, Yoon YR, Kim KA, Lim YC, Lee KJ, Park JY, Cha IJ, Flockhart DA, et Shin JG (2002) Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genetic polymorphisms on the disposition of and blood glucose lowering response to tolbutamide in humans. *Pharmacogenetics* **12**:111-119.

Siewert E, Bort R, Kluge R, Heinrich PC, Castell J, et Jover R (2000) Hepatic cytochrome P450 down-regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. *Hepatology* **32**:49-55.

Silverman RB (1992) Drug discovery, design and development, in *The organic chemistry of drug design and action* (Silverman RB éditeur) Academic Press, San Diego.

Sim LJ et Childers SR (1997) Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [35S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in guinea pig brain. *J.Comp Neurol.* **386**:562-572.

Singh S et Evans TW (1997) Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur.Respir.J.* **10**:699-707.

Smith DA, Abel SM, Hyland R, et Jones BC (1998) Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica* **28**:1095-1128.

Snider WD et McMahon SB (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* **20**:629-632.

Sonderfan AJ, Arlotto MP, Dutton DR, McMillen SK, et Parkinson A (1987) Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Arch.Biochem.Biophys.* **255**:27-41.

Stadler J, Trockfeld J, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, et Doehmer J (1994) Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:3559-3563.

Stain F, Barjavel MJ, Sandouk P, Plotkine M, Scherrmann JM, et Bhargava HN (1995) Analgesic response and plasma and brain extracellular fluid pharmacokinetics of morphine and morphine-6-beta-D-glucuronide in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **274**:852-857.

Stein C (2003) Opioid receptors on peripheral sensory neurons. *Adv.Exp.Med.Biol.* **521**:69-76.

Stein C, Machelska H, Binder W, et Schafer M (2001) Peripheral opioid analgesia. *Curr.Opin.Pharmacol.* **1**:62-65.

Stoilov I, Jansson I, Sarfarazi M, et Schenkman JB (2001) Roles of cytochrome p450 in development. *Drug Metabol. Drug Interact.* **18**:33-55.

Stuehr DJ et Griffith OW (1992) Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* **65**:287-346.

Su T, Bao Z, Zhang QY, Smith TJ, Hong JY, et Ding X (2000) Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.* **60**:5074-5079.

Sullivan AF, McQuay HJ, Bailey D, et Dickenson AH (1989) The spinal antinociceptive actions of morphine metabolites morphine-6-glucuronide and normorphine in the rat. *Brain Res.* **482**:219-224.

Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, et Goldstein JA (1996) The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* **6**:341-349.

Suzuki H, Kneller MB, Haining RL, Trager WF, et Rettie AE (2002) (+)-N-3-Benzyl-nirvanol and (-)-N-3-benzyl-phenobarbital: new potent and selective in vitro inhibitors of CYP2C19. *Drug Metab Dispos.* **30**:235-239.

Suzuki T, Nishio K, et Tanabe S (2001) The MRP family and anticancer drug metabolism. *Curr. Drug Metab* **2**:367-377.

Szczesna-Skorupa E, Chen CD, et Kemper B (2000) Cytochromes P450 2C1/2 and P450 2E1 are retained in the endoplasmic reticulum membrane by different mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **374**:128-136.

Szczesna-Skorupa E et Kemper B (2000) Endoplasmic reticulum retention determinants in the transmembrane and linker domains of cytochrome P450 2C1. *J.Biol.Chem.* **275**:19409-19415.

Szekanecz Z, Halloran MM, Volin MV, Woods JM, Strieter RM, Kenneth HG, III, Kunkel SL, Burdick MD, et Koch AE (2000) Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**:1266-1277.

Taioli E, Gaspari L, Benhamou S, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper M, Dolzan V, Haugen A, Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Kalina I, Kremers P, Le Marchand L, London S, Rannug A, Romkes M, Schoket B, Seidegard J, Strange RC, Stucker I, To-Figueras J, et Garte S (2003) Polymorphisms in CYP1A1, GSTARM827, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. *Int.J.Epidemiol.* **32**:60-63.

Tanaka E, Terada M, et Misawa S (2000) Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J.Clin.Pharm.Ther.* **25**:165-175.

Tang W et Stearns RA (2001) Heterotropic cooperativity of cytochrome P450 3A4 and potential drug-drug interactions. *Curr.Drug Metab* **2**:185-198.

Tateishi T, Watanabe M, Moriya H, Yamaguchi S, Sato T, et Kobayashi S (1999) No ethnic difference between Caucasian and Japanese hepatic samples in the expression frequency of CYP3A5 and CYP3A7 proteins. *Biochem.Pharmacol.* **57**:935-939.

Thummel KE et Wilkinson GR (1998) In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **38**:389-430.

Tinel M, Elkahwaji J, Robin MA, Fardel N, Descatoire V, Haouzi D, Berson A, et Pessayre D (1999) Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **289**:649-655.

Toda A, Ishii N, Kihara T, Nagamatsu A, et Shimeno H (1994) Effect of adjuvant-induced arthritis on hepatic drug metabolism in rats. *Xenobiotica* **24**:603-611.

Tracy TS, Korzekwa KR, Gonzalez FJ et Wainer IW (1999) Cytochrome P450 enzymes involved metabolism of the enantiomers of verapamil and norverapamil. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **58**: 1201-1208.

Tsuprun VL, Myasoedova KN, Berndt P, Sograff ON, Orlova EV, Chernyak VY, Archakov AI, et Skulachev VP (1986) Quaternary structure of the liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett.* **205**:35-40.

Tyndale RF, Li Y, Li NY, Messina E, Miksys S, et Sellers EM (1999a) Characterization of cytochrome P-450 2D1 activity in rat brain: high-affinity kinetics for dextromethorphan. *Drug Metab Dispos.* **27**:924-930.

Tyndale RF, Pianezza ML, et Sellers EM (1999b) A common genetic defect in nicotine metabolism decreases risk for dependence and lowers cigarette consumption. *Nicotine.Tob.Res.* **1 Suppl 2**:S63-S67.

Uhl K, Grace JM, Kocisko DA, Jennings BT, Mitchell AL, et Brewer TG (1999) Effects of Plasmodium berghei infection on cytochromes P-450 2E1 and 3A2. *Eur.J.Drug Metab Pharmacokinet.* **24**:169-176.

Ulens C, Baker L, Ratka A, Waumans D, et Tytgat J (2001) Morphine-6beta-glucuronide and morphine-3-glucuronide, opioid receptor agonists with different potencies. *Biochem.Pharmacol.* **62**:1273-1282.

Urban MO et Gebhart GF (1999a) Central mechanisms in pain. *Med.Clin.North Am.* **83**:585-596.

Urban MO et Gebhart GF (1999b) Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:7687-7692.

Vaccarino AL et Kastin AJ (2000) Endogenous opiates: 1999. *Peptides* **21**:1975-2034.

Valiquette M, Vu HK, Yue SY, Wahlestedt C, et Walker P (1996) Involvement of Trp-284, Val-296, and Val-297 of the human delta-opioid receptor in binding of delta-selective ligands. *J.Biol.Chem.* **271**:18789-18796.

Van Snick J (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu.Rev.Immunol.* **8**:253-278.

Vanden Berghe W, Vermeulen L, De Wilde G, De Bosscher K, Boone E, et Haegeman G (2000) Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *Biochem.Pharmacol.* **60**:1185-1195.

Venkatakrishnan K, von Moltke LL, et Greenblatt DJ (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J.Clin.Pharmacol.* **41**:1149-1179.

Vilcek J et Lee TH (1991) Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J.Biol.Chem.* **266**:7313-7316.

Vineis P, Veglia F, Benhamou S, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, Dolzan V, Haugen A, Hirvonen A, Ingelman-Sundberg M, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Le Marchand L, Ohshima S, Pastorelli R, Rannug A, Romkes M, Schoket B, Shields P, Strange RC, Stucker I, Sugimura H, Garte S, Gaspari L, et

Taioli E (2003) CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls. *Int.J.Cancer* **104**:650-657.

Walker NJ, Gastel JA, Costa LT, Clark GC, Lucier GW, et Sutter TR (1995) Rat CYP1B1: an adrenal cytochrome P450 that exhibits sex-dependent expression in livers and kidneys of TCDD-treated animals. *Carcinogenesis* **16**:1319-1327.

Walker KA, Barber HE, and Hawksworth GM (1986) Mechanism responsible for altered propranolol disposition in adjuvant-induced arthritis in the rat. *Drug Metab Dispos.* **14**:482-486.

Walsh CT et Levine RR (1975) Studies of the enterohepatic circulation of morphine in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **195**:303-310.

Wang Y, Roy A, Sun L and Lau CE. (1999) A double-peak phenomenon in the pharmacokinetics of alprazolam after oral administration. *Drug Metab Dispos.* **27**:855-9

Warren GW, Poloyac SM, Gary DS, Mattson MP, et Blouin RA (1999) Hepatic cytochrome P-450 expression in tumor necrosis factor-alpha receptor (p55/p75) knockout mice after endotoxin administration. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **288**:945-950.

Watkins LR, Milligan ED, et Maier SF (2001) Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.* **24**:450-455.

Waxman DJ (1999) P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch.Biochem.Biophys.* **369**:11-23.

Waxman DJ, Dannan GA, et Guengerich FP (1985) Regulation of rat hepatic cytochrome P-450: age-dependent expression, hormonal imprinting, and xenobiotic inducibility of sex-specific isoenzymes. *Biochemistry* **24**:4409-4417.

Wegenka UM, Buschmann J, Luttkicken C, Heinrich PC, et Horn F (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell Biol.* **13**:276-288.

Wei ZY, Brown W, Takasaki B, Plobeck N, Delorme D, Zhou F, Yang H, Jones P, Gawell L, Gagnon H, Schmidt R, Yue SY, Walpole C, Payza K, St Onge S, Labarre M, Godbout C, Jakob A, Butterworth J, Kamassah A, Morin PE, Projean D, Ducharme J, et Roberts E (2000) N,N-Diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidenemethyl)benzamide: a novel, exceptionally selective, potent delta opioid receptor agonist with oral bioavailability and its analogues. *J. Med. Chem.* **43**:3895-3905.

Wen X, Wang JS, Backman JT, Laitila J, et Neuvonen PJ (2002) Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug. Metab. Dispos.* **30**:631-635.

Werck-Reichhart D et Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1**:REVIEWS3003.

Westerling D, Frigren L, et Hoglund P (1993) Morphine pharmacokinetics and effects on salivation and continuous reaction times in healthy volunteers. *Ther. Drug Monit.* **15**:364-374.

Westlind A, Malmebo S, Johansson I, Otter C, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M, et Oscarson M (2001) Cloning and tissue distribution of a novel

human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **281**:1349-1355.

Whitlock JP, Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **39**:103-125.

Wilkinson GR et Shand DG (1975) Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin.Pharmacol.Ther.* **18**:377-390.

Wilkinson GR (2002) In vivo probes for studying induction and inhibition of cytochromes P450 enzymes in humans, in *Drug-drug interactions* (Rodrigues AD éditeur) pp 439-504, Marcel Dekker, New York.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, et McRee DE (2000a) Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol.Cell* **5**:121-131.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, et McRee DE (2000b) Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J.Inorg.Biochem.* **81**:183-190.

Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, et Nims RW (1993) Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch.Biochem.Biophys.* **300**:115-123.

Wong GG et Clark SC (1988) Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network. *Immunol.Today* **9**:137-139.

Wong GG, Witek-Giannotti J, Hewick RM, Clark SC, et Ogawa M (1988) Interleukin 6: identification as a hematopoietic colony-stimulating factor. *Behring Inst.Mitt.* **40**-47.

Woods LA (1954) Distribution and fate of morphine in non-tolerant and tolerant dogs and rats. *J.Pharmacol* **112**:158-175.

Woolf CJ, Allchorne A, Safieh-Garabedian B, et Poole S (1997) Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. *Br.J.Pharmacol.* **121**:417-424.

Wright K et Morgan ET (1990) Transcriptional and post-transcriptional suppression of P450IIC11 and P450IIC12 by inflammation. *FEBS Lett.* **271**:59-61.

Wright K et Morgan ET (1991) Regulation of cytochrome P450IIC12 expression by interleukin-1 alpha, interleukin-6, and dexamethasone. *Mol.Pharmacol.* **39**:468-474.

Xia Y et Haddad GG (2001) Major difference in the expression of delta- and mu-opioid receptors between turtle and rat brain. *J.Comp Neurol.* **436**:202-210.

Xie HG, Stein CM, Kim RB, Wilkinson GR, Flockhart DA, et Wood AJ (1999) Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics* **9**:539-549.

Xu C, Goodz S, Sellers EM, et Tyndale RF (2002) CYP2A6 genetic variation and potential consequences. *Adv Drug Deliv.Rev.* **54**:1245-1256.

Xue L, Zgoda VG, Arison B, et Almira CM (2003) Structure-function relationships of rat liver CYP3A9 to its human liver orthologs: site-directed active site mutagenesis to a progesterone dihydroxylase. *Arch.Biochem.Biophys.* **409**:113-126.

Yaksh TL (1999) Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends Pharmacol.Sci.* **20**:329-337.

Yamamoto Y, Tasaki T, Nakamura A, Iwata H, Kazusaka A, Gonzalez FJ, et Fujita S (1998) Molecular basis of the Dark Agouti rat drug oxidation polymorphism: importance of CYP2D1 and CYP2D2. *Pharmacogenetics* **8**:73-82.

Yamazaki H, Inoue K, Turvy CG, Guengerich FP, et Shimada T (1997) Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* **25**:168-174.

Yamazaki H, Nakano M, Imai Y, Ueng YF, Guengerich FP, et Shimada T (1996) Roles of cytochrome b5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes. *Arch.Biochem.Biophys.* **325**:174-182.

Yamazaki H, Shibata A, Suzuki M, Nakajima M, Shimada N, Guengerich FP, et Yokoi T (1999) Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **27**:1260-1266.

Yamazoe Y, Shimada M, Kamataki T, et Kato R (1986) Effects of hypophysectomy and growth hormone treatment on sex-specific forms of cytochrome P-450 in relation to drug and steroid metabolisms in rat liver microsomes. *Jpn.J.Pharmacol.* **42**:371-382.

Yeh SY, Gorodetzky CW, et Krebs HA (1977a) Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-ethereal sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *J.Pharm.Sci.* **66**:1288-1293.

Yeh SY, McQuinn RL, et Gorodetzky CW (1977b) Biotransformation of morphine to dihydromorphinone and normorphine in the mouse, rat, rabbit, guinea pig, cat, dog, and monkey. *Drug Metab Dispos.* **5**:335-342.

Yoburn BC, Lutfy K, et Candido J (1991) Species differences in mu- and delta-opioid receptors. *Eur.J.Pharmacol.* **193**:105-108.

Yonehara N, Takemura M, Yoshimura M, Iwase K, Seo HG, Taniguchi N, et Shigenaga Y (1997) Nitric oxide in the rat spinal cord in Freund's adjuvant-induced hyperalgesia. *Jpn.J.Pharmacol.* **75**:327-335.

Yoshinari K, Sueyoshi T, Moore R, et Negishi M (2001) Nuclear receptor CAR as a regulatory factor for the sexually dimorphic induction of CYB2B1 gene by phenobarbital in rat livers. *Mol.Pharmacol.* **59**:278-284.

Yoshioka H, Morohashi K, Sogawa K, Miyata T, Kawajiri K, Hirose T, Inayama S, Fujii-Kuriyama Y, et Omura T (1987) Structural analysis and specific expression of microsomal cytochrome P-450(M-1) mRNA in male rat livers. *J.Biol.Chem.* **262**:1706-1711.

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, et Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* **386**:499-502.

Zaigler M, Rietbrock S, Szymanski J, Dericks-Tan JS, Staib AH, et Fuhr U (2000) Variation of CYP1A2-dependent caffeine metabolism during menstrual cycle in healthy women. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **38**:235-244.

Zaphiropoulos PG, Mode A, Strom A, Husman B, Andersson G, et Gustafsson JA (1988a) Sequence and regulation of two growth-hormone-controlled, sex-specific isozymes of cytochrome P-450 in rat liver, P-450(15)beta and P-450(16)alpha. *Acta Med.Scand.Suppl* **723**:161-167.

Zaphiropoulos PG, Mode A, Strom A, Moller C, Fernandez C, et Gustafsson JA (1988b) cDNA cloning, sequence, and regulation of a major female-specific and

growth hormone-inducible rat liver cytochrome P-450 active in 15 beta-hydroxylation of steroid sulfates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:4214-4217.

Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, et Kaminsky LS (1999a) Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos.* 27:804-809.

Zhang W, Kilicarslan T, Tyndale RF, et Sellers EM (2001) Evaluation of methoxsalen, tranylcypromine, and tryptamine as specific and selective CYP2A6 inhibitors in vitro. *Drug Metab Dispos.* 29:897-902.

Zhang X, Rice KC, Calderon SN, Kayakiri H, Smith L, Coop A, Jacobson AE, Rothman RB, Davis P, Dersch CM, et Porreca F (1999b) Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 26. Synthesis and biological evaluation of diarylmethylpiperazines and diarylmethylpiperidines as novel, nonpeptidic delta opioid receptor ligands. *J.Med.Chem.* 42:5455-5463.

Zhou HH, Sheller JR, Nu H, Wood M, et Wood AJ (1993) Ethnic differences in response to morphine. *Clin.Pharmacol.Ther.* 54:507-513.

ANNEXES

Annexe 1

Rappel de cinétique enzymatique appliquée au métabolisme

1. Cinétique enzymatique

Seul le cas d'une réaction avec un seul site enzymatique sera présenté. Le lecteur pourra se référer aux ouvrages suivants pour une description plus détaillée de modèles plus complexes : (Segel, 1975; Houston et Kenworthy, 2000)

L'équation générale d'interaction entre une enzyme et son substrat peut être décrite par la relation suivante:



- S:** Concentration de substrat
- E:** Concentration d'enzyme
- ES:** Concentration d'enzyme couplée au substrat
- P:** Concentration de produit
- k^1 :** Constante cinétique de l'affinité enzyme-substrat
- k^{-1} :** Constante cinétique de la dissociation du complexe ES,
- k_{cat} :** Constante de vitesse de formation du produit.

La vitesse de réaction et les caractéristiques cinétiques fondamentales d'une enzyme peuvent être présentées par l'équation de Michaelis-Menten:

$$v = (V_{\max} [S]) / (K_m + [S])$$

V_{\max} : Vitesse maximale de formation du produit

K_m : Constante de Michaelis-Menten

Le K_m est une représentation de l'affinité du substrat pour le système enzymatique. D'un point de vue cinétique, ces constantes peuvent être décrites de la façon suivante:

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} * E_{\text{total}}$$

$$K_m = k_{\text{cat}} + k^{-1}/k^1$$

Lorsque le tout appliqué aux CYPs, nous pouvons conclure que la vitesse de biotransformation est dépendante du contenu total en CYP, des constantes k_{cat} , k^1 , k^{-1} et de la concentration de substrat.

2. Relation avec le métabolisme hépatique

La capacité d'élimination métabolique d'une fraction cellulaire (ex : microsomes de foie), de cellules (ex : hépatocytes) ou même à un organe entier (ex : le foie) peut être illustré par un paramètre appelé clairance intrinsèque (CL_{int}). Dans le cas du métabolisme d'un médicament non lié, cette clairance est équivalente à :

$$CL_{\text{int}} = V_{\max}/(K_m+[S]) \text{ et en conditions de cinétique linéaire } CL_{\text{int}} = V_{\max}/K_m$$

Dans une préparation contenant plus d'une enzyme comme les microsomes de foie, la CL_{int} est la mesure de la somme de toutes les équations de Michaelis-Menten pour chacune des voies enzymatiques individuelles ($CL_{int,i}$).

$$CL_{int} = \sum_i CL_{int,i}$$