

Université de Montréal

**L'utilisation de la dompéridone comme substrat marqueur de l'activité
in vitro des CYP3A4 et CYP3A5**

par

VERONIQUE MICHAUD

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences Pharmaceutiques
option pharmacologie

Décembre 2003

© Véronique Michaud, 2003



QV

705

U58

2004

V.010

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

Ce mémoire intitulé :
L'utilisation de la dompéridone comme substrat marqueur de l'activité
in vitro des CYP3A4 et CYP3A5

présenté par :
Véronique Michaud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Louis Brazier
Président-rapporteur

Jacques Turgeon
Directeur de recherche

Marie-Claude Vanier
Membre du jury

RÉSUMÉ

En français

La variabilité interindividuelle dans la réponse aux médicaments et les effets indésirables associés aux médicaments constituent une problématique importante. Les systèmes enzymatiques, dont principalement les cytochromes P450, sont un des déterminants majeurs du devenir du médicament dans l'organisme. Il importe d'évaluer le degré et l'impact de la variabilité de l'activité des enzymes responsables du métabolisme des médicaments et leur rôle dans la variabilité interindividuelle aux médicaments.

Les cytochromes P450 représentent un système enzymatique majeur en ce qui a trait au métabolisme des médicaments. La famille CYP3A revêt une grande importance en raison de son niveau d'expression élevé dans les principaux organes responsables du métabolisme et de son rôle dans la biotransformation de plusieurs médicaments. Un intérêt particulier est porté sur les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 puisqu'il existe un chevauchement dans la spécificité de leurs substrats. Jusqu'à maintenant, aucun substrat ne permettait de distinguer l'activité des CYP3A4/5. Toutefois, les travaux de notre laboratoire effectués dans le cadre de ce mémoire démontrent que la dompéridone présente une affinité supérieure pour le CYP3A4 comparativement au CYP3A5. Nos travaux de recherche démontrent que la dompéridone pourrait constituer un bon substrat marqueur afin de différencier les activités *in vitro* des CYP3A4/5. De plus, nous décrivons des résultats démontrant sans équivoque l'importance du CYP3A5 à titre

de cofacteur des CYP3A4/5 ainsi que le faible potentiel inhibiteur de la clarithromycine sur les CYP3As.

Une meilleure compréhension des cytochromes P450 est essentielle puisqu'elle permettra une meilleure estimation de la réponse attendue d'un individu à son traitement pharmacologique.

Mots clés : cytochromes P450, CYP3A4, CYP3A5, dompéridone, métabolisme, variabilité interindividuelle

RÉSUMÉ

En anglais

Adverse drug effects secondary to drug-drug interactions and intersubject variability in drug response constitute a considerable problem in clinical practice. Indeed, a wide intersubject variability in drug response can be observed following administration of drugs. The degree of variability in the expression or activity of drug metabolizing enzymes contribute considerably to interindividual variability.

The cytochromes P450 is among the most important enzymatic system involved in the biotransformation of most xenobiotics. The CYP3As play a predominant role in drug metabolism: they constitute the most abundantly expressed in metabolism organs and with the greatest involvement in the metabolism of currently clinically used drugs. There is an overlap substrate specificity between CYP3A4 and CYP3A5, therefore, it has made difficult to separate the activity of each isozymes. Several substrate markers have been proposed as probes for prediction of CYP3A activity but none of them can distinguish CYP3A4/5 activities. However, results obtained from our laboratory indicate that domperidone exhibits greater affinity for CYP3A4 compared to CYP3A5. Our study suggests that domperidone could be used as a substrate marker drug to differentiate between CYP3A4/5 *in vitro* activities. Also, we shall describe the importance of CYP b5 on activities of CYP3A4/5 and the low inhibitory potency of clarithromycin towards CYP3As.

A better understanding of factors, principally cytochromes P450, responsible for intersubject differences in drug metabolizing enzyme activities which affect the balance between detoxification and toxicity is imperative because it could permit a better estimation of drug response.

Key words: cytochromes P450, CYP3A4, CYP3A5, domperidone, metabolism, intersubject variability

TABLE DES MATIERES

Résumé français.....	i
Résumé anglais.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii

CHAPÎTRE I

INTRODUCTION

Introduction.....	2
1. Cytochromes P450.....	4
1.1 Définition.....	4
1.2 Historique.....	6
1.2.1 Évolution.....	6
1.2.2 Recherches.....	7
1.3 Propriétés biochimiques.....	9
1.4 Fonctions.....	12
1.4.1 Composés endogènes.....	12
1.4.2 Composés exogènes.....	12
1.5 Cycle catalytique.....	13
1.5.1 Étapes du cycle catalytique.....	13
1.5.2 Cytochrome b5.....	15
1.6 Réactions catalysées.....	17
1.6.1 Réactions communes.....	17
1.6.2 Réactions inhabituelles.....	18
2. Cytochromes CYP3A.....	19
2.1 Famille CYP3A.....	19
2.1.1 Isoenzymes des CYP3As.....	20
2.1.2 Structure.....	22

2.2 Substrats	24
2.3 Variabilité interindividuelle.....	25
2.3.1 Jus de pamplemousse.....	28
2.3.2 Produits naturels.....	29
2.3.3 Facteurs endogènes.....	30
2.3.4 Facteurs environnementaux.....	31
2.3.5 Génétique.....	31
2.4 Substrats marqueurs.....	35
2.4.1 Définition.....	36
2.4.2 Substrats marqueurs CYP3A4/5 proposés.....	36
3. Interactions médicamenteuses.....	42
3.1 Types d'interactions.....	42
3.2 Définitions.....	44
3.2.1 Substrat.....	44
3.2.2 Inducteur.....	45
3.2.3 Inhibiteur.....	45
3.3 Types d'inhibition enzymatique.....	47
3.3.1 Inhibiteurs réversibles.....	47
3.3.2 Inhibiteurs quasi-irréversibles.....	49
3.3.3 Inhibiteurs irréversibles.....	49
4. Conclusion.....	51
Références.....	53

CHAPITRE II

HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Hypothèse.....	86
Objectifs de l'étude.....	86

CHAPITRE III DOMPERIDONE AS AN IN VITRO SUBSTRATE MARKER DRUG DIFFERENTIATE BETWEEN CYP3A4 AND CYP3A5 ACTIVITY

Abstract.....	89
---------------	----

Introduction.....	91
Materials and Methods.....	94
Results.....	99
Discussion.....	108
Conclusion.....	113
Reference List.....	114

CHAPITRE IV**CONCLUSION GÉNÉRALE**

Conclusion.....	125
-----------------	-----

ANNEXE I**DÉCLARATION DES COAUTEURS**

Déclaration des coauteurs.....	127
--------------------------------	-----

LISTE DES TABLEAUXINTRODUCTION

Tableau 1 : Principaux médicaments substrats des CYP3A4/526

DOMPERIDONE AS AN IN VITRO SUBSTRATE MARKER DRUG TO DIFFERENTIATE
BETWEEN CYP3A4 AND CYP3A5 ACTIVITIES

Tableau 1: Kinetic parameters for the formation of domperidone ring-
hydroxylated metabolite from various enzymatic sources100

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Évolution des cytochromes P450 humains.....	5
Figure 2 : Structure générale des cytochromes P450.....	10
Figure 3 : Cycle catalytique.....	14
Figure 4 : Variabilité interindividuelle dans l'expression des CYP3A4 et CYP3A5 dans différents foies humains.....	27

DOMPERIDONE AS AN IN VITRO SUBSTRATE MARKER DRUG TO DIFFERENTIATE BETWEEN CYP3A4 AND CYP3A5 ACTIVITIES.

Figure 1: Effects of monoclonal antibodies directed against CYP3A4 on formation rates of major ring-hydroxylated metabolite of domperidone.....	102
Figure 2: Effects of ketoconazole on domperidone ring-hydroxylated metabolite formation in A) human liver microsomes (HLM) and microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 (lCYP3A4), B) microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 (rCYP3A4) and CYP3A5 (rCYP3A5) with or without cytochrome b5 (CYPb5).....	104
Figure 3: Effects of clarithromycin on domperidone ring-hydroxylated metabolite	

formation in A) human liver microsomes (HLM) and microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 (lCYP3A4), B) microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 (rCYP3A4) and CYP3A5 (rCYP3A5) with or without cytochrome b5 (CYPb5).....105

Figure 4: Relative proportions of CYP3A4 and CYP3A5 in human liver microsomes from different donors. A) Proportions were calculated from incubations performed with domperidone concentrations fixed 5 μM (K_m for CYP3A4 determined without cytochrome b5) and 300 μM (saturation of enzymes). B) Incubations were performed with domperidone concentrations fixed at 26 μM (K_m for CYP3A4 determined with cytochrome b5) and 300 μM (enzymatic saturation).....107

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AUC : aire sous la courbe

Cl : clairance

Cl_{int} : clairance intrinsèque

CYP: cytochromes

e⁻ : électron

FAD : flavine adénine dinucléotide

Fe : fer

FMN : flavine mononucléotide

FMO : flavine contenant une monooxygénase

HPLC : chromatographie liquide à haute pression

K_i : constante d'inhibition

K_m : constante d'affinité

LC-MS-MS : chromatographie liquide par spectrométrie de masse

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate déshydrogénase

Red : réduit

Ox : oxydé

V_{max} : vitesse maximale

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jacques Turgeon. Merci d'avoir cru en moi, merci pour votre support, merci pour votre générosité, merci pour vos nombreuses explications et merci pour votre confiance. Ces remerciements sont encore bien peu pour vous exprimer toute la reconnaissance et la gratitude qui vous reviennent.

Je désire également remercier mes collègues de laboratoire avec qui j'ai eu un grand plaisir à travailler au cours de mes travaux de maîtrise: Pierre Morissette, Nathalie Morin et Raymond Hreiche.

Je suis également reconnaissante envers MDS Pharma Service pour leur soutien financier fourni tout au cours de mes études.

Je veux de plus remercier ma famille et mes parents pour leur support et leur amour. Merci d'être toujours là.

Finalement, Alexandre, merci pour ton amour, ta patience et ton soutien moral. Je tiens particulièrement t'exprimer ma reconnaissance pour tes nombreux encouragements.

CHAPÎTRE I

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Il est possible d'observer dans la population en général divers degrés de réponses pharmacologiques lors de l'administration du même médicament à la même dose. Également, la prise du même médicament, à la même dose chez le même patient peut être associée à des réponses qui diffèrent dans le temps. Ces affirmations définissent la variabilité inter et intra-individuelle dans la réponse au traitement. Ces variabilités sont des phénomènes importants observés en clinique et plusieurs facteurs sont responsables de cette situation. Parmi ceux-ci, le métabolisme des médicaments constitue sûrement un des facteurs des plus importants. D'où l'intérêt d'étudier le principal système enzymatique responsable du métabolisme des médicaments soit, les cytochromes P450.

La première partie du travail de recherche de ce mémoire énonce une mise à jour des données publiées sur les cytochromes P450. L'objectif de cette section est de mieux comprendre l'importance et l'implication clinique du métabolisme des médicaments par les cytochromes P450. Tout d'abord, un bref aperçu des différentes recherches effectuées dans ce domaine permettra de découvrir l'évolution et de réaliser l'engouement dont jouissent actuellement les cytochromes. Les principales propriétés de ce système enzymatique seront décrites par la suite afin de bien concevoir les fonctions exercées par celui-ci, les mécanismes d'oxydation et les principaux cofacteurs nécessaires à son fonctionnement.

La principale sous-famille des cytochromes P450 responsables du métabolisme des médicaments chez l'humain sera ensuite discutée, avec une attention particulière portée aux facteurs pouvant modifier son activité. L'importance des études s'intéressant aux rôles, fonctions et mécanismes des

cytochromes P450 n'est pas limitée au domaine théorique mais s'applique de plus en plus à la pratique clinique. En effet, ces découvertes constituent des outils permettant de prédire le devenir du médicament chez un patient et par conséquent, sa réponse au traitement et pourrait ainsi aider à individualiser les doses. Il sera traité par la suite de la variabilité interindividuelle observée dans la réponse à un traitement pharmacologique pouvant s'expliquer par l'âge, le sexe, des facteurs environnementaux, la présence de pathologies concomitantes, de polymorphismes génétiques et d'interactions médicamenteuses. De fait, ces facteurs affectent à divers degrés l'activité catalytique des cytochromes P450 et ainsi modifient le profil d'efficacité, de toxicité ou encore d'inefficacité du médicament.

Les différentes découvertes dans les domaines pharmaceutique et médical ont contribué grandement au phénomène de polypharmacie entraînant ainsi des risques accrus d'interactions médicamenteuses. Il est maintenant bien reconnu que les interactions médicamenteuses contribuent significativement aux différences intra-individuelle et interindividuelle dans la réponse au médicament. Les interactions médicamenteuses qui impliquent un changement du métabolisme d'un médicament par l'administration concomitante d'une autre drogue sont parmi les interactions les plus fréquemment observées en clinique. Il devient ainsi primordial de comprendre et d'élucider les mécanismes régissant les diverses interactions médicamenteuses afin de proposer des solutions aux cliniciens.

1. CYTOCHROMES P450

1.1 DÉFINITION

L'humain est exposé à une variété de composés chimiques provenant entre autres de l'alimentation, de la pollution, des différentes percées technologiques dans l'industrie qui sont souvent associées à l'apparition de nouvelles molécules synthétiques et de l'industrie pharmaceutique qui introduit des nouvelles variétés de médicaments synthétiques et naturels.¹ Afin de réagir et se protéger contre les divers toxiques chimiques potentiels, l'organisme a développé différents systèmes de défense dont un des plus importants est celui des cytochromes P450. De fait, la majorité des xénobiotiques sont métabolisés par l'entremise de l'activité catalytique de ce système enzymatique. Il faut noter qu'en plus d'être responsables de la biotransformation de nombreux xénobiotiques, les cytochromes P450 interviennent également dans la synthèse de divers composés endogènes comme les prostaglandines, les leucotriènes et des stéroïdes. Brièvement, ce *système enzymatique de protection* contient un groupement hème, un élément caractéristique et essentiel à la réalisation de sa fonction catalytique principale qui consiste à oxyder des substrats afin de les rendre plus hydrosolubles.

La superfamille des cytochromes P450 est constituée de plusieurs enzymes, nommées isoenzymes, toutes dérivées d'un gène ancestral commun (Figure1). Les différentes isoenzymes du cytochrome P450 sont organisées en familles et ensuite classifiées en sous-familles selon leur degré de similarité en acides aminés.^{2,3} Ce système enzymatique est caractérisé par une versatilité importante. De fait, la superfamille des cytochromes P450 contient au total environ 1000 membres, toutes espèces confondues, et 57 gènes ont été identifiés

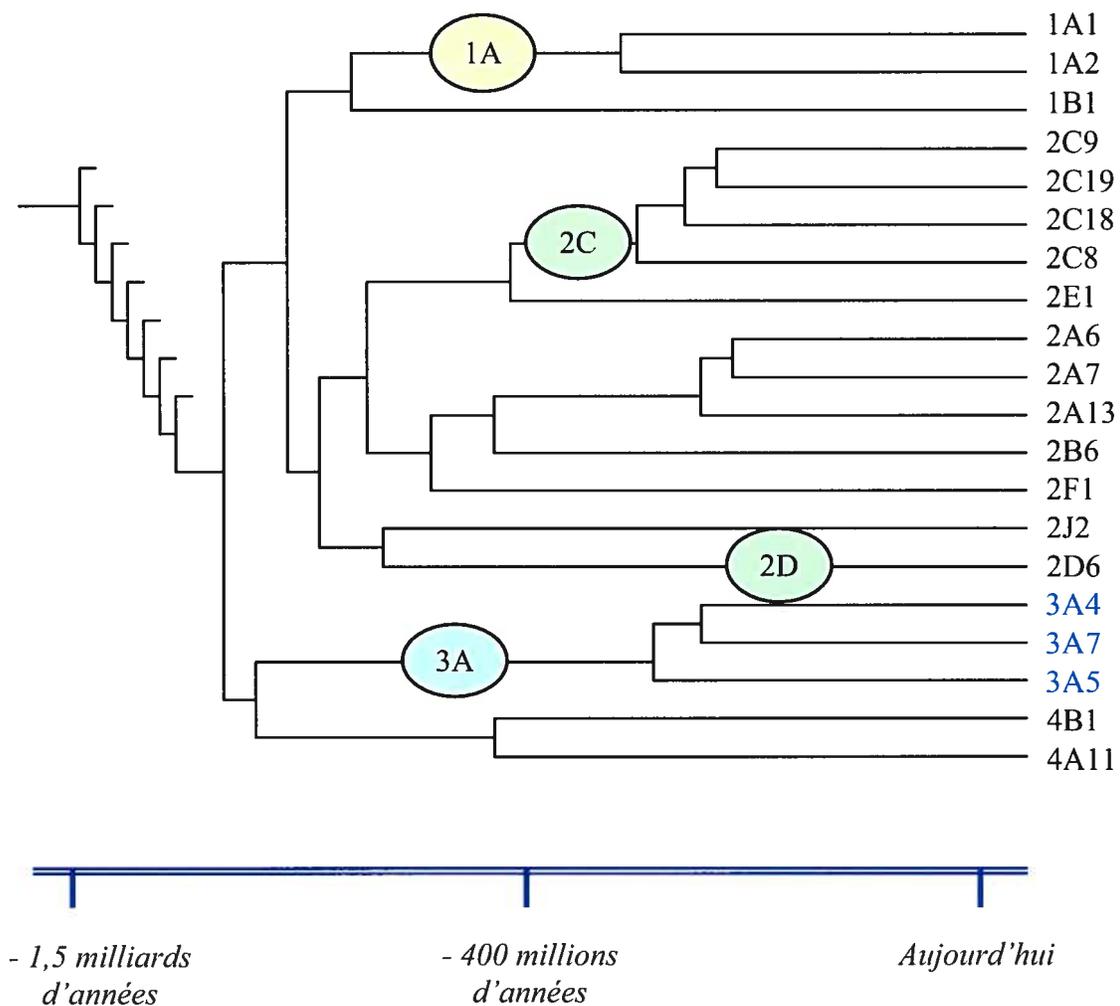


Figure 1. Évolution des cytochromes P450 humains. (adapté de Ingelman-Sundberg).^a

^a Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan R A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *TiPS* 1999;20:342-9

chez l'humain.^{1,4} Largement distribuées dans la nature, les enzymes du cytochrome P450 sont retrouvées chez les plantes, les insectes, les mammifères, certaines bactéries et champignons.¹ Le monde végétal constitue un vaste réservoir de gènes des cytochromes P450 et d'ailleurs, certaines plantes peuvent contenir près de 300 différentes isoenzymes.⁵ La diversification des gènes des cytochromes P450 est expliquée par l'adaptation des espèces aux différents changements environnementaux.

1.2 HISTORIQUE

1.2.1 Évolution

Il semble que les cytochromes P450 soient apparus dès le commencement de la vie. Chez les premiers organismes, ce système enzymatique avait probablement pour fonction de synthétiser les stéroïdes nécessaires aux membranes cellulaires.^{6,7} Par ailleurs, des évidences suggèrent un phénomène de co-évolution des cytochromes P450 chez la plante et le mammifère : les plantes produisent des toxines comme moyens de défense contre ses prédateurs et les animaux développent des cytochromes P450 pour détoxifier ces toxines. En effet, des évidences indiquent que les cytochromes P450 chez les plantes sont très similaires au système enzymatique de monooxydation retrouvé chez le mammifère.⁸ De plus, il apparaît que les mêmes gènes de cette superfamille d'enzyme sont impliqués dans la synthèse de molécules de défense par les plantes ainsi que dans leur détoxification chez l'animal.⁸ De cette rivalité entre les plantes et les animaux se développent depuis des millions d'années de nouvelles activités catalytiques et de nouvelles isoenzymes du cytochrome P450.

1.2.2 Recherches

L'explosion des connaissances sur les cytochromes P450 a d'abord débutée par la compilation de plusieurs études effectuées sur le métabolisme de xénobiotiques à la fin des années quarante. En 1947, R.T. Williams démontra chez l'animal la formation de différents métabolites et leur excrétion par différentes routes d'élimination suite à l'administration de xénobiotiques.⁹ Il suggéra ainsi qu'une variété de processus biochimiques était impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques suite à leur ingestion chez l'animal. Le laboratoire de Brodie fut l'un des pionniers dans la réalisation d'études *in vitro* portant sur le métabolisme des xénobiotiques.¹⁰ Ils furent les premiers à présenter le concept que les différences entre les espèces dans la réponse pharmacologique à un médicament corrélaient avec le taux de métabolisme et le niveau plasmatique. Par la suite, les travaux de recherche effectués au laboratoire de Miller démontrèrent clairement que le foie était pourvu d'un système enzymatique "oxydatif" capable de métaboliser un bon nombre de xénobiotiques.¹¹ De fait, ces chercheurs ont élucidé les propriétés de base de l'activité métabolique des microsomes hépatiques.¹²

Klingenberg s'intéressa aux propriétés spectrophotométriques des pigments retrouvés dans les fractions microsomiques préparées à partir de foies de rat. En 1958, il fit la découverte du pigment microsomique "carbon monoxide-binding" dont l'absorption maximum s'observe à 450 nm.¹¹ En 1962, la nature hémoprotéique de ce pigment microsomique fut rapportée par Omura et Sato.^{13,14} Le nom de cytochrome P450 fut alors proposé. Il faudra attendre les travaux de Cooper et Rosenthal vers 1963 afin d'élucider la fonction des cytochromes P450. Intéressés au rôle de divers stéroïdes comme agent causal de l'hypertension, ils étudièrent le métabolisme de la C-21 hydroxylation de la 17-hydroxyprogestérone

catalysée par des microsomes du cortex des surrénales.¹⁵ En démontrant son implication dans le métabolisme oxydatif de stéroïdes, le rôle de cette protéine fut alors proposé.

Dans les années soixantes, les expériences menées chez l'animal par Conney ont démontré que certains produits chimiques provoquaient une élévation du taux de métabolisme de certains stéroïdes et médicaments observé au sein des fractions microsomiques du foie.¹⁶ Le phénobarbital et le 3-méthylcholanthrene furent ainsi reconnus à titre d'inducteurs hautement efficaces du métabolisme hépatique de certains substrats. Par la suite, Alvarez grâce à ses travaux avec des foies de rat prétraités au 3-méthylcholanthrene fournira l'évidence de l'existence de nombreuses formes de cytochromes P450 dans les microsomes hépatiques.¹⁷ En fait, le pigment présent dans les microsomes hépatiques d'animaux prétraités au 3-méthylcholanthrene avait une absorption maximale à 448 nm et non à 450 nm, suggérant alors la présence de plus d'une enzyme du cytochrome P450. L'isolation des différentes isoenzymes du cytochrome P450 deviendra ensuite une préoccupation dominante de plusieurs laboratoires. Les percées technologiques dans le domaine de la biologie moléculaire observées au début des années quatre-vingt ont ainsi permis la caractérisation de diverses isoformes du cytochrome P450.^{18,19}

En bref, il y a à peine 40 ans, les données scientifiques suggéraient l'existence d'une seule enzyme du cytochrome P450 agissant à titre d'oxydase commune pour plusieurs réactions de monooxydation. Les études sur le cytochrome P450 ont permis une explosion de connaissances et à ce jour, plus de 1000 isoformes sont connus chacun pouvant catalyser un type de réaction pour un

nombre limité de produits chimiques et ce, pour plus de 200 000 substrats identifiés.^{1,20}

1.3 PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES

Les cytochromes P450 sont constitués de deux parties principales : tout d'abord, une partie prosthétique représentée par un groupement hème et la seconde partie est l'apoprotéine, portion de la protéine dépourvue d'activité catalytique (Figure 2). Le groupement hème sert de groupe prosthétique pour de nombreuses hémoprotéines essentielles à la vie. Les protéines contenant un groupement hème sont impliquées dans un éventail remarquable de fonctions biologiques incluant : la liaison de l'oxygène par l'hémoglobine et la myoglobine; des réactions métaboliques impliquant l'oxygène telles les monooxygénases et les peroxidases; la transmission d'un signal associé à des cascades de régulation dont la gyanulate cyclase et l'oxide nitrique synthase; et les réactions avec transfert d'électrons par les cytochromes.²¹ De fait, toutes les isoformes du cytochrome P450 possèdent un groupement prosthétique hème identique et elles se distinguent grâce des structures différentes dans l'apoprotéine laquelle confère la spécificité de chaque isoenzyme pour ses substrats.

Des homologues de structure sont observées parmi les différentes enzymes du cytochrome P450. Premièrement, ces protéines ont un poids moléculaire d'environ 57 000 kd et contiennent toutes approximativement 500 acides aminés.⁸ Une molécule de cystéine située près du groupement carboxy-terminal de la protéine fournit un atome de soufre essentiel au fer contenu dans l'hème.¹ Le rôle ainsi que l'importance d'un ligand thiolate dans l'activité catalytique des cytochromes P450 ont été largement investigués et il est désormais évident que ce

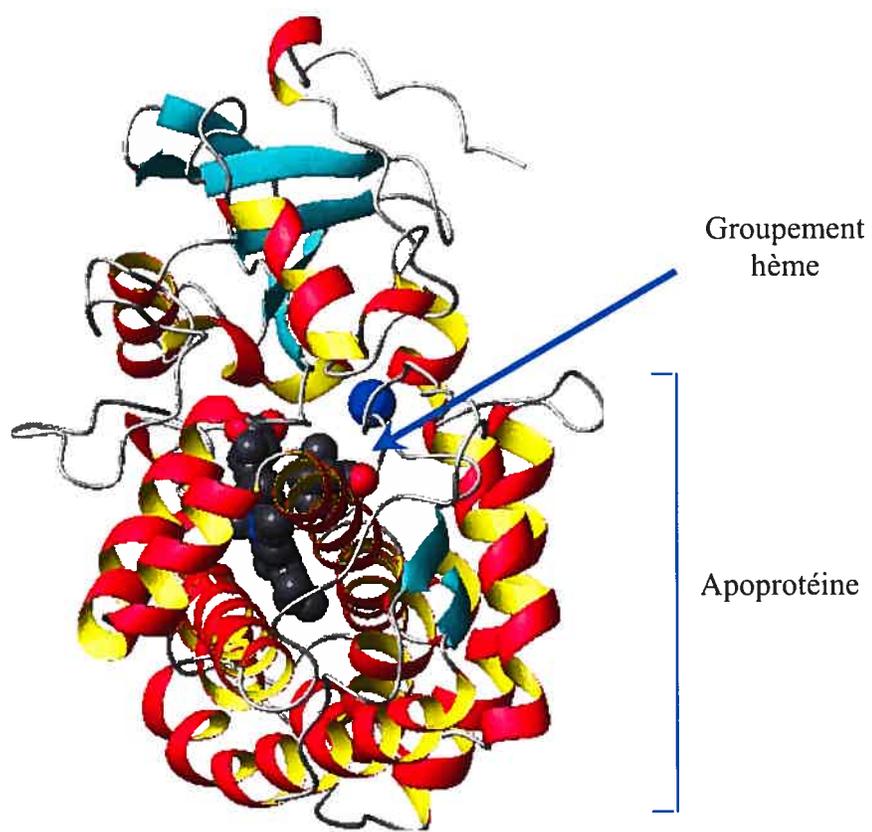


Figure 2. Structure générale des cytochromes P450

dernier est critique pour le bon fonctionnement de l'enzyme.²² En fait, le ligand thiol altère la densité d'électrons de l'hème fournissant ainsi un champ électronique nécessaire à l'activation de la molécule d'oxygène.¹ Enfin, la partie N-terminale de la protéine est riche en acides aminés hydrophobes : cette partie agirait à titre de domaine spécifique dans la liaison de la protéine à la membrane.^{1,8}

Le groupement prosthétique hème est une sous-structure en intime association avec le substrat puisque l'oxygène est activé et le substrat oxydé via l'atome de fer.⁸ En général, une isoenzyme catalysera le métabolisme d'un nombre limité de composés chimiques suggérant ainsi un rôle pour un site actif géométrique unique pour une isoenzyme particulière.

Les cytochromes P450 chez les mammifères sont retrouvés dans le réticulum endoplasmique et de façon moindre au niveau des mitochondries.²³ Les cytochromes P450 mitochondriaux sont distinctes des cytochromes P450 microsomiques et ce, dans une même cellule. De plus, les cytochromes P450 mitochondriaux sont davantage impliqués dans le métabolisme de stéroïdes et de substrats physiologiques et ils ne semblent pas avoir d'activité significative dans le métabolisme des xénobiotiques.⁸

Les cytochromes P450 sont exprimés dans la majorité des organes du corps humain mais, certaines isoformes apparaissent spécifiques à certains organes. Enfin, certains tissus comme le foie, les intestins et les glandes surrénales expriment de grandes quantités de cytochromes P450 et leur concentration excède celle des autres hémoprotéines retrouvées dans ces organes.

1.4 FONCTIONS

Les cytochromes P450 participent au maintien de la santé et au bien-être de l'individu. En fait chez l'humain, les isoenzymes du cytochrome P450 jouent un rôle primordial d'une part, dans la biosynthèse de composés endogènes et d'autre part, dans le métabolisme de nombreux composés exogènes tels que des médicaments, des polluants environnementaux et l'alimentation. Bien que le métabolisme de ces composés chimiques résulte fréquemment en un processus de détoxification, l'activité des cytochromes P450 peut également générer des métabolites toxiques pouvant contribuer à augmenter la susceptibilité au cancer, tératogénèse, mutagénèse et toxicité aux médicaments.

1.4.1 Composés endogènes

Toutes les isoenzymes du cytochrome P450 possèdent probablement une ou plusieurs fonctions endogènes.²⁴ Par exemple, certains cytochromes P450 participent au métabolisme de l'acide arachidonique qui est convertie en un peu plus de 102 métabolites éicosanoïdes alors que d'autres isoenzymes sont responsables de la biosynthèse d'acides biliaires à partir du cholestérol, de la synthèse et/ou du métabolisme de la vitamine D₃, des hormones stéroïdiennes et de l'acide rétinoïque.^{1,24,25}

1.4.2 Composés exogènes

Généralement, le processus de biotransformation concourt à la conversion de xénobiotiques lipophiles en métabolites plus hydrosolubles permettant de faciliter leur excrétion afin de diminuer la durée d'exposition ou encore, éviter l'accumulation du produit mère dans l'organisme. Le foie représente un organe

d'importance dans le processus global de biotransformation lequel peut être divisé en différentes phases. Les transformations métaboliques de phase I comprennent les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse et introduisent un groupement fonctionnel ou réactif dans la molécule. Par ailleurs, les transformations métaboliques de phase II sont habituellement des réactions de conjugaison du produit mère ou d'un métabolite avec l'acide glucuronique, le glutathion ou un sulfate. Les réactions de conjugaison facilitent le transport et favorisent l'élimination par les voies rénales et biliaires. Les cytochromes P450 sont le système enzymatique majeur catalysant les réaction de phase I d'où leur importance dans la protection de l'organisme face à l'intrusion de xénobiotiques.

1.5 CYCLE CATALYTIQUE

Les mécanismes par lesquels les cytochromes P450 catalysent les réactions de phase I ont été largement élucidés bien que certains points demeurent encore obscurs. Cependant, il est généralement bien accepté que le cycle de réactions des cytochromes P450 a lieu suivant plusieurs étapes d'oxydo-réduction.

1.5.1 Étapes du cycle catalytique

Le cycle débute en présence d'un cytochrome P450 à l'état ferrique (Fe^{+3}) (Figure 3). 1) Le substrat situé à proximité de cette enzyme se lie avec cette dernière et ce, près de la région distale de l'hème. 2) Le complexe P450-substrat est réduit par la flavoprotéine NADPH-P450 réductase laquelle interagit directement avec le cytochrome P450 dans le réticulum endoplasmique. La NADPH-P450 réductase, une hémoprotéine oxydoréductase, est un composant du système microsomique d'oxydation fonctionnant dans le réticulum endoplasmique

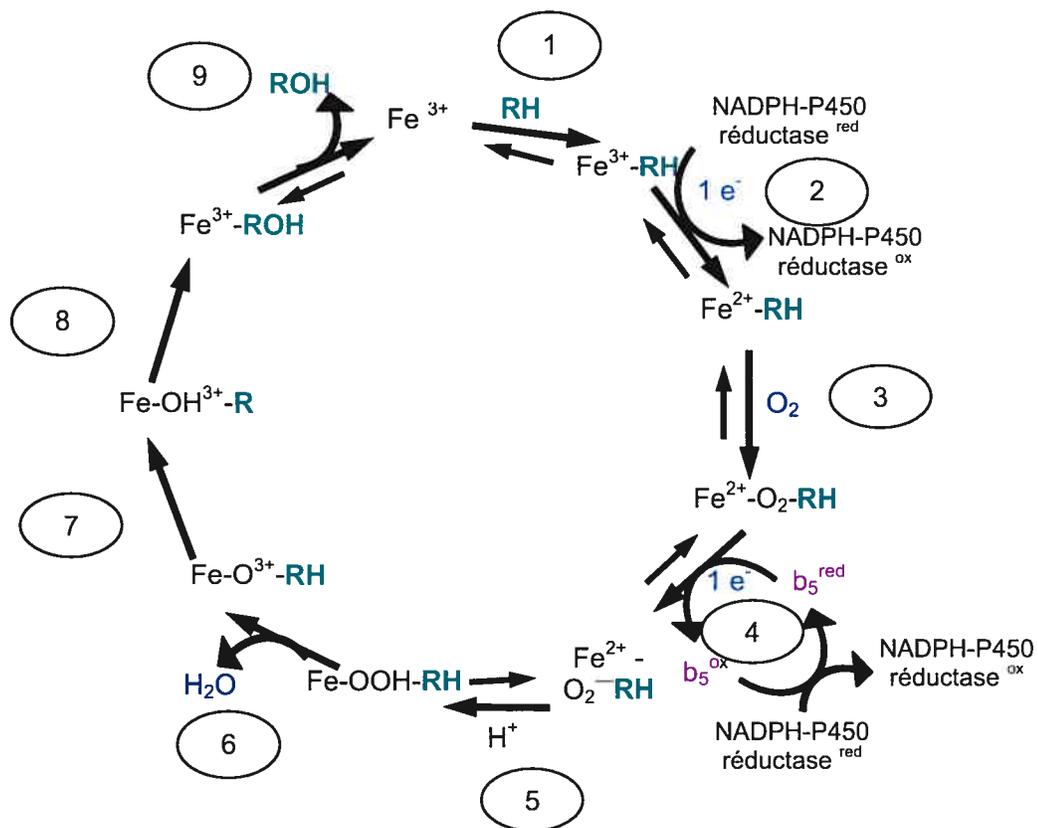


Figure 3. Cycle catalytique des cytochromes P450

qui catalyse le transfert d'électrons du NADPH au cytochrome P450. En fait, pour la majorité des isoenzymes chez les mammifères, le cofacteur qui participe au transfert d'électrons est la P450-réductase : l'électron provient du NADPH et le flot d'électrons circule par le groupement prosthétique de la réductase du FAD au FMN.^{22,23,26} Le cytochrome P450 devenu ferreux (Fe^{+2}) se lie avec l'oxygène formant un complexe instable (FeO_2^{+2}). 4) L'introduction d'un second électron dans le complexe ternaire P450-dioxygène-substrat provient soit de la NADPH-P450 réductase ou du cytochrome b5. 5) Un proton est ensuite ajouté. 6) Scission du lien O-O (FeO-OH) pour générer un composé réactif (FeO^{+3}) lequel attaque généralement le lien carbone-hydrogène du substrat à l'hème. 7) Oxydation du substrat et le produit se dissocie de l'enzyme.

1.5.2 Cytochrome b5

Tout comme pour la flavoprotéine NADPH-P450 réductase, le cytochrome b5, une hémoprotéine, est impliqué dans le transfert d'électrons lors de réactions d'oxydation. Toutefois, son rôle dans le cycle catalytique du cytochrome P450 demeure encore mal compris. Le cytochrome b5 est une petite protéine de 130 acides aminés formée de 2 domaines, soit la partie N-terminale qui est une région hydrophile contenant l'hème et une portion lipophile carboxy-terminale qui interagit avec la membrane.^{27,28} Chez l'humain, cette protéine est retrouvée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Il existe de nombreuses formes de cytochromes b5 possédant un haut degré d'homologie entre elles, soit 93-98% de similarité dans leur séquence protéique.²⁹ En plus d'intervenir dans le processus de transfert d'électrons dans certaines réactions d'oxydation et de catabolisme de xénobiotiques, le cytochrome b5 est impliqué dans la biosynthèse d'acide gras, de

stéroïdes, de plasmogènes et au niveau de réactions de type lyase dans les tissus sexuels.^{30,31}

L'intérêt pour le cytochrome b5 provient du fait que diverses isoenzymes du cytochrome P450 et plusieurs substrats requièrent obligatoirement la présence de ce cofacteur. Jusqu'ici, quatre mécanismes d'action permettant d'expliquer le rôle du cytochrome b5 ont été proposés. 1) Le cytochrome b5 pourrait intervenir lors du premier transfert d'électron dans le cycle catalytique de monooxydation des cytochromes P450 (transfert directement d'un électron de la NADPH-CYPb5 réductase au cytochrome P450).^{30,31} 2) Il interviendrait comme mentionné précédemment, lors du transfert du second électron.^{30,31} Il fournirait alors l'électron plus rapidement limitant ainsi le taux de formation d'anion superoxide (diminution uncoupling) et permettant une formation augmentée de produits. Cette réduction du taux de formation d'anion superoxide pourrait également s'expliquer par un complexe oxycytochrome P450 plus stable. 3) La formation d'un complexe avec les 2 hémoprotéines entre le cytochrome b5 et le cytochrome P450 permettrait d'accepter les électrons directement de la NADPH-P450 réductase.³¹ Lorsque non complexé, le cytochrome P450 accepte l'électron de la réductase, se dissocie de cette dernière, se lie avec l'oxygène et se réassocie avec la réductase afin d'accepter l'autre électron. 4) Il agirait non plus comme transporteur d'électrons mais à titre d'effecteur suggérant alors un rôle structural.^{30,32} Certaines expériences *in vitro* avec des isoenzymes purifiées ont démontré que la stimulation de l'activité catalytique pouvait également survenir avec l'apo-cytochrome b5 (dépourvu du groupement hème). À l'inverse, pour certaines isoformes du cytochrome P450, l'apo-cytochrome b5 ne pouvait remplacer le cytochrome b5.³²⁻³⁵

1.6 RÉACTIONS CATALYSÉES

Les réactions catalysées par les cytochromes P450 dépendent du substrat et de la forme du cytochrome P450. De plus, un même substrat peut être métabolisé à différentes positions et ce, par plusieurs enzymes du cytochrome P450. Les types de substrats varient selon les cytochromes P450 impliqués. Des isoenzymes catalysent des réactions qui leur sont propres et par conséquent, métabolisent des substrats qui leur sont spécifiques pour un type de réaction donné.

Une caractéristique importante de la superfamille des cytochromes P450 est le nombre élevé et la variété de réactions métaboliques catalysées via ces isoenzymes. Même en considérant les similitudes dans la structure des milliers de substrats, il demeure que le nombre de réactions est encore considérable. L'oxydation constitue la réaction la plus commune, toutefois les cytochromes P450 peuvent également catalyser des réactions inhabituelles telles que la réduction, la déhalogénéation, la déshydrogénation et plus rarement des oxydations menant à des ouvertures ou des formations de cycles.²³

1.6.1 Réactions communes

La majorité des réactions d'oxydation catalysées par les cytochromes P450 sont des hydroxylations de composés aromatiques ou aliphatiques et des N-hydroxylations de produits aminés ou des amides. La C-oxydation est la plus fréquente menant souvent à la formation d'un alcool. Bien qu'il existe des exemples de son implication dans la bioactivation de composés toxiques, l'hydroxylation du carbone est généralement considérée comme une réaction de détoxication.^{36,37} Les connaissances antérieures assumaient que plusieurs N- et S-oxydations étaient effectuées par une monooxygénase contenant la flavine (flavin-

containing monooxygenase, FMO) retrouvée dans les préparations microsomiques. Cependant, les évidences actuelles concluent que ces réactions sont également catalysées par les cytochromes P450.^{23,38} En effet, les cytochromes P450 ont aussi la capacité de catalyser des réactions d'oxydation au niveau de l'azote, du soufre, du phosphore et de l'iode.

Il existe d'autres réactions communément catalysées par les cytochromes P450 dont la désalkylation qui consiste en l'hydroxylation d'un carbone adjacent à un hétéroatome ainsi que la formation d'époxydes par des composés possédant des carbones insaturés dans leur structure.⁸ En ce qui concerne la désalkylation, il est rapporté que la libération d'un hétéroatome engendrée suite à cette réaction peut résulter tant en la bioactivation que la détoxification d'un substrat.²³ D'autre part, un intérêt particulier est porté à l'époxydation puisque les produits formés peuvent être très instables et interagir avec des macromolécules. D'ailleurs, ces réactions sont fréquemment observées dans l'activation de plusieurs composés chimiques carcinogènes par les cytochromes P450.³⁹

1.6.2 Réactions inhabituelles

Même si les cytochromes P450 ne participent pas abondamment aux réactions de réduction de composés endogènes, leur implication dans une diversité de réactions de réduction de produits endogènes demeure importante.²³ D'ailleurs, des études récentes ont démontré que les cytochromes P450 seraient impliqués dans des réactions de déshydrogénation (ou désaturation). La déshydrogénation est importante dans le métabolisme des acides gras et dans le métabolisme intermédiaire impliquant habituellement des flavoprotéines ou des protéines sans

groupement hème. Il a été rapporté que l'acide valproïque ainsi que la warfarine étaient sujets à ce type de réaction.^{40,41}

En somme, les cytochromes P450 constituent le système enzymatique en importance impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques. Ce système enzymatique est caractérisé entre autres par une versatilité importante dans les diverses réactions qu'il catalyse qui est rendue possible grâce au nombre considérable de membres, isoenzymes, qui le compose. Chez l'humain, les familles majeures impliquées dans le métabolisme des médicaments sont les CYP1, CYP2 et CYP3. La sous-famille CYP3A est de loin la famille en importance contribuant au métabolisme des médicaments.

2. CYTOCHROMES CYP3A

2.1 FAMILLE CYP3A

Les études d'induction enzymatique effectuées avec le phénobarbital ont contribué à la découverte et la caractérisation de la famille CYP3A. De fait, dans les années soixante-dix, la purification et la caractérisation des propriétés biochimiques des isoenzymes étaient limitées aux deux formes majeures connus de cytochromes P450 présents chez l'animal traité avec le phénobarbital ou le 3-méthylcholanthrène qui représentaient les deux classes d'inducteurs. Ensuite, au début des années quatre-vingt, des études ont rapporté une induction de l'enzyme nommée à ce moment P450 phénobarbital, chez des rats traités avec un stéroïde synthétique, la 16 α -carbonitrile prégnenolone.^{38,42} Le caractère inductible de cette famille constituait alors une propriété importante. Par la suite, certains chercheurs

ont porté un intérêt à la nifédipine puisque son métabolisme présentait une variabilité importante parmi les individus. Basé sur sa capacité à catalyser l'oxydation de la nifédipine, le cytochrome P450 nifédipine oxydase fut isolé chez les microsomes hépatiques humains.^{18,19} Suite à ces travaux de recherche, certaines évidences suggéreraient que le cytochrome P450 nifédipine oxydase était l'enzyme majeure responsable de l'activité hépatique chez l'humain. Ainsi, les études indiquaient que le cytochrome P450 nifédipine oxydase appartenait à la famille de cytochrome P450 dénommée auparavant P450 phénobarbital puis 16 α -carbonitrile prégnenolone et maintenant connue sous le nom de CYP3A.

Chez l'humain, les enzymes de la sous-famille CYP3A jouent un rôle dominant dans l'élimination métabolique de près de 50% des médicaments utilisés en clinique.⁴³ L'intérêt marqué pour cette famille est relié entre autres par sa contribution importante au premier passage hépatique régissant la biodisponibilité des médicaments pris par voie orale.

2.1.1 Isoenzymes de la famille CYP3A

Jusqu'à présent, quatorze différents gènes appartenant à la famille CYP3A ont été caractérisés chez le rat, la souris, le lapin, le hamster, la gerboise, le chien, le mouton, la truite, la grenouille, le singe et l'homme.⁴⁴⁻⁴⁷ Chez l'humain, au moins cinq gènes ont été identifiés incluant *3A3*, *3A4*, *3A5*, *3A7* et *3A43*.^{19,47-52} Les membres de cette sous-famille présentent une similarité supérieure à 80% dans leur séquence protéique. Les gènes *CYP3A3* et *CYP3A4* possèdent une homologie dans leur séquence d'acides aminés s'élevant à 98%.⁴⁸ D'ailleurs, le CYP3A3 est davantage considéré comme un variant allélique du CYP3A4.⁵³

Le CYP3A7 est l'enzyme majeure de la sous-famille CYP3A exprimé dans le foie du fœtus où le CYP3A4 est absent.⁵⁴ Bien que l'isoenzyme CYP3A7 ait été détectée chez quelques adultes, elle présente généralement une activité significativement réduite après la naissance.^{54,55} Le mécanisme impliqué dans la répression de l'expression du gène *CYP3A7* est inconnu. Elle a également été retrouvée dans le placenta et le tissu endométriale avec des niveaux d'ARNm et de protéines augmentés durant la grossesse et lors de certains moments spécifiques du cycle menstruel.⁵⁵

Le rôle et la contribution du CYP3A43 ne sont pas encore élucidés. Cette protéine a récemment été identifiée et détectée au niveau de la prostate, du pancréas, du rein et du foie.^{47,56} Il semble que cette isoenzyme contribuerait peu au métabolisme des xénobiotiques.⁵⁷

L'expression importante du CYP3A4 dans les principaux organes contribuant au métabolisme des médicaments ainsi que sa contribution à la biotransformation de nombreux substrats font de cette isoenzyme, l'isoforme majeure de la sous-famille CYP3A. En effet, cette isoenzyme représente plus de 30% et même jusqu'à 70% des cytochromes hépatiques totaux.⁵⁸⁻⁶¹ La présence du CYP3A4 au niveau des hépatocytes du foie et des entérocytes apicales du petit intestin contribue au rôle significatif qu'il joue dans le métabolisme présystémique des médicaments. Cette isoenzyme a aussi été retrouvée dans l'estomac, l'œsophage et le colon où elle représente respectivement 4.3%, 2.5% et 1.5% du niveau hépatique.⁶² Par ailleurs, seules des traces de l'isoenzyme CYP3A4 ont été détectées dans les reins. Une homologie s'élevant à 89% caractérise la séquence de nucléotides des CYP3A4 et CYP3A5. L'isoenzyme CYP3A5 est retrouvée dans les poumons où elle constitue l'isoforme

prédominante, dans l'estomac, les reins, et plus faiblement dans le petit intestin et le foie.⁶³⁻⁶⁶ En fait chez les caucasiens, elle n'est détectable que chez seulement 30% des foies. Toutefois, certaines études indiquent que l'isoenzyme CYP3A5 lorsqu'exprimée peut représenter jusqu'à 50% du contenu total en CYP3A.⁶⁷

2.1.2 Structure

Les isoenzymes du CYP3A sont impliquées dans un grand nombre de réactions diverses telles que l'oxydation aliphatique, l'hydroxylation aromatique, la N-désalkylation, la O-déméthylation, la S-déméthylation, la désamination oxydative, la formation de sulfoxide, la N-oxydation et la N-hydroxylation.⁶⁸ Des chercheurs expliquent la versatilité métabolique de la sous-famille CYP3A par la présence d'un large site actif permettant la liaison avec des molécules de diverses structures.⁴³ Ainsi, la grande poche proposée à titre de site actif de l'isoenzyme CYP3A4 lui permettrait de recevoir des substrats de tailles et de structures variées tout en maintenant une certaine régiosélectivité.^{69,70} D'ailleurs, la grande taille du site actif pourrait être responsable du phénomène de chevauchement dans la sélectivité des substrats observé parmi les isoenzymes CYP3A.

Certains proposent la présence de deux sites distincts, l'un liant le substrat et l'autre liant un effecteur.^{71,72} Dans ce modèle, seulement le substrat aurait accès à l'oxygène.⁷¹ D'autres suggèrent qu'il y aurait au moins deux régions structurellement séparées responsables de l'orientation du substrat et de la liaison à l'intérieur du site actif. L'une ou plusieurs de ces régions posséderaient un large domaine hydrophobe pouvant recevoir des substrats démontrant une autoactivation.⁷³ Enfin, certaines études indiquent qu'il y aurait un site actif comprenant deux sous-poches (2 pochettes à l'intérieure de la même grande

poche/site actif) pouvant lier les substrats et une région pour un effecteur.⁷⁴ En bref, ces hypothèses se rejoignent sur certains points soit, la présence d'un domaine hydrophobe important pour l'activation de l'enzyme et l'existence de l'isoenzyme CYP3A4 sous plusieurs conformations.^{73,75-77}

En général, les isoenzymes de la sous-famille CYP3A ont démontré des similitudes au niveau de la spécificité des substrats et dans leur cinétique métabolique suggérant ainsi une certaine similarité dans leur structure. De fait, plusieurs chercheurs ont trouvé des similarités dans l'activité des CYP3As avec divers substrats.⁷⁸ Cependant, il a été proposé que le CYP3A4 posséderait des conformations multiples lesquelles seraient influencées par des effecteurs allostériques. Ainsi, des observations ont rapporté que les conditions des essais *in vitro* pouvaient avoir un impact considérable sur la conformation du CYP3A4 et donc, sa capacité métabolique ce qui ne permettrait pas une comparaison adéquate entre les résultats des différentes études. De fait, une étude utilisant des conditions standards et représentatives des constituants retrouvés dans les microsomes hépatiques humains a été développée afin de décrire adéquatement les cinétiques respectives pour les isoenzymes de la sous-famille CYP3A.⁷⁹ En fait, pour comparer les activités métaboliques *in vitro* des différentes isoformes CYP3A et afin de pouvoir extrapoler leurs résultats en situation *in vivo*, des chercheurs ont reproduit un milieu d'incubation similaire aux microsomes hépatiques humains, et cela, en utilisant un ratio d'enzymes purifiées recombinantes (CYP3A4, CYP3A5 ou CYP3A7), de P450 réductase et de cytochrome b5 représentatif. Ainsi, les différences observées dans les paramètres cinétiques pour chacune des isoenzymes CYP3A sont alors attribuables aux différences dans l'activité métabolique. D'ailleurs, il est maintenant bien établi que l'activité des isoformes

CYP3A et le métabolisme de certains substrats sont sensibles aux conditions dans lesquelles sont effectuées les incubations.^{80,81}

Ainsi, malgré des taux de similitudes relativement élevés dans la composition de leurs acides aminés, les principales isoenzymes de la sous-famille CYP3A présentent des différences dans la régiospécificité de l'oxydation de différents substrats.^{78,79} En effet, des différences dans la biotransformation de certains substrats des isoenzymes CYP3As comme la testostérone, l'éthinylestradiol et le midazolam ont été observées *in vitro*.^{78,79,82} Des études ont démontré une activité métabolique généralement réduite ou égale pour le CYP3A5 et significativement inférieure pour le CYP3A7 comparativement au CYP3A4.^{78,79}

2.2 SUBSTRATS

Il est reconnu que les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 présentant plusieurs similitudes au niveau de leur structure partagent le métabolisme de plusieurs substrats. Effectivement, il existe un chevauchement dans la spécificité des substrats pour ces isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5. Jusqu'ici, il demeurait difficile de séparer leur contribution relative puisqu'aucun substrat spécifique n'a démontré pouvoir séparer leur activité respective. Par conséquent, les isoenzymes CYP3A4/5 seront traitées ensemble.

Plus de 150 médicaments sont des substrats des CYP3A4/5 tels que des anesthésiques, des antagonistes calciques, des antihistaminiques de deuxième génération, des corticostéroïdes, des immunosuppresseurs, des inhibiteurs de la protéase au VIH, des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, des modulateurs de la motilité gastrique,

le sildénafil, ainsi que certaines benzodiazépines (Tableau 1).^{25,68} Ces isoenzymes sont responsables du métabolisme non seulement de nombreux médicaments mais également de stéroïdes endogènes et de carcinogènes comme les pesticides dont le parathion et l'aldrin, le détergent non ionique Triton N-101, la mycotoxine aflatoxine B₁, le benzo(a)pyrène 7,8 diol, le 1-nitropyrene, le 6-aminochrysène, l'agent chimiothérapeutique morpholinodoxorobucin, la testostérone et l'éthinyl estradiol.^{18,25,83-91} Les antifongiques de type azole, des antibiotiques macrolides et le jus de pamplemousse ont la capacité d'inhiber l'activité des CYP3A4/5. Quelques agents pharmacologiques et des produits naturels sont des inducteurs des isoenzymes CYP3A4/5, dont les barbituriques, la carbamazépine, la phénytoïne, le rifampin et le millepertuis.^{25,68}

2.3 VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE

Une variabilité interindividuelle dans le contenu ou la fonction de l'enzyme peut avoir un impact important sur le devenir du médicament dans l'organisme et potentiellement affecter son profil d'efficacité et de toxicité. L'activité catalytique des isoenzymes CYP3A4/5 varie largement parmi les individus. En effet, l'expression de cette protéine peut varier jusqu'à 40 fois entre différents foies et tissus intestinaux (figure 4).^{62,92,93} De plus, il est possible de retrouver des variations dans son activité pouvant s'élever de 90 fois.⁹⁴ La variabilité dans l'expression des CYP3A4 et CYP3A5 sont le reflet complexe de facteurs environnementaux et génétiques. La présence de ces facteurs contribue probablement à ces variabilités observées dans la cinétique de plusieurs substrats des CYP3A4/5.

Tableau 1. Liste des principaux médicaments

CYP3A4/5				
<i>Inhibiteur</i>	<i>Substrats</i>			<i>Inducteurs</i>
	<i>Élevée</i>	<i>Affinité Intermédiaire</i>	<i>Faible</i>	
Érythromycine <i>Clarithromycine</i> Télithromycine Troléandomycine Fluconazole Kétoconazole Itraconazole Métronidazole Miconazole Jus de pamplemousse	Amiodarone Diltiazem Vérapamil Indinavir Nelfinavir Ritonavir Saquinavir	Féلودipine Nifédipine Nicardipine Nimodipine Atorvastatine Lovastatine Simvastatine Buspirone Néfazodone Sertraline Cyclosporine Dapsone Étoposide Tamoxifène	Alprazolam Diazépam Midazolam Triazolam Citalopram Mirtazapine Trazodone Pimozide Quétiapine Alfentanyl Fentanyl Méthadone Astémizole Terfénadine Cisapride Dompéridone Dexaméthasone Méthylprednisolone Éthinyl estradiol Testostérone Irinotecan Paclitaxel Tacrolimus Cérvastatine Pravastatine Amlodipine Bromocriptine Carbamazépine Clopidogrel Dextrometorphan Ergotamine Finastéride Granisétron Lidocaine Sildénafil	Barbituriques Carbamazépine Dexaméthasone Phénytoïne Rifampin Troglitazone

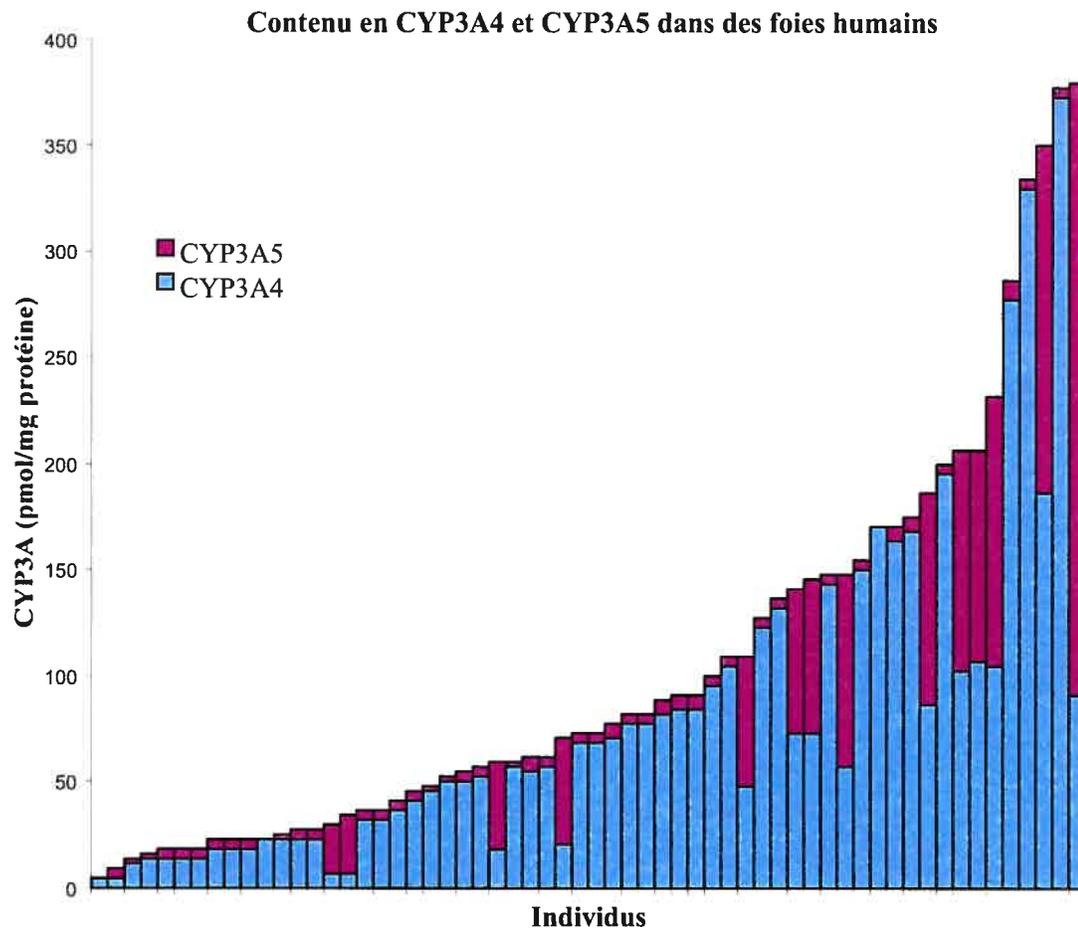


Figure 4. Variabilité dans l'expression des isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 dans des foies de différents individus. (adapté de Lin et al).^a

^a Lin Y S, Dowling S, Quigley S D, Farin F M, Zhang J, Lamba J, Schuetz E G, Thummel K E. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002;62:162-72.

2.3.1 Jus de pamplemousse

De nombreuses études ont démontré la capacité du jus de pamplemousse à augmenter la biodisponibilité orale des médicaments en inhibant leur métabolisme au niveau présystémique. Plusieurs furocoumarines contenues dans le jus de pamplemousse dont les plus abondantes sont le bergamottin et le 6',7'-dihydrobergamottin constituent des inhibiteurs efficaces de l'activité *in vitro* des CYP3A4/5.⁹⁵ *In vivo*, il semble qu'une combinaison de plusieurs composés serait importante.⁹⁵ En effet, l'inhibition des CYP3A4/5 ne peut pas être attribuée qu'au bergamottin puisque le jus de lime concentré en bergamottin produit moins d'interaction avec la félodipine, substrat des CYP3A4/5, comparativement au jus de pamplemousse.⁹⁵ Cet effet paraît spécifique au jus de pamplemousse puisque les autres jus dérivés de citrus tels que l'orange et l'orange de Séville n'affectent pas l'activité des isoenzymes CYP3A4/5.⁹⁶⁻⁹⁸

Les médicaments administrés par voie orale et possédant un haut coefficient d'extraction hépatique sont davantage affectés par la prise concomitante de jus de pamplemousse. Par exemple, la simvastatine dont la biodisponibilité est d'environ 5% peut voir ses concentrations plasmatiques s'élever de vingt fois suite à l'inhibition de son métabolisme par le jus de pamplemousse. À l'inverse, la prise de jus de pamplemousse n'affecte pas les paramètres pharmacocinétiques de la cyclosporine ou du midazolam suivant leur administration par voie intraveineuse.^{99,100} Cet exemple indique que les médicaments avec une biodisponibilité faible à modérée seront davantage affectés par les interactions qui modifieront leur premier passage hépatique et par conséquent, entraîneront une augmentation de leur concentration maximale. De plus, le meilleur effet sur la biodisponibilité orale est observé lorsque le jus de

pamplemousse est administré quelques heures avant ou en concomitance avec le médicament.¹⁰¹

2.3.2 Produits naturels

Depuis longtemps, l'ail est utilisé pour ses propriétés médicinales dont son activité chimiopréventive contre le cancer. L'un des mécanismes d'action proposé par lequel l'ail et ses constituants pourraient avoir cet effet protecteur est relié à une modulation de l'activité des enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques.^{102,103} Une étude rapporte que les isoenzymes CYP3A4/5 sont induites suivant l'administration de diallisulfide, un composant de l'ail.¹⁰⁴

L'huile de menthe poivrée utilisée pour divers troubles gastrointestinaux serait un inhibiteur potentiel et réversible des isoenzymes CYP3A4/5.¹⁰⁵ En fait, l'huile de menthe poivrée et certains de ses constituants tels que le menthyl acétate et le menthol constituent des substrats avec une affinité élevée pour ces isoenzymes. Les kavalactones de *Piper methysticum*, soit le Kava-Kava qui est un produit naturel utilisé pour ses propriétés anxiolytiques, inhibent également l'activité des CYP3A4/5.¹⁰⁶

Depuis quelques années, le millepertuis (*Hypericum perforatum*) grâce à ses propriétés d'antidépresseur naturel connaît une popularité importante auprès de la population. Une induction de l'activité catalytique des CYP3A4/5 hépatiques et intestinales a été observée suite à l'administration continue de millepertuis.^{105,107,108} Les propriétés inductrices des extraits d'*Hypericum* seraient causées par l'hyperforin et possiblement l'adhyperforin.¹⁰⁷ D'après des études effectuées *in vitro*, certains chercheurs suggèrent que l'hyperforin, un composant liposoluble abondamment retrouvé dans le millepertuis, en se liant au récepteur

nucléaire PXR (steroid pregnane receptor), entraîne une induction significative des CYP3A4/5.^{108,109} La co-administration de millepertuis avec d'autres médicaments substrats des CYP3A4/5 peut avoir des répercussions majeures sur la réussite d'un traitement pharmacologique. En effet, chez des patients ayant subi une transplantation, des rejets d'organes ont été rapportés suivant l'administration concomitante de millepertuis et de cyclosporine, un immunosuppresseur.^{110,111}

2.3.3 Facteurs endogènes

Les cytokines dont les interleukines, les facteurs cytotoxiques et les interférons sont impliqués en phase aiguë de la réponse à une infection, l'inflammation ou encore une blessure.¹¹² Il a été démontré que les niveaux de cytokines dont les interleukines IL1, IL2, IL6 et IL10, le facteur de nécrose tumorale (TNF α) et l'interféron γ ont diminué significativement l'activité des CYP3As.¹¹³⁻¹¹⁹ De plus, la présence de maladies inflammatoires de l'intestin de même que la cirrhose hépatique sont connues comme des facteurs pouvant diminuer le contenu et l'activité des isoenzymes CYP3A4/5 dans ces tissus.^{120,121} Également, l'insuffisance rénale a été associée à une réduction de la clairance hépatique pour des médicaments métabolisés par les CYP3A4/5.¹²² Certains chercheurs ont suggéré que l'accumulation de toxines urémiques pourraient affecter des fonctions hépatiques tels que les enzymes CYP3As, soit en diminuant le contenu enzymatique ou encore en inhibant l'accessibilité des médicaments à l'intérieur des hépatocytes.¹²²

2.3.4 Facteurs environnementaux

Puisqu'il existe peu de données concernant l'influence des facteurs environnementaux sur les CYP3A4/5 hépatiques et intestinaux, seule l'isoenzyme CYP3A5 pulmonaire sera traitée dans cette section. Le CYP3A5 pulmonaire est régulé par des médicaments, des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques. En effet, des études ont démontré que l'isoenzyme CYP3A5 est induite par des glucocorticoïdes synthétiques comme les médicaments utilisés dans le traitement de l'asthme. De plus, cette isoenzyme est impliquée dans la biotransformation de certains composés procarcinogènes contenus dans la fumée de cigarette (PAH et 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone). Des chercheurs ont émis alors l'hypothèse que l'isoenzyme CYP3A5 pulmonaire induite *in vivo* par les glucocorticoïdes pourrait contribuer à la susceptibilité de développer un cancer du poumon chez les patients utilisant des glucocorticoïdes inhalés ou systémiques.¹²³⁻¹²⁵ Par ailleurs, il est rapporté que la fumée de cigarette diminuait les niveaux de CYP3A5 dans les macrophages alvéolaires par un mécanisme encore inconnu.^{123,126} Ainsi, l'expression de cette isoenzyme chez le fumeur était seulement à 7% du niveau de CYP3A5 retrouvé chez le non-fumeur.¹²³

2.3.5 Génétique

La notion de polymorphisme génétique fait référence à une variabilité déterminée par des facteurs héréditaires dans la capacité métabolique des différentes isoenzymes.

CYP3A4

Contrairement à d'autres cytochromes P450 humains impliqués dans le métabolisme des médicaments comme les *CYP2C9*, *2C19* et *2D6*, l'isoenzyme *CYP3A4* ne semble pas subir l'influence de polymorphismes génétiques. Il n'y a pas d'évidence d'allèle nul pour le gène *CYP3A4* et les résultats d'études récentes suggèrent une contribution limitée des différents variants du *CYP3A4* dans la variabilité de l'activité de cette isoenzyme chez les caucasiens.¹²⁷

L'activité de l'isoforme *CYP3A4* est corrélée avec les concentrations d'ARNm du *CYP3A4*, indiquant ainsi que le contrôle transcriptionnel est le mécanisme primaire pour la régulation de l'expression du *CYP3A4*.⁶⁷ Les régions promotrices des *CYP3A4*, *CYP3A5* et *CYP3A7* contiennent plusieurs sites de liaison pour des facteurs transcriptionnels.^{48,128} D'ailleurs, un récepteur nucléaire récemment découvert, soit le PXR/SXR, (pregnane X-receptor/steroid and xenobiotic receptor) semble important dans la régulation de la protéine *CYP3A4*.^{129,130}

Des chercheurs avaient émis l'hypothèse que des polymorphismes affectant l'activité du *CYP3A4* pourraient être présents dans les séquences régulant l'ADN. Parmi les six SNP identifiés, soit *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*1C*, *CYP3A4*1D*, *CYP3A4*1E*, *CYP3A4*1F* et *CYP3A4*15B*, seul le *CYP3A4*1B* a été étudié afin d'évaluer son effet sur l'activité catalytique *in vivo*, étant donné que les autres variants alléliques possèdent une fréquence très faible chez les caucasiens.⁵⁷ La fréquence allélique *CYP3A4*1B* varie parmi les différentes ethnies : absente chez les chinois, les chinois-américains et japonais-américains, 2-10% les caucasiens, 9-11% les hispano-américains et 35-67% les africain-américains.¹³¹⁻¹³⁶

L'allèle *CYP3A4*1B* avait été originalement associé à une activité altérée du CYP3A4 hépatique, cependant cette hypothèse demeure très controversée.^{131,132,137,138} Comme les allèles *CYP3A4*1B* et *CYP3A5*1* peuvent être présents chez un même individu, il fut alors proposé que le génotype du CYP3A5 serait le facteur déterminant influençant l'activité fonctionnelle du CYP3A. D'ailleurs, différentes études n'ont pu associer véritablement des modifications dans le métabolisme des substrats CYP3A avec la présence de *CYP3A4*1B*. Cependant, la littérature rapporte une association de ce variant avec diverses maladies incluant le cancer de la prostate, des leucémies et une puberté précoce.^{132,139-142}

Jusqu'à présent, 18 mutations ont été identifiées dans la région codante du gène *CYP3A4*. La fréquence allélique est relativement faible dans la plupart des populations étudiées (<5%) et ce, surtout dans la population caucasienne (<1%).^{127,135,136,143,144} Les changements observés dans l'activité catalytique du CYP3A4 parmi les différents variants alléliques de la région codante sont modestes à nuls.^{127,135,136,145} Considérant l'influence modeste et la faible fréquence allélique de ces variants, il semble que ces mutations ne constituent pas une cause importante dans la variabilité interindividuelle observée pour le CYP3A4 dans la population.

CYP3A5

Depuis plusieurs années déjà, l'expression polymorphique du *CYP3A5* chez l'humain est reconnue. Certaines expériences indiquent une grande variation dans l'expression de l'isoenzyme CYP3A5. En effet, des analyses d'immunobuvardage et de Northern blot ont détecté l'expression du *CYP3A5* chez

seulement 10 à 30% des foies humains.^{52,82,146} Le polymorphisme du *CYP3A5* s'étend parmi les différentes ethnies; 10-30% des caucasiens, 30% des japonais et 50-60% des africain-américains expriment l'isoenzyme.

La mutation la plus fréquente se situe dans un intron et correspond à l'allèle *CYP3A5*3*. Cette mutation crée un site d'épissage alternatif dans le pré-ARNm produisant alors un ARNm aberrant occasionné par l'apparition précoce d'un codon stop. Les individus homozygotes pour l'allèle *CYP3A5*3* présentent un niveau de protéine CYP3A5 faible à nulle.⁶⁷ Il possède une fréquence allélique variant selon les ethnies : 27-50% Africain-américains, 70-90% Caucasiens, 71-85% Japonais, 65-75% Chinois, 75% Coréens et 75% Mexicains.^{67,147-150} Ce variant allélique est actuellement plus prévalent que l'allèle sauvage, le *CYP3A5*1*, pour la majorité des populations. La fréquence de l'allèle sauvage s'élève à 10-30% chez les Caucasiens, 50% les Africain-américains, 25-35% les Chinois, 15% les Japonais, 25% les Mexicains et 60% les Indien-américains comparé à 41% chez les Indiens.^{67,94,149-151} Seuls les individus avec au moins un allèle sauvage *CYP3A5*1* expriment de grandes quantités de l'enzyme. Lorsqu'exprimée, l'isoenzyme CYP3A5 représente plus de 50% du contenu total hépatique en CYP3A.⁶⁷ Ainsi, chez les individus avec un allèle *CYP3A5*1*, le CYP3A5 contribue significativement au contenu en CYP3A de même qu'à l'activité catalytique.

L'allèle *CYP3A5*6* a été identifié chez seulement 13% d'Africain-américains et était absent auprès des Caucasiens, des Japonais et des Chinois.^{67,94,149,150} Ce variant allélique génère un ARNm dans lequel un exon est épissé. La délétion de l'exon résulte en une protéine tronquée. Quant à l'allèle *CYP3A5*2*, il n'a été rapporté que dans une seule étude suggérant que cette

mutation est le résultat d'un changement d'acide aminé, T398A, qui affecterait la stabilité de la protéine CYP3A5 et serait ainsi responsable du faible contenu hépatique de la protéine. Sa fréquence allélique était de 1,9% chez les Caucasiens.¹⁵² Il existe plusieurs autres mutations pour le gène CYP3A5, cependant elles sont beaucoup plus rares (*CYP3A5*4*, *CYP3A5*5* et *CYP3A5*7*).

2.4 SUBSTRATS MARQUEURS

Les isoenzymes CYP3A4/5 en plus d'être responsables du métabolisme de nombreux médicaments, possèdent plusieurs substrats communs. De plus, ces isoenzymes présentent une variabilité interindividuelle importante dans la réponse pharmacologique à une thérapie médicamenteuse. Cette variabilité peut être attribuée entre autres à des facteurs génétiques, environnementaux et pathophysiologiques. Bien que les CYP3A4 et CYP3A5 aient des activités catalytiques similaires, elles peuvent se distinguer par leur clairance intrinsèque pour divers substrats et leur régiospécificité. Étant donné que ces différences interindividuelles ont des implications majeures dans le succès d'un traitement pharmacologique et déterminent également la susceptibilité à certaines maladies, le génotypage et/ou le phénotypage deviennent des outils importants en clinique. Bien qu'il soit plus ardu à réaliser que le génotype, le phénotype fournit une information clinique plus complète puisqu'il donne un reflet de tous les facteurs combinés tels que l'environnement, la génétique, l'alimentation et les facteurs endogènes pouvant affecter l'activité de l'isoenzyme. De plus, sachant que l'isoforme CYP3A4 ne subirait pas l'influence de polymorphismes, soit une distribution unimodale caractérisant l'activité catalytique du CYP3A4, les différences interindividuelles sont davantage influencées par des facteurs

environnementaux ou endogènes et par conséquent, le phénotype s'avère l'outil plus approprié. Jusqu'à aujourd'hui, quelques substrats marqueurs ont été proposés afin de caractériser l'activité du CYP3A4/5. Toutefois, aucun ne permet de distinguer précisément l'activité entre le CYP3A4 et le CYP3A5.

2.4.1 Définition

Le terme de substrat marqueur a été introduit en pharmacologie clinique pendant les années soixante-dix, au moment où émane un intérêt marqué pour les facteurs influençant l'activité catalytique des enzymes impliquées dans le métabolisme des drogues.¹⁵³ Un substrat marqueur fournit une information précise dans le temps sur l'activité catalytique générale de l'enzyme permettant une extrapolation du taux de métabolisme pour d'autres substrats de cette même enzyme. Idéalement, le métabolisme du substrat marqueur est spécifique à une isoenzyme, son utilisation *in vivo* est sécuritaire chez l'humain, les prélèvements du substrat et son (ses) métabolite(s) à partir de liquides biologiques sont fiables et faciles à exécuter et sa pharmacocinétique est principalement déterminée par son métabolisme et non par le débit sanguin hépatique (un substrat à faible coefficient d'extraction hépatique est indépendant du débit) ou sa liaison protéique.¹⁵³

2.4.2 Substrats marqueurs CYP3A4/5 proposés

Midazolam

Le métabolisme du midazolam, une benzodiazépine dont les voies d'élimination prédominantes sont la 1'-hydroxylation et la 4-hydroxylation, est essentiellement médié par les isoenzymes du CYP3A.^{78,154} Le métabolite

principal retrouvé dans l'urine et le plasma est le métabolite conjugué du 1'-hydroxymidazolam représentant plus de 90% de l'hydroxylation totale.^{155,156} Suivant la prise orale de midazolam, une estimation de l'activité intestinale et hépatique des CYP3A4/5 est possible alors que l'administration intraveineuse donne le reflet de l'activité hépatique seulement. Une évaluation précise de la clairance du midazolam suivant une administration tant orale qu'intraveineuse requiert une collecte de plusieurs échantillons plasmatiques. Différents ratios plasmatiques ont été étudiés dont le ratio du 1'-hydroxymidazolam/midazolam, 1'-hydroxymidazolam/4-hydroxymidazolam ou encore 1'-hydroxymidazolam + 4-hydroxymidazolam/midazolam afin de prédire le plus précisément l'activité des CYP3A4/5. Étant donné que la détermination de la clairance totale du midazolam requiert plus de huit échantillons plasmatiques, une étude a été réalisée afin d'évaluer la possibilité d'utiliser un ratio métabolique urinaire de midazolam suite à son administration intraveineuse. Les résultats ont été plutôt décevants suggérant que l'utilisation du ratio métabolique urinaire du midazolam ne constitue pas une mesure précise de l'activité CYP3A hépatique. Ceci s'expliquerait principalement en raison du faible recouvrement urinaire du midazolam et de ses métabolites.¹⁵⁷ Il est important de mentionner que le midazolam possède un coefficient d'extraction hépatique intermédiaire et par conséquent, son élimination sera alors influencée par sa clairance intrinsèque, sa fraction libre mais aussi par le débit sanguin hépatique lors d'une administration intraveineuse.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Le midazolam serait métabolisé par l'isoenzyme CYP3A5 avec une constante d'affinité (K_m) similaire à celle du CYP3A4 mais posséderait une activité catalytique différente pour chacune des isoenzymes.¹⁶¹ Il semble que le

CYP3A5 catalysent préférentiellement la 1'-hydroxylation du midazolam.^{78,162} D'ailleurs, une étude rapporte que le ratio des métabolites 1'-hydroxylé et 4-hydroxylé est influencé par la concentration du midazolam et du type d'isoenzymes CYP3A.¹⁶³ En effet, suite à des incubations *in vitro* de midazolam à 8 µM en présence de sources enzymatiques CYP3A purifiées, le ratio 1'-hydroxymidazolam/4-hydroxymidazolam obtenu avec des CYP3A4 purifiés (supersomes CYP3A4) est d'environ 2.9 fois inférieur au ratio obtenu avec des CYP3A5 purifiés (supersomes CYP3A5).⁶⁷ De plus, la valeur moyenne du ratio 1'-hydroxymidazolam/4-hydroxymidazolam est plus élevée dans les foies de caucasiens avec au moins un allèle sauvage *CYP3A5*1* que celle mesurée avec des foies d'individus possédant deux allèles mutants *CYP3A5*3*. Cependant à faible concentration, la clairance *in vitro* pour la formation du métabolite 1'-hydroxymidazolam était similaire pour le CYP3A4 et le CYP3A5.⁷⁹

Une problématique importante de l'utilisation du midazolam est la survenue d'effets indésirables non négligeables. De fait, à des concentrations de 80ng/ml, le patient présente de la sédation, de l'ataxie, de l'amnésie et une relaxation musculaire.¹⁶⁴ Également, le recours à plusieurs collectes sanguines limite son utilisation. Pour y remédier, certains chercheurs ont évalué la possibilité d'utiliser une seule prise de sang afin de prédire la clairance du midazolam chez l'individu.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Les résultats des différentes études sont contradictoires. Alors qu'une étude démontre qu'une collecte unique de sang 4 heures suivant l'administration de midazolam constitue un reflet adéquat de son métabolisme, d'autres chercheurs concluent qu'un échantillonnage plasmatique unique n'est pas représentatif de la clairance du midazolam.^{165,166}

Érythromycine

La voie d'élimination prédominante de l'érythromycine, un antibiotique macrolide, semble être la N-déméthylation qui serait médiée exclusivement par les CYP3A4/5.¹⁶⁸ Une étude subséquente suggérait que la N-déméthylation ne paraissait pas être catalysée par le CYP3A5 toutefois rien ne permet encore de croire en cette spécificité absolue.⁸² Le test respiratoire à l'érythromycine afin de déterminer le phénotype nécessite une procédure particulière. L'érythromycine marquée au carbone (¹⁴C) est administrée par voie intraveineuse. Par la suite, l'activité des CYP3A4/5 est déterminée par la production de gaz carbonique marqué (¹⁴CO₂) dans le gaz expiré résultant de la N-déméthylation de ce substrat marqueur. Actuellement, le test respiratoire à l'érythromycine est considéré comme l'une des meilleures méthodes disponibles pour mesurer l'activité *in vivo* des CYP3A4/5 hépatiques. Cependant, ce test ne mesure pas l'activité intestinale des CYP3A4/5. Par conséquent, cette méthode ne peut prédire adéquatement le métabolisme des substrats à haut coefficient d'extraction hépatique administrés par voie orale. Par ailleurs, l'érythromycine étant un substrat des glycoprotéines-P, transporteurs membranaires situés entre autres au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales des intestins, son administration intraveineuse permet d'éliminer ce facteur confondant pouvant influencer les résultats obtenus car ces transporteurs ont pour rôle principal de minimiser l'absorption systémique du médicament.

Dextrométorphane

Le dextrométorphane, un antitussif dérivé de la codéine, est métabolisé *in vivo* en dextorphan et en 3-méthoxymorphinan par O- et N-déméthylation

respectivement. La formation du métabolite 3-méthoxymorphinan semble médiée principalement par la sous-famille CYP3A.¹⁶⁹ Ainsi, certains chercheurs ont évalué la possibilité d'utiliser le ratio métabolique urinaire du dextrométorphane.¹⁷⁰ L'utilisation du dextrométorphane présentait l'avantage de pouvoir mesurer simultanément l'activité des isoenzymes CYP2D6 par le ratio urinaire dextrométorphane/dextorphan et CYP3A par le ratio dextrométorphane/3-méthoxymorphinan.¹⁷⁰ En plus de ne pouvoir différencier l'activité de CYP3A4 et CYP3A5, des études sur la N-déméthylation de cet antitussif ont démontré que les isoenzymes CYP2B6, CYP2C8 et CYP2C18 contribuaient aussi à la formation du 3-méthoxymorphinan.^{171,172}

Vérapamil

Des chercheurs se sont intéressés à l'utilisation du vérapamil, un antagoniste des canaux calciques fréquemment prescrits, à titre de substrat marqueur des CYP3A4/5.^{173,174} Chez l'humain, le principal métabolite, le norvérapamil, est formé par N-déméthylation via les isoenzymes CYP3A4/5.^{175,176} Suivant l'administration orale et intraveineuse de vérapamil, ses clairances orale et intraveineuse sont déterminées par un ratio de la dose et de l'aire sous la courbe du vérapamil ($Dose/AUC_{\text{vérapamil}}$) ainsi qu'un ratio plasmatique des aires sous la courbe du norvérapamil et du vérapamil ($AUC_{\text{norvérapamil}}/AUC_{\text{vérapamil}}$).¹⁷³ La clairance suite à l'administration intraveineuse de vérapamil est le reflet du métabolisme hépatique alors que suite à la prise orale, la clairance obtenue comprend le métabolisme hépatique et intestinal. Contrairement au test respiratoire à l'érythromycine, le recours à la radioactivité n'est pas nécessaire avec le vérapamil. Son utilisation chez l'individu a cependant causé des

réductions de pression sanguine et des prolongations de la conduction auriculo-ventriculaire.¹⁷⁷

Cortisol

La 6 β -hydroxylation du cortisol est catalysée par le CYP3A4 et moindrement par le CYP3A5.^{178,179} L'utilisation d'un composé endogène comme substrat marqueur constitue la méthode la plus simple et facile à réaliser car elle n'implique pas l'administration d'aucun agent. Une étude a démontré que l'excrétion urinaire du 6 β -hydroxycortisol de même que le ratio des concentrations urinaires 6 β -hydroxycortisol en 17-hydroxycorticostéroïdes est un reflet de l'induction par le rifampin de l'activité des CYP3As.¹⁸⁰ De fait, les résultats de nombreuses études évaluant la 6 β -hydroxylation du cortisol comme marqueur suggèrent son utilisation pour mesurer l'induction du CYP3A. Cependant, cette mesure semble peu valable pour estimer l'activité basale des isoenzymes CYP3A4/5.

Dapsone

Le dapsone a été l'un des premiers substrats marqueurs de l'activité du CYP3A proposés. La formation du dapsone hydroxylamine par N-hydroxylation constitue l'une des voies métaboliques du dapsone.^{181,182} Les premières études *in vitro* démontraient que plus de 90% du dapsone hydroxylamine était catalysée par les CYP3A4/5.¹⁸² Subséquemment, une étude effectuée avec des concentrations physiologiques de dapsone a démontré que la formation du dapsone hydroxylamine corrélait significativement avec l'isoenzyme CYP2E1.¹⁸³ À l'exception d'une seule, les études n'ont trouvé aucune corrélation significative

entre le ratio métabolique urinaire de dapsoné (dapsoné hydroxylamine/ dapsoné hydroxylamine + dapsoné) et l'activité des CYP3As.^{181,184}

Testostérone

Depuis longtemps, l'hydroxylation des stéroïdes est connue comme une réaction majoritairement catalysée par les isoenzymes du CYP3A. Des études *in vitro* ont démontré qu'à des concentrations de testostérone inférieures à 250 µM, la 6β-hydroxylation de la testostérone est métabolisée principalement par les isoenzymes CYP3A4/5.^{185,186} D'ailleurs, les résultats d'une étude effectuée avec des sources enzymatiques purifiées de CYP3As (supersomes CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7) rapportent que tous les membres de la sous-famille CYP3A catalysent la testostérone par 6β-hydroxylation.¹⁸⁷ De plus, les isoenzymes CYP2C9 et CYP2C19 bien qu'à un taux beaucoup moindre peuvent aussi catalyser cette réaction. Ce substrat marqueur ne permet pas de distinguer l'activité du CYP3A4 et CYP3A5.

3. INTERACTIONS MÉDICAMENTEUSES

3.1 TYPES D'INTERACTIONS

Une connaissance approfondie du métabolisme des médicaments est capitale puisqu'il détermine en grande partie le devenir du médicament dans l'organisme, la variabilité interindividuelle et les interactions médicamenteuses qui auront tous un impact majeur dans la réponse à un traitement pharmacologique. Une interaction médicamenteuse cliniquement significative

survient lorsque l'efficacité ou le profil de toxicité du médicament est affecté par l'administration concomitante d'une autre substance.¹⁸⁸ Actuellement, une approche thérapeutique combinant plusieurs médicaments est une pratique courante, particulièrement chez les patients avec de multiples pathologies. Alors que l'administration de plusieurs médicaments a pour objet de traiter adéquatement les différentes maladies, les gens sont davantage exposés à des risques d'interactions médicamenteuses. Les effets indésirables aux médicaments secondaires aux interactions médicamenteuses constituent un problème considérable dans la pratique médicale. Des études démontrent qu'environ 5% des hospitalisations et 4,6% des décès annuels pourraient être reliés à une utilisation inappropriée des médicaments, incluant les interactions médicamenteuses.¹⁸⁹⁻¹⁹¹

Les bénéfices cliniques de thérapies combinées sont bien démontrés, d'où l'intérêt de connaître et de maîtriser les mécanismes régissant les interactions médicamenteuses. En fait, il existe deux mécanismes généraux d'interactions médicamenteuses, soit celles d'origine pharmacocinétique et/ou d'origine pharmacodynamique. Brièvement, la pharmacodynamie décrit la relation entre la concentration du médicament et ses effets tandis que la pharmacocinétique désigne la relation entre la dose administrée et les concentrations dans l'organisme.

Une interaction pharmacodynamique survient lorsqu'un changement dans l'effet du médicament se manifeste sans que sa concentration au site d'action ne soit altérée. Ainsi dans ce type d'interaction, l'administration concomitante de deux substances peut causer une compétition pour le même site d'action entraînant une augmentation, une diminution ou encore une annulation de l'effet. Au contraire, lors d'une interaction pharmacocinétique, les concentrations au site

d'action sont affectées par une autre substance. L'interaction pharmacocinétique résulte fréquemment d'une altération des mécanismes responsables de l'élimination du médicament dont les isoenzymes du cytochrome P450 qui représentent le mécanisme majeur d'élimination des drogues. Plus rarement, elle peut être causée par un changement au niveau de son absorption ou de sa distribution.

En plus des interactions médicamenteuses qui peuvent résulter en une altération de l'activité catalytique des cytochromes P450, plusieurs substances peuvent affecter directement l'activité de ces isoenzymes. Une réduction ou une augmentation de l'activité d'une isoenzyme peut survenir suite à leur administration.

3.2 DÉFINITIONS

3.2.1 Substrat

Le substrat se définit comme une molécule endogène ou exogène sur laquelle une enzyme exerce son activité catalytique. En fait, la molécule présente une affinité pour une isoenzyme particulière qui effectue une modification de la structure chimique de cette molécule. Quant aux métabolites, ils sont le résultat des produits formés par l'ensemble des réactions biochimiques sur le substrat.

3.2.2 Inducteur

L'effet d'un inducteur entraîne une élévation de l'activité d'une isoenzyme en augmentant généralement la concentration intracellulaire de l'enzyme induite. Lorsqu'un substrat est administré en concomitance avec un inducteur, il peut

présenter un métabolisme augmenté et des concentrations plasmatiques plus faibles secondairement à l'induction de son métabolisme. L'augmentation du niveau de l'enzyme induite est souvent le résultat d'une transcription augmentée du gène associé à cette protéine.^{61,192} En général, il semble que le terme d'induction soit restreint aux situations dans lesquelles la synthèse protéique est stimulée.¹⁹³ L'induction des isoenzymes peut également être causée par des mécanismes non-transcriptionnels comme une diminution du taux de dégradation de la protéine.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶ Les isoenzymes du cytochrome P450 ne sont pas toutes sujettes à l'induction, par exemple il n'existe pas encore d'inducteur connu pour le CYP2D6. De plus, il existe des différences importantes entre les espèces dans la réponse des isoenzymes à divers inducteurs. En fait, un composé induisant une isoforme particulière chez un animal donné n'induirait pas nécessairement cette enzyme chez l'humain, et l'inverse s'applique aussi.¹⁹⁷

3.2.3 Inhibiteur

Certains composés ont la capacité de réduire l'activité catalytique d'une isoenzyme. Par conséquent, l'administration concomitante d'un inhibiteur avec un substrat tend à favoriser l'accumulation de ce dernier dans l'organisme due à l'inhibition de son métabolisme. Alors que le phénomène d'induction est un processus lent, l'inhibition des cytochromes P450 est souvent une réponse immédiate. Il faut noter qu'un inhibiteur d'une isoenzyme donnée n'est pas nécessairement un substrat de cette dernière, c'est-à-dire qu'il n'est pas obligatoirement biotransformé par cette isoforme. Par ailleurs, un substrat représente toujours un inhibiteur potentiel envers un autre substrat d'une même isoenzyme. En fait, l'administration de deux substrats dont le métabolisme est

catalysé via la même enzyme peut entraîner une compétition pour celle-ci. Cette compétition est influencée par l'affinité de chacun des substrats pour l'isoenzyme donnée ainsi que par leurs concentrations respectives au site enzymatique.

La constante d'affinité (K_m) mesure l'affinité d'un substrat pour une isoenzyme particulière. Par ailleurs, la principale mesure de puissance d'inhibition d'un composé est la constante d'inhibition (K_i) laquelle exprime l'affinité de la molécule pour une isoenzyme.¹⁵³ Ainsi, plus la valeur de la constante d'affinité est petite et plus le substrat démontre une forte affinité envers le substrat. Parallèlement, plus la valeur de la constante d'inhibition est petite et plus la puissance de cet inhibiteur sera élevée. Dans la situation où un substrat sert d'inhibiteur potentiel envers un autre composé, alors la constante d'affinité (K_m) fournira un indice de la puissance d'inhibition potentielle de la même façon que le K_i . Il faut toutefois mentionner que les constantes d'affinité et d'inhibition représentent deux entités distinctes.

Parmi les différentes étapes du cycle catalytique des cytochromes P450, les plus vulnérables à l'inhibition de l'activité enzymatique sont la liaison du substrat avec l'isoenzyme, la liaison de l'oxygène avec l'enzyme et l'oxygénation du substrat où l'oxygène activé est transféré de l'hème au substrat.^{193,197} Le transfert des électrons des CYP450-réductases à l'isoenzyme lequel survient suivant la liaison du substrat et après la liaison de l'oxygène à l'enzyme, est aussi une cible des inhibiteurs.¹⁹³ Habituellement, ces inhibiteurs interfèrent avec le transfert d'électrons en acceptant l'électron directement de la CYP450-réductase.¹⁹³

3.3 TYPES D'INHIBITION ENZYMATIQUE

Les mécanismes d'inhibition des cytochromes P450 sont divisés en trois grandes catégories dont l'inhibition réversible, quasi-réversible et irréversible. L'inhibition réversible représente le mécanisme le plus fréquemment responsable des interactions médicamenteuses.¹⁹³ Généralement, les inhibitions interférant avec le cycle catalytique avant la formation de l'oxygène activé sont réversibles. Par ailleurs, les inhibiteurs agissant durant ou suivant le transfert de l'oxygène sont souvent quasi-réversibles ou irréversibles. Une interaction réversible produit une compétition au site actif de l'isoenzyme et implique probablement une seule étape du cycle catalytique alors que les inhibitions irréversibles et quasi-irréversibles requièrent au moins un cycle du processus catalytique de l'enzyme.¹⁹⁷

3.3.1 Inhibiteurs Réversibles

De puissants inhibiteurs réversibles sont des composés dérivés d'imidazoles et de pyridines.^{193,197} En présence d'une inhibition réversible, les fonctions métaboliques normales de l'enzyme se poursuivront suivant l'élimination de l'inhibiteur. L'inhibition réversible est seulement concentration-dépendante contrairement aux inhibitions quasi-irréversible et irréversible qui sont concentration et temps-dépendantes.¹⁹⁸ De plus, les inhibiteurs réversibles peuvent être classifiés comme compétitifs, non-compétitifs et incompétitifs principalement.

Compétitifs

Lors d'une inhibition compétitive, la liaison de l'inhibiteur avec l'isoenzyme prévient la liaison du substrat avec le site actif de cette dernière.

L'inhibiteur démontre généralement des similarités dans sa structure avec les substrats de cette enzyme. Une inhibition compétitive peut résulter de la liaison de l'inhibiteur avec le groupement prosthétique de la protéine mais aussi de la liaison à un domaine lipophile de l'enzyme.⁶¹

Un substrat peut constituer un inhibiteur compétitif. En effet, ce type d'inhibition est fréquemment observé suivant la co-administration de deux substrats d'une même isoenzyme. En présence d'un inhibiteur pur, c'est-à-dire qu'il n'est pas métabolisé par l'isoenzyme inhibée, la constante d'affinité (K_m apparent) du substrat augmente et aucun changement de V_{max} n'est observé.

Non Compétitifs

Un composé liant l'enzyme à un site différent du site actif et n'ayant aucun effet sur la liaison du substrat est caractéristique d'un inhibiteur non-compétitif. Ainsi, la formation de ce complexe enzyme-substrat-inhibiteur entraîne une perte des fonctions catalytiques de l'enzyme. Une diminution du V_{max} est alors observée mais sans modification du K_m . Il faut toutefois noter que les inhibitions non-compétitives sont peu fréquentes.

Incompétitifs

L'inhibiteur incompétitif se lie seulement au complexe enzyme-substrat déjà formé qui résultera en la formation d'un complexe enzyme-substrat-inhibiteur inactif. Ce type d'inhibition diminue proportionnellement le V_{max} et le K_m conservant alors une clairance intrinsèque (K_m/V_{max}) constante. L'inhibition incompétitive est rarement observée en métabolisme.

3.3.2 Inhibiteurs Quasi-Irréversibles

Certains composés requièrent une activation métabolique par l'enzyme pour former des métabolites intermédiaires inhibiteurs. Ces métabolites peuvent former des complexes, nommés complexes métaboliques intermédiaires, très stables avec le groupement prosthétique de l'enzyme confinant cette dernière dans un état inactif. *In vitro*, ces complexes métaboliques intermédiaires peuvent être renversés à l'aide de composés liposolubles déplaçant le métabolite du site actif et par conséquent, les fonctions de l'enzyme peuvent être régénérées. Cependant, *in vivo* ces complexes étant excessivement stables, seule la synthèse de nouvelles enzymes permet de rétablir l'activité enzymatique. L'importance de la complexion est telle, qu'elle est considérée comme quasi-irréversible. Plusieurs produits tels que des antibiotiques macrolides (érythromycine et troleandomycine), des hydrazines (isoniazide), des méthylènedioxybenzènes (isosafrole) et une variété d'akylamines (orphénadrine) comptent parmi les inhibiteurs quasi-irréversibles.¹⁹⁹⁻²⁰²

3.3.3 Inhibiteurs Irréversibles

Certains produits nécessitent une activation métabolique par les cytochromes P450 formant des composés intermédiaires qui causent une inactivation irréversible de l'enzyme avant sa libération du site actif. Cette catégorie d'inhibiteurs est aussi nommée des substrat-suicides.²⁰³ L'inhibition irréversible résulte en la formation de liens covalents ne pouvant pas être rompus afin de régénérer une enzyme active. Les mécanismes d'inactivation constituent en une liaison irréversible avec le groupement prosthétique de l'hème et/ou avec la protéine.¹⁹⁷ De nombreux composés constituent des substrat-suicides incluant

des composés olefins (double lien), acétylènes (triple lien) (éthinyloestradiol), organosulfurés (disulfiram, cimétidine, parathion, thioureas, xanthates), halogénés (chloramphénicol) et furanocoumarines (méthoxypsoraline, bergamottin).²⁰⁴⁻²⁰⁷ De plus, quelques composés dont la spironolactone, peuvent à la fois altérer l'apoprotéine suite à une liaison covalente et modifier le groupement actif de l'hème.^{61,208}

Certains chercheurs ont suggéré que les substrat-suicides présentaient une meilleure spécificité pour l'enzyme comparativement aux inhibiteurs réversibles étant donné que la liaison avec l'enzyme, tout comme avec les inhibiteurs réversibles, doit répondre à plusieurs contraintes. De plus, l'inhibiteur doit être accepté à titre de substrat afin de satisfaire aux exigences d'activation métabolique et finalement, le composé réactif formé doit engendrer des modifications irréversibles sur l'isoenzyme.⁶¹

4. CONCLUSION

En somme, les cytochromes P450 représentent une famille d'hémoprotéines omniprésentes dans le domaine de la biologie. De nombreuses isoenzymes composent la superfamille des cytochromes P450 qui catalysent une multitude de réactions dont principalement des réactions d'oxydation. Ils ont pour fonction de participer à la synthèse de composés endogènes et de protéger l'organisme face à l'intrusion de substances potentiellement toxiques, soit un rôle de détoxification. De fait, les cytochromes P450 jouent un rôle crucial dans le métabolisme d'agents pharmacologiques.

Parmi les différentes classes des cytochromes P450, les CYP3As représentent la famille majeure impliquée dans le métabolisme des médicaments chez l'humain. L'importance pharmacologique des CYP3As est reliée à son expression dans des organes contribuant au métabolisme des médicaments. Leur activité est toutefois caractérisée par une variabilité interindividuelle importante. Contrairement au CYP3A4, l'isoenzyme CYP3A5 subit l'influence de polymorphismes génétiques. Il demeure toutefois surprenant de constater que cette isoforme n'est exprimée que chez une faible proportion de caucasiens. De plus, les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 présentent un chevauchement dans la spécificité de leurs substrats. Jusqu'à maintenant aucun substrat marqueur ne permet de distinguer adéquatement l'activité des isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5.

L'administration concomitante de médicaments substrats de la même isoenzyme des cytochromes P450 peut entraîner des interactions médicamenteuses. D'ailleurs, les effets indésirables dus aux interactions

médicamenteuses constituent un problème non négligeable en clinique. Il faut noter que plusieurs consensus recommandant l'utilisation de plus d'un médicament dans l'établissement d'un traitement pharmacologique et que les percées dans le domaine de l'industrie pharmaceutiques rendent disponibles différentes classes pharmacologiques, favorisent le recours à la polypharmacie et augmentent les risques d'interactions médicamenteuses dont les plus fréquentes sont les interactions réversibles compétitives.

En bref, les différentes recherches effectuées visant le développement des connaissances dans le domaine des cytochromes P450 sont d'une importance majeure tant au niveau théorique que clinique.

RÉFÉRENCES

1. Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, et al. Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine* 1999; 20:1-137.
2. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell* 1991; 10:1-14.
3. Nebert DW, Nelson DR. P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods in Enzymology* 1991; 206:3-11.
4. Nelson DR. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys* 2003; 409:18-24.
5. Werck-Reichhart D, Eyereisen R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* 2000; 1:3003.1-3003.9
6. Nebert DW, Gonzalez FJ. Cytochrome P450 gene expression and regulation. *Trends In Pharmacological Sciences Reviews* 1985; April:160-164.
7. Nelson DR, Strobel HW. Evolution of cytochrome P450 proteins. *Molecular Biology and Evolution* 1987; 4:572-593.

8. E. Arinç ... [et al.] ; editors, John B. Schenkman and Helmut Greim.
Cytochrome P450. Berlin: 1993.
9. Williams RT. Detoxication mechanism. London: 1959.
10. Brodie BB, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette LE, La Du BN, Mitowa C, et al.
Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver
microsomes. Science 1955; 121:603-604.
11. Muller GC, Miller JA. The metabolism of methylated aminoazo dyes: II.
Oxidative demethylation by rat liver homogenates. J Biol Chem
1953; 202:579-587.
12. Mueller GC, Miller JA. J Biol Chem 1949; 180:1125-1136.
13. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. J Biol Chem
1962; 237:PC1375
14. Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver
microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem
1964; 239:2370-2378.
15. Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O. The light-reversible carbon
monoxide inhibition of the steroid C-21 hydroxylation system of the
adrenal cortex. Biochemische Zeitschrift 1963; 338:741
16. Conney AH. Pharmacological implications of microsomal enzyme
induction. Pharmacol Rev 1967; 19:317

17. Alvares AP, Schilling G, Levin W, Kuntzman R. Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; 29:521
18. Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 1986; 261:5051-5060.
19. Beaune PH, Umbenhauer DR, Bork RW, Lloyd RS, Guengerich FP. Isolation and sequence determination of a cDNA clone related to human cytochrome P-450 nifedipine oxidase. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:8064-8068.
20. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 1991; 266:13469-13472.
21. Avila L, Huang HW, Damaso CO, Lu S, Moenne-Loccoz P, Rivera M. Coupled oxidation vs heme oxygenation: insights from axial ligand mutants of mitochondrial cytochrome *b₅*. *J Am Chem Soc* 2003; 125:4103-4110.
22. Ortiz De Montellano PR, De Voss JJ. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Natural Product Reports* 2002; 19:477-493.

23. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:611-650.
24. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002; 360:1155-1162.
25. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997; 29:413-580.
26. Vermilion JL, Coon MJ. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* 1978; 253:8812-8819.
27. Kaderbhai MA, Morgan R, Kaderbhai NN. The membrane-interactive tail of cytochrome *b*₅ can function as a stop-transfer sequence in concert with a signal sequence to give inversion of protein topology in the endoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 2003; 412:259-266.
28. Mathews FS. The structure, function and evolution of cytochromes. *Prog Biophys Mol Biol* 1985; 45:1-56.
29. Lee KH, Kuczera K. Molecular dynamics simulation studies of cytochrome *b*₅ from outer mitochondrial and microsomal membrane. *Biopolymers* 2003; 69:260-269.

30. Porter TD. The roles of cytochrome *b*₅ in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2002; 16:311-316.
31. Schenkman JB, Jansson I. The many roles of cytochrome *b*₅. *Pharmacol Ther* 2003; 97:139-152.
32. Yamazaki H, Nakamura M, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, et al. Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome *b*₅ on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of escherichia coli. *Protein Expression and Purification* 2002; 24:329-337.
33. Yamazaki H, Johnson WW, Ueng YF, Shimada T, Guengerich FP. Lack of electron transfer from cytochrome *b*₅ in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* 1996; 271:27438-27444.
34. Gilep AA, Guryev OL, Usanov SA, Estabrook RW. Apo-cytochrome *b*₅ as an indicator of changes in heme accessibility: preliminary studies with cytochrome P450 3A4. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2001; 87:237-244.
35. Guengerich FP. Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis. *Biological Chemistry* 2002; 383:1553-1564.
36. Kroeger-Koepke MB, Koepke SR, McClusky GA, Magee PN, Michejda CJ. α -hydroxylation pathway in the in vitro metabolism of carcinogenic

- nitrosamines: N-nitrosodimethylamine and N-nitroso-N-methylaniline. Proc Natl Acad Sci 1981; 78:6489-6493.
37. Dipple A, Michejda CJ, Weisburger EK. Metabolism of chemical carcinogens. Pharmacol Ther 1985; 27:265-296.
38. Ziegler DM. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. Drug Metab Rev 1988; 19:1-32.
39. Guengerich FP. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. Chem Res Toxicol 1991; 4:391-407.
40. Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, Baillie TA. Cytochrome P-450 - catalyzed formation of Δ^4 -VPA, a toxic metabolite of valproic acid. Science 1987; 235:890-893.
41. Porter WR, Wheeler C, Trager WF. Changes in the metabolic profiles of *R*- and *S*-warfarin and *R*- and *S*-phenprocoumon as a probe to categorize the effect of inducing agents on microsomal hydroxylases. Biochem Pharmacol 1981; 30:3099-3104.
42. Elshourbagy NA, Guzelian PS. Separation , purification, and characterization of a novel form of hepatic cytochrome P-450 from rats treated with pregnenolone-16 α -carbonitrile. J Biol Chem 1980; 255:1279-1285.
43. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39:1-17.

44. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology* 1993; 12:1-51.
45. Miranda CL, Wang JL, Henderson MC, Zhao X, Guengerich FP, Buhler DR. Comparison of rainbow trout and mammalian cytochrome P450 enzymes: evidence for structural similarity between trout P450 LMC5 and human P450III A4. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176:558-563.
46. Kaddouri M, Brassat N, Alvinerie M, Eeckhoutte C, Bonfils C, Derancourt J, et al. Ontogenic development of liver progesterone metabolism in female sheep. Contribution of cytochrome P4502B and P4503A subfamilies. *J Steroid Molec Biol* 1992; 42:499-508.
47. Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol* 2001; 59:386-392.
48. Gonzalez FJ, Schmid BJ, Umeno M, McBride OW, Hardwick JP, Meyer UA, et al. Human P450PCN1: sequence, chromosome localization and direct evidence through cDNA expression that P450PCN1 is nifedipine oxidase. *DNA* 1988; 7:79-86.
49. Komori M, Nishio K, Fujitani T, Ohi H, Kitada M, Mima S, et al. Isolation of a new human fetal liver cytochrome P450 cDNA clone: evidence

for expression of a limited number of forms of cytochrome P450 in human fetal livers. *Arch Biochem Biophys* 1989; 272:219-225.

50. Komori M, Nishio K, Ohi H, Kitada M, Kamataki T. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA containing the entire coding region for human fetal liver cytochrome P-450. *Journal of Biochemistry* 1989; 105:161-163.
51. Schuetz JD, Molowa DT, Guzelian PS. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274:355-365.
52. Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J Biol Chem* 1989; 264:10388-10395.
53. Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* 1998; 28:1129-1165.
54. de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, Van Den Anker JN. Cytochrome P450 3A. Ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* 1999; 37:485-505.
55. Schuetz JD, Kauma S, Guzelian PS. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest* 1993; 92:1018-1024.

56. Westlind A, Malmebo S, Johansson I, Otter C, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M, et al. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome P450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281:1349-1355.
57. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54:1271-1294.
58. Kivisto KT, Bookjans G, Fromm MF, Griese EU, Munzel P, Kroemer HK. Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42:387-389.
59. Juchau MR, Lee QP, Fantel AG. Xenobiotic biotransformation/bioactivation in organogenesis-stage conceptual tissues: implications for embryotoxicity and teratogenesis. *Drug Metab Rev* 1992; 24:195-238.
60. Ioannides C, Parke DV. Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 1993; 25:485-501.
61. Ortiz de Montellano P. Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry. 2nd ed. New York: Plenum Press, 2001.
62. de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferase in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253:387-394.

63. Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, et al. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 1994; 4:247-259.
64. Anttila S, Hukkanen J, Hakkola J, Stjernvall T, Beaune P, Edwards RJ, et al. Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1997; 16:242-249.
65. Lown KS, Kolars JC, Thummel KE, Barnett JL, Kunze KL, Wrighton SA, et al. Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test. *Drug Metab Disp* 1994; 22:947-955.
66. Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Pelkonen O, et al. Expression of xenobiotic-metabolizing CYPs in human pulmonary tissue. *Experimental and Toxicologic Pathology* 1999; 51:412-417.
67. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genet* 2001; 27:383-391.
68. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 2000; 38:41-57.

69. Waxman DJ, Lapenson DP, Aoyama T, Gelboin HV, Gonzalez FJ, Korzekwa K. Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Arch Biochem Biophys* 1991; 290:160-166.
70. Wang RW, Newton DJ, Scheri TD, Lu AYH. Human cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 β -hydroxylation and erythromycin *N*-demethylation. *Drug Metab Disp* 1997; 25:502-507.
71. Harlow GR, Halpert JR. Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:6636-6641.
72. Kenworthy KE, Clarke SE, Andrews J, Houston JB. Multisite kinetic models for CYP3A4: simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism. *Drug Metab Disp* 2001; 29:1644-1651.
73. Ekins S, Bravi G, Wikel JH, Wrighton SA. Three-dimensional-quantitative structure activity relationship analysis of cytochrome P-450 3A4 substrates. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291:424-433.
74. Domanski TL, He YA, Khan KK, Roussel F, Wang Q, Halpert JR. Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effects on substrate oxidation and cooperativity. *Biochem* 2001; 40:10150-10160.

75. Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, et al. Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochem* 1998; 37:4137-4147.
76. Domanski TL, Liu J, Harlow GR, Halpert JR. Analysis of four residues within substrate recognition site 4 of human cytochrome P450 3A4: role in steroid hydroxylase activity and α -Naphthoflavone stimulation. *Arch Biochem Biophys* 1998; 350:223-232.
77. Koley AP, Robinson RC, Markowitz A, Friedman FK. Drug-drug interactions: effect of quinidine on nifedipine binding to human cytochrome P450 3A4. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:455-460.
78. Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 1994; 47:1643-1653.
79. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Disp* 2002; 30:883-891.
80. Maenpaa J, Hall SD, Ring BJ, Strom SC, Wrighton SA. Human cytochrome P450 3A (CYP3A) mediated midazolam metabolism: the effect of assay conditions and regioselective stimulation by α -naphthoflavone, terfenadine and testosterone. *Pharmacogenetics* 1998; 8:137-155.

81. Schrag ML, Wienkers LC. Topological alteration of the CYP3A4 active site by the divalent cation Mg^{2+} . *Drug Metab Disp* 2000; 28:1198-1201.
82. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P-450III_{A5} (HL_p3). *Mol Pharmacol* 1990; 38:207-213.
83. Butler AM, Murray M. Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280:966-973.
84. Hosea NA, Guengerich FP. Oxidation of nonionic detergents by cytochrome P450 enzymes. *Arch Biochem Biophys* 1998; 353:365-373.
85. Raney KD, Shimada T, Kim DH, Groopman JD, Harris TM, Guengerich FP. Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver microsomes: significance of aflatoxin Q1 as a detoxication product of aflatoxin B1. *Chem Res Toxicol* 1992; 5:202-210.
86. Crespi CL, Penman BW, Steimel DT, Gelboin HV, Gonzalez FJ. The development of a human cell line stably expressing human CYP3A4: role in the metabolic activation of aflatoxin B₁ and comparison to CYP1A2 and CYP2A3. *Carcinogenesis* 1991; 12:355-359.
87. Shimada T, Iwasaki M, Martin M, Guengerich FP. Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of

procarcinogens detected by *umu* gene in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002. *Cancer Res* 1989; 49:3218-3228.

88. Lewis AD, Lau DHM, Duran GE, Wolf CR, Sikic BI. Role of cytochrome P-450 from the human CYP3A gene family in the potentiation of morpholino doxorubicin by human liver microsomes. *Cancer Res* 1992; 52:4379-4384.
89. Silvers KJ, Chazinski T, McManus ME, Bauer SL, Gonzalez FJ, Gelboin HV, et al. Cytochrome P-450 3A4 (nifedipine oxidase) is responsible for the C-oxidative metabolism of 1-nitropyrene in human liver microsomal samples. *Cancer Res* 1992; 52:6237-6243.
90. Howard PC, Aoyama T, Bauer SL, Gelboin HV, Gonzalez FJ. The metabolism of 1-nitropyrene by human cytochromes P450. *Junk* 1700; 1539-1542.
91. Chae YH, Yun CH, Guengerich FP, Kadlubar FF, El-Bayoumy K. Roles of human hepatic and pulmonary cytochrome P450 enzymes in the metabolism of the environmental carcinogen 6-nitrochrysene. *Cancer Res* 1993; 53:2028-2034.
92. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283:1552-1562.
93. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes

involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:414-423.

94. Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; 11:773-779.
95. Bailey DG, Dresser GK, Bend JR. Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73:529-537.
96. Yee GC, Stanley DL, Pessa LJ, Costa TD, Beltz SE, Ruiz J, et al. Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration. *Lancet* 1995; 345:955-956.
97. Bailey DG, Spence JD, Munoz C, Arnold JMO. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. *Lancet* 1991; 337:268-269.
98. Malhotra S, Bailey DG, Paine MF, Watkins PB. Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:14-23.
99. Kupferschmidt HHT, Ha HR, Ziegler WH, Meier PJ, Krahenbühl S. Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58:20-28.

100. Ducharme MP, Warbasse LH, Edwards DJ. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57:485-491.
101. Lundahl J, Regardh CG, Edgar B, Johnson G. Relationship between time of intake of grapefruit juice and its effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1995; 49:61-67.
102. Buiatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, et al. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *International Journal of Cancer* 1989; 44:611-616.
103. You WC, Blot WJ, Chang YS, Ershow A, Yang ZT, An Q, et al. Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:162-164.
104. Haber D, Siess MH, de Waziers I, Beaune P, Suschetet M. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rat fed naturally occurring allyl sulphides. *Xenobiotica* 1994; 24:169-182.
105. Dresser GK, Wacher V, Wong S, Wong HT, Bailey DG. Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:247-255.
106. Unger M, Holzgrabe U, Jacobsen W, Cummins C, Benet LZ. Inhibition of cytochrome P450 3A4 by extracts and kavalactones of *Piper methysticum* (Kava-Kava). *Planta Medica* 2002; 68:1055-1058.

107. Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, et al. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 72:276-287.
108. Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD. The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70:317-326.
109. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, et al. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:7500-7502.
110. Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Luscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 2000; 355:548-549.
111. Barone GW, Gurley BJ, Ketel BL, Abul-Ezz SR. Herbal supplements: a potential for drug interactions in transplant recipients. *Transplantation* 2001; 71:239-241.
112. Henderson B, Blake S. Therapeutic potential of cytokine manipulation. *TIPS* 1992; 13:145-152.
113. Haas CE, Kaufman DC, Jones CE, Burstein AH, Reiss W. Cytochrome P450 3A4 activity after surgical stress. *Crit Care Med* 2003; 31:1338-1346.

114. Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J* 2002; 16:1799-1801.
115. Gorski JC, Hall SD, Becker P, Affrime MB, Cutler DL, Haehner-Daniels B. In vivo effects of interleukin-10 on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:32-43.
116. Tinel M, Elkahwaji H, Robin MA, Fardel N, Descatoire V, Haouzi D, et al. Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289:649-655.
117. Tapner M, Liddle C, Goodwin B, George J, Farrell GC. Interferon gamma down-regulates cytochrome P450 3A genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes. *Hepatology* 1996; 24:367-373.
118. Muntané-Relat J, Ourlin JC, Domergue J, Maurel P. Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 1995; 22:1143-1153.
119. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993; 44:707-715.
120. Paintaud G, Bechtel Y, Brientini MP, Miguet JP, Bechtel PR. Effects of liver diseases on drug metabolism. *Therapie* 1996; 51:384-389.

121. Iqbal S, Vickers C, Elias E. Drug metabolism in end-stage liver disease. In vitro activities of some phase I and phase II enzymes. *Journal of Hepatology* 1990; 11:37-42.
122. Dowling TC, Briglia AE, Fink JC, Hanes DS, Light PD, Stackiewicz L, et al. Characterization of hepatic cytochrome P4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73:427-434.
123. Hukkanen J, Vaisanen T, Lassila A, Piipari R, Anttila S, Pelkonen O, et al. Regulation of CYP3A5 by glucocorticoids and cigarette smoke in human lung-derived cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304:745-752.
124. Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, et al. Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2000; 22:360-366.
125. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1194-1210.
126. Piipari R, Savela K, Nurminen T, Hukkanen J, Raunio H, Hakkola J, et al. Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-dna adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *International Journal of Cancer* 2000; 86:610-616.

127. Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, et al. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001; 11:447-458.
128. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Research* 1998; 8:1229-1231.
129. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 1998; 102:1016-1023.
130. Blumberg B, Sabbagh W, Jr., Juguilon H, Bolado J, Jr., van Meter CM, Ong ES, et al. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes & Development* 1998; 12:3195-3205.
131. Ball SE, Scatina J, Kao J, Ferron GM, Fruncillo R, Mayer P, et al. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promotor region of *CYP3A4*. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:288-294.
132. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, et al. Association between a *CYP3A4* genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999; 8:901-905.

133. Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Disp* 2001; 29:268-273.
134. Walker AH, Jaffe JM, Gunasegaram S, Cummings SA, Huang CS, Chern HD, et al. Characterization of an allelic variant in the nifedipine-specific element of CYP3A4: ethnic distribution and implications for prostate cancer risk. *Mutations in brief* no. 191. Online. *Human Mutation* 1998; 12:289
135. Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, et al. CYP3A4 allelic variant with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:48-56.
136. Lamba JK, Lin YS, Thummel K, Daly A, Watkins PB, Strom S, et al. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* 2002; 12:121-132.
137. Haehner BD, Gorski JC, VandenBranden M, Wrighton SA, Janardan SK, Watkins PB, et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 1996; 50:52-59.
138. Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259:201-205.

139. Tayeb MT, Clark C, Sharp L, Haites NE, Rooney PH, Murray GI, et al. CYP3A4 promoter variant is associated with prostate cancer risk in men with benign prostate hyperplasia. *Oncology Report* 2002; 9:653-655.
140. Kadlubar FF, Berkowitz GS, DeLongchamp RR, Wang C, Green BL, Tang G, et al. The CYP3A4*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2003; 12:327-331.
141. Lai J, Vesprini D, Chu W, Jernstrom H, Narod SA. CYP gene polymorphisms and early menarche. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001; 74:449-457.
142. Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NKV, et al. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:13176-13181.
143. Garcia-Martin E, Martinez C, Pizarro RM, Garcia-Gamito FJ, Gullsten H, Raunio H, et al. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol Ther* 2002; 71:196-204.
144. Van Schaik RHN, de Wildt SN, Brosens R, van Fessem M, Van Den Anker JN, Lindemans J. The CYP3A4*3 allele: is it really rare? *Clinical Chemistry* 2001; 47:1104-1106.
145. Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their

- abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:825-831.
146. Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics* 1994; 4:11-20.
147. Van Schaik RHN, Van Der Heiden IP, Van Den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clinical Chemistry* 2002; 48:1668-1671.
148. Fukuen S, Fukuda T, Maune H, Ikenaga Y, Yamamoto I, Inaba T, et al. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, CYP3A5*3 and *6, in a Japanese population. *Pharmacogenetics* 2002; 12:331-334.
149. Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy SI, Kishikawa Y, et al. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2002; 58:417-421.
150. Balram C, Zhou Q, Cheung YB, Lee EJD. CYP3A5*3 and *6 single nucleotide polymorphisms in three distinct Asian populations. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 59:123-126.
151. King BP, Leathart JBS, Mutch E, Williams FM, Daly AK. CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 55:625-629.

152. Jounaidi Y, Hyrailles V, Gervot L, Maurel P. Detection of a CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221:466-470.
153. Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998; 28:1203-1253.
154. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol* 1989; 36:89-96.
155. Wandel C, Bocker R, Bohrer H, Browne A, Rugheimer E, Martin E. Midazolam is metabolized by at least three different cytochrome P450 enzymes. *Br J Anaesth* 1994; 73:658-661.
156. Ghosal A, Satoh H, Thomas PE, Bush E, Moore D. Inhibition and kinetics of cytochrome P4503A activity in microsomes from rat, human, and cDNA-expressed human cytochrome P450. *Drug Metab Disp* 1996; 24:940-947.
157. Streetman DS, Kashuba AD, Bertino JS, Jr., Kulawy R, Rocci ML, Jr., Nafziger AN. Use of midazolam urinary metabolic ratios for cytochrome P450 3A (CYP3A) phenotyping. *Pharmacogenetics* 2001; 11:349-355.
158. Rogers JF, Rocci ML, Jr., Haughey DB, Bertino JS, Jr. An evaluation of the suitability of intravenous midazolam as an in vivo marker for hepatic

- cytochrome P4503A activity. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73:153-158.
159. Palkama VJ, Ahonen J, Neuvonen PJ, Olkkola KT. Effect of saquinavir on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral and intravenous midazolam. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:33-39.
160. Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, et al. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 59:491-502.
161. Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD, Kunze KL. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of K_m values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab Disp* 1999; 27:180-187.
162. Chou FC, Tzeng SJ, Huang JD. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese. *Drug Metab Disp* 2001; 29:1205-1209.
163. Maquat LE. The power of point mutations. *Nature Genet* 2001; 27:5-6.
164. Khanderia U, Pandit SK. Use of midazolam hydrochloride in anesthesia. *Clin Pharm* 1987; 6:533-547.
165. Rogers JF, Nafziger AN, Kashuba ADM, Streetman DS, Rocci ML, Jr., Choo EF, et al. Single plasma concentrations of 1'-hydroxymidazolam or the ratio of 1'-hydroxymidazolam: midazolam

do not predict midazolam clearance in healthy Subjects. *J Clin Pharmacol* 2002; 42:1079-1082.

166. Lin YS, Lockwood GF, Graham MA, Brian WR, Loi CM, Dobrinska MR, et al. In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics* 2001; 11:781-791.
167. Kim JS, Nafziger AN, Tsunoda SM, Choo EF, Streetman DS, Kashuba ADM, et al. Limited sampling strategy to predict AUC of the CYP3A phenotyping probe midazolam in adults: application to various assay techniques. *J Clin Pharmacol* 2002; 42:376-382.
168. Fabre I, Fabre G, Maurel P, Bertault-Peres P, Cano JP. Metabolism of cyclosporin A. III. Interaction of the macrolide antibiotic, erythromycin, using rabbit hepatocytes and microsomal fractions. *Drug Metab Disp* 1988; 16:296-301.
169. Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD. Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:173-182.
170. Jones DR, Gorski JC, Haehner BD, O'Mara EM, Jr., Hall SD. Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60:374-384.

171. Wang Y, Unadkat JD. Enzymes in addition to CYP3A4 and 3A5 mediate *N*-demethylation of dextromethorphan in human liver microsomes. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1999; 20:341-346.
172. Yu A, Haining RL. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? *Drug Metab Disp* 2001; 29:1514-1520.
173. Krecic-Shepard ME, Barnas CR, Slimko J, Gorski JC, Wainer IW, Schwartz JB. In vivo comparison of putative probes of CYP3A4/5 activity: erythromycin, dextromethorphan, and verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:40-50.
174. Ducharme J, Abdullah S, Wainer IW. Dextromethorphan as an in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity. *Journal of Chromatography B* 1996; 678:113-128.
175. Kroemer HK, Echizen H, Heidemann H, Eichelbaum M. Predictability of the in vivo metabolism of verapamil from in vitro data: contribution of individual metabolic pathways and stereoselective aspects. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260:1052-1057.
176. Kroemer HK, Gautier JC, Beaune P, Henderson C, Wolf CR, Eichelbaum M. Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993; 348:332-337.

177. Schwartz JB. Aging alters verapamil elimination and dynamics: single dose and steady-state responses. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255:364-373.
178. Ohmori S, Nakasa H, Asanome K, Kurose Y, Ishii I, Hosokawa M, et al. Differential catalytic properties in metabolism of endogenous and exogenous substrates among CYP3A enzymes expressed in COS-7 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1380:297-304.
179. Ged C, Rouillon JM, Pichard L, Combalbert J, Bressot N, Bories P, et al. The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III_A induction. *Br J Clin Pharmacol* 1989; 28:373-387.
180. Kovacs SJ, Martin DE, Everitt DE, Patterson SD, Jorkasky DK. Urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as an in vivo marker for CYP3A induction: applications and recommendations. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 63:617-622.
181. May DG, Arns PA, Richards WO, Porter J, Ryder D, Fleming CM, et al. The disposition of dapsone in cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 51:689-700.
182. Fleming CM, Branch RA, Wilkinson GR, Guengerich FP. Human liver microsomal N-hydroxylation of dapsone by cytochrome P-4503A₄. *Mol Pharmacol* 1992; 41:975-980.

183. Mitra AK, Thummel KE, Kalhorn TF, Kharasch ED, Unadkat JD, Slattery JT. Metabolism of dapsone to its hydroxylamine by CYP2E1 in vitro and in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58:556-566.
184. Kinirons MT, O'Shea D, Downing TE, Fitzwilliam AT, Joellenbeck L, Groopman JD, et al. Absence of correlations among three putative in vivo probes of human cytochrome P4503A activity in young healthy men. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 54:621-629.
185. Shou M, Lu T, Krausz KW, Sai Y, Yang T, Korzekwa KR, et al. Use of inhibitory monoclonal antibodies to assess the contribution of cytochromes P450 to human drug metabolism. *Eur J Pharmacol* 2000; 394:199-209.
186. Gelboin HV, Krausz KW, Goldfarb I, Buters JTM, Yang SK, Gonzalez FJ, et al. Inhibitory and non-inhibitory monoclonal antibodies to human cytochrome P450 3A3/4. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:1841-1850.
187. Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1997; 346:161-169.
188. Dresser GK, Bailey DG. A basic conceptual and practical overview of interactions with highly prescribed drugs. *Canadian Journal of Clinical Pharmacology* 2002; 9:191-198.
189. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279:1200-1205.

190. Einarson TR. Drug-related hospital admissions. *Ann Pharmacother* 1993; 27:832-840.
191. Bates DW, Cullen DJ, Laird N, Petersen LA, Small SD, Servi D, et al. Incidence of adverse drug events and potential adverse drug events. *JAMA* 1995; 274:29-34.
192. Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P450 system. In: Kalow W, editor. *Pharmacogenetics of drug metabolism*. New York: Pergamon Press, 1992:549-608.
193. Hollenberg PF. Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev* 2002; 31:17-35.
194. Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Maurel P, Guzelian PS. Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes *in vivo* and in primary monolayer culture. *J Biol Chem* 1986; 261:6264-6271.
195. Koop DR, Crump BL, Nordblom GD, Coon MJ. Immunochemical evidence for induction of the alcohol-oxidizing cytochrome P-450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole, and isoniazid. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82:4065-4069.
196. Song BJ, Veech RL, Park SS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Induction of rat hepatic *N*-nitrosodimethylamine demethylase by acetone is due to protein stabilization. *J Biol Chem* 1989; 264:3568-3572.

197. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998; 35:361-390.
198. Lin JH, Chen IW, Chiba M, Nishime JA, DeLuna FA. Route-dependent nonlinear pharmacokinetics of a novel HIV protease inhibitor: involvement of enzyme inactivation. *Drug Metab Disp* 2000; 28:460-466.
199. Mansuy D, Gans P, Chottard JC, Bartoli JF. Nitrosoalkanes as Fe(II) ligands in the 455-nm-absorbing cytochrome P-450 complexes formed from nitroalkanes in reducing conditions. *Eur J Biochem* 1977; 76:607-615.
200. Reidy GF, Mehta I, Murray M. Inhibition of oxidative drug metabolism by orphenadrine: *in vitro* and *in vivo* evidence for isozymes-specific complexation of cytochrome P-450 and inhibition kinetics. *Mol Pharmacol* 1989; 35:736-743.
201. Muakkassah SF, Bidlack WR, Yang WCT. Mechanism of the inhibitory action of isoniazid on microsomal drug metabolism. *Biochem Pharmacol* 1981; 30:1651-1658.
202. Hodgson E, Philpot RM. Interaction of methylenedioxyphenyl [1,3-benzodioxole] compounds with enzymes and their effects on mammals. *Drug Metab Rev* 1974; 3:231-301.
203. Silverman RB. Criteria for mechanism-based enzyme inactivation. In: Anonymous Mechanism-based enzyme inactivation: chemistry and enzymology. Florida: CRC Press, 1988:3-27.

204. Kent UM, Juschyshyn MI, Hollenberg PF. Mechanism-based inactivators as probes of cytochrome P450 structure and function. *Current Drug Metabolism* 2001; 2:215-243.
205. He K, Iyer KR, Hayes RN, Sinz MW, Woolf TF, Hollenberg PF. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by Bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem Res Toxicol* 1998; 11:252-259.
206. Halpert J, Balfour C, Miller NE, Morgan ET, Dunbar D, Kaminsky LS. Isozyme selectivity of the inhibition of rat liver cytochromes P-450 by chloramphenicol *in vivo*. *Mol Pharmacol* 1985; 28:290-296.
207. Guengerich FP. Oxidation of 17 α -ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450. *Mol Pharmacol* 1988; 33:500-508.
208. Decker CJ, Rashed MS, Baillie TA, Maltby D, Correia MA. Oxidative metabolism of spironolactone: evidence for the involvement of electrophilic thiosteroid species in drug-mediated destruction of rat hepatic cytochrome P450. *Biochem* 1989; 28:5128-5136.

CHAPÎTRE II

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

HYPOTHÈSE & OBJECTIFS

Hypothèse :

Les travaux de recherche réalisés précédemment ont démontré que la dompéridone, un antagoniste dopaminergique, est métabolisée majoritairement par la sous-famille CYP3A. Sachant qu'il existe un chevauchement dans la spécificité des substrats pour les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 et qu'aucun substrat connu jusqu'à maintenant ne permet de différencier leur activité, la possibilité que le métabolisme de la dompéridone puisse distinguer l'activité des isoenzymes CYP3A4 de CYP3A5 mérite d'être explorée.

Objectifs de l'étude:

Ce travail consistait à caractériser les isoenzymes spécifiques de la sous-famille CYP3A impliquées dans le métabolisme de la dompéridone.

Ce projet de recherche avait pour but de déterminer si la dompéridone pourrait constituer un substrat marqueur afin de différencier l'activité des CYP3A4 et CYP3A5 et d'évaluer les proportions relatives en CYP3A4 et en CYP3A5 dans différents microsomes hépatiques humains en utilisant la dompéridone.

En second lieu, ces travaux de recherche voulaient également caractériser l'inhibition métabolique potentielle du métabolisme de la dompéridone en présence de clarithromycine. La dompéridone, un modulateur de la motilité gastrique, a regagné en popularité depuis le retrait du marché du cisapride. En

présence d'ulcères gastriques à *Helicobacter pylori*, l'association médicamenteuse dompéridone et clarithromycine, un antibiotique macrolide, est fréquemment utilisée. Il est rapporté que la clarithromycine est un inhibiteur puissant des CYP3A4/5. De plus, sachant que la dompéridone possède une faible biodisponibilité, l'administration concomitante pourrait entraîner une augmentation significative du pic plasmatique. D'où l'intérêt de s'intéresser au risque d'inhibition métabolique de la dompéridone par la clarithromycine.

CHAPÎTRE III

***DOMPERIDONE AS AN IN VITRO SUBSTRATE MARKER DRUG
TO DIFFERENTIATE BETWEEN CYP3A4 AND CYP3A5 ACTIVITIES.***

ABSTRACT

Previous studies from our laboratory have demonstrated that CYP3As are major enzymes involved in the metabolism of domperidone, a dopamine antagonist agent. The overall objectives of our study were to characterize further the CYP3A isoforms, involved in the metabolism of the drug and to determine whether domperidone could be used as a substrate marker drug to differentiate between CYP3A4 and CYP3A5 activities. Assessment of *in vitro* metabolism of domperidone was performed with human liver microsomes, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 and microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7, in the absence or presence of cytochrome b5. Incubations were performed at various concentrations of domperidone (0.5-500 μM) in the presence or absence of inhibitors such as ketoconazole (0.03-3 μM), clarithromycin (1-70 μM), and monoclonal antibodies directed against CYP3A4. Results obtained in the presence of cytochrome b5 indicated that formation rate of domperidone ring-hydroxylated metabolite was 4.35-fold higher in the presence of CYP3A4 compared to CYP3A5 and that domperidone exhibits greater affinity (≈ 6 -fold) for CYP3A4 compared to CYP3A5. Addition of cytochrome b5 to the incubation mixture markedly augmented CYP3As activities determined with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 (V_{max} increased 26-fold) and CYP3A5 (V_{max} increased 3.8 fold). As well, K_m values determined with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 increased from 5 μM to 26 μM in the presence of cytochrome b5 while that of CYP3A5 remained unchanged. Formation of domperidone ring-hydroxylated

metabolite was inhibited by ketoconazole with an IC_{50} ranging from 0.05 to 2.09 μ M but in contrast, clarithromycin was a very weak inhibitor of CYP3A activities. Finally, incubations performed at K_m for CYP3A4 and at saturation ($2 \times K_m$) for CYP3A5 indicated that relative proportions of CYP3A5 in human liver microsomes from different individuals ($n=14$) vary from 0 to 45%. In conclusion, domperidone is a selective substrate of CYP3As with a higher affinity towards CYP3A4. These characteristics led us to propose that domperidone could be a useful probe drug to determine relative proportions of CYP3A4 and CYP3A5 activities in enzymatic sources from various tissues and suggest that the drug could represent a valuable tool for the development of an *in vivo* phenotypic strategy for CYP3A4 and CYP3A5. Our results also demonstrated the mandatory role of cytochrome b5 to optimize kinetic conditions for CYP3A4 and CYP3A5 and finally, the weak inhibitory potency of clarithromycin towards CYP3A4 and CYP3A5.

INTRODUCTION

Variability measured in the activity of various drug metabolizing enzymes contributes considerably to the large intersubject variability observed in drug response. The cytochrome P450 (CYP450) is a superfamily of hemoproteins that are the terminal oxidases of the mixed function oxidase system involved in the metabolism of several drugs.^{1,2} In humans, this superfamily comprises at least 57 genes that have been classified into families and sub-families.³⁻⁵ One of them, the CYP3A subfamily, with its five known members (CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43), is the most important subfamily of enzymes for the biotransformation of xenobiotics.⁶⁻¹² Indeed, more than 50% of therapeutic compounds currently used clinically are metabolized by CYP3As.

Wide interindividual differences in expression or activity of CYP3As contribute to variations in both clearance and efficacy of CYP3A substrates. Consequently, a number of experimental probe drugs have been suggested to predict dose requirements for CYP3A substrates. This includes nifedipine, erythromycin, dapsone, midazolam, alprazolam, dextromethorphan, lidocaine and testosterone.¹³⁻¹⁹ Even though a certain degree of success has been observed with all these substrate markers under certain conditions, their predictive value (sensitivity and specificity) has remained too low for generalized usage. This is mostly explained by intersubject variations in intestinal and hepatic content of various isoforms,^{20,21} discrete sensitivity to genetic polymorphisms,²² the presence of more than one catalytic and binding sites on CYP3A isoforms,^{23,24} complex substrate-enhancer interactions,²⁵ overlap substrate selectivity between CYP3A isoforms, etc...

However, the need for innovative and novel strategies to help clinicians predict dose requirements for narrow therapeutic index drugs remains. Genotyping strategies aimed at the identification of specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) may help identify limited groups of patients with variant alleles and very low enzyme activities.²² In these small subsets of patients, low doses of active drug moieties metabolized by the identified defective enzymes could be used.^{26,27} But, predictive value of genotyping strategies in patients with wild type alleles is rather low considering that predicted phenotype can be altered by disease state, physiological factors, concomitant drug administration, environment, etc... The search for new phenotypic markers should then be continued.

Previous studies performed in our laboratory have demonstrated that CYP3A is the major subfamily of enzymes involved in the metabolism of the dopamine antagonist agent domperidone. Domperidone is principally used in Canada and European countries for motility disorders and for its antiemetic properties. For years the drug was a second choice but the removal of cisapride from the market has reopened the market value of domperidone; even though domperidone itself also blocks cardiac potassium channels.^{28,29} Accordingly, domperidone was not introduced on US market in early 80's due to QT prolongation and proarrhythmic events.³⁰⁻³³ Therefore, identification major metabolizing enzymes involved in the metabolism of domperidone represents a key information to help prevent major drug-drug interactions that could potentially lead to drug induced Long-QT syndrome and death.

The recent commercial availability of more pure enzymatic sources of CYP3A isozymes has led us to pursue our studies and to characterize further the CYP450 isozymes involved in the metabolism of domperidone. While conducting these

studies, it became apparent that domperidone did not behave exactly like previously identified CYP3A substrates. Preliminary results obtained led us to hypothesize that the drug could distinguish between CYP3A4 and CYP3A5 activities.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Domperidone was purchased from Janssen Pharmaceutica N.V. (Beerse, Belgium). Ketoconazole was obtained from ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA). Clarithromycin and encainide were generously provided by Abbott Laboratories (Montreal, Canada) and Bristol Myers Squibb Pharmaceutical Research (Wallingford, CT, USA). Reaction cofactors (NADP⁺, D-glucose 6-phosphate and glucose 6-phosphate dehydrogenase) were obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Human liver microsomes were purchased from Human Biologics International (Scottsdale, AZ, USA). Microsomes from lymphoblast-expressed human CYP3A4, from baculovirus-infected insect cells expressing CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 and from baculovirus-expressed human cytochrome b5 were obtained from BD Gentest (Woburn, MA, USA). These microsomes were coexpressed with human CYP450 reductase. Mouse monoclonal antibodies raised against human CYP3A4 were also obtained from BD Gentest (Woburn, MA, USA). Other chemicals used were of highest qualities commercially available.

HPLC analysis. The HPLC system consisted in a SpectraSystem P4000 pump (Thermo Separation products, Fremont, CA), a SpectraSystem AS3000 autosampler (Thermo Separation Products), a model FL3000 fluorescence detector (Thermo Separation Products), a SpectraSystem UV3000 ultraviolet detector (Thermo Separation Products) and a model PC1000 System Software (Thermo Separation Products). An ultrasphere ODS column was used (5 μ M x 250 mm x 4.6 mm; Beckman Coulter, Fullerton, CA). Separation of the major metabolites of

domperidone was achieved using a mobile phase containing disodium citrate buffer (0.01 mM, pH 3.4)/methanol/ acetonitrile/triethylamine, 55:35:10:0.825 at a flow rate of 1.0 ml/min. Chromatographic separations were performed at room temperature. Eluent was monitored with fluorescence detection (excitation $\lambda = 282$ nm and emission $\lambda = 328$ nm) and by ultraviolet absorbance at $\lambda = 254$ nm (quantification of encanide, internal standard). Detection limit was 0.11 nmol/mL for domperidone and its major metabolites. Intraday and interday coefficients of variations were below 5% and 10%, respectively.

Microsomal incubations. All microsomal incubations were performed in duplicate. The standard incubation mixture (final volume, 500 μ L) consisted of microsomes (10 or 20 μ L), 395-385 μ L phosphate buffer 50 mM (pH 7.4), 100 μ L NADPH-regenerating system solution and 5 μ L substrate (domperidone dissolved in DMSO; 1% final reaction volume). The NADPH-regenerating solution contained NADP⁺ (498 μ g), D-glucose 6-phosphate (502 μ g), MgCl₂ 25 mM (100 μ L) and 0.2 U glucose 6-phosphate dehydrogenase. The final concentration of domperidone in the incubation mixture varied from 0.5 to 500 μ M. Domperidone was incubated with different enzymatic sources: human liver microsomes, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4, and microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4, CYP3A5 or CYP3A7. Reaction mixtures were performed with various amounts of CYP450 per incubation: 0.172 nmoles were used with human liver microsomes, 0.016 nmoles with microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4, 0.020 nmoles with microsomes from baculovirus-expressed

human recombinant CYP3A4, CYP3A5 or CYP3A7. Incubations containing microsomes, buffer and NADPH-regenerating system solution were pre-incubated at 37°C for 8 minutes. Reactions were initiated by the addition of the substrate to the incubation mixture. After 45 minutes, enzymatic process was stopped by adding 500 μL of ice-cold acetonitrile. Encainide (60 μL ; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solution) was added as the internal standard. The incubation mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes. The supernatant, 10 to 50 μL , was injected onto the HPLC system and the major ring-hydroxylated metabolite of domperidone was monitored.

To evaluate effects of cytochrome b5 on domperidone metabolism, microsomes from baculovirus-expressed recombinant human cytochrome b5 (40 pmol) were added to incubation mixtures containing microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5. Incubation mixture and procedures were similar to those described above; potassium buffer, NADPH regenerating system solution and enzymatic sources with or without cytochrome b5 were prewarmed at 37°C for 8 minutes before the addition of substrate to initiate metabolic reactions.

Immunoinhibition studies. Mouse monoclonal antibodies raised against human CYP3A4 were used to confirm major isozymes involved in domperidone metabolism. Microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5, and cytochrome b5 were pre-incubated on ice for 15 minutes in the presence of increasing amounts of antibodies directed against human CYP3A4 (0-20 μL). Thereafter, potassium buffer and NADPH regenerating system solution were added to

the mixture containing microsomes and prewarmed at 37°C as described earlier prior to the addition of domperidone. Extent of domperidone metabolism was measured as percentage of control activity (20 μ L of Tris buffer provided for antibody dilutions).

Inhibition studies. Effects of CYP3A chemical inhibitors on the metabolism of domperidone were studied in human liver microsomes, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 and microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5, with or without microsomes from baculovirus-expressed human recombinant cytochrome b5. Ketoconazole and clarithromycin were dissolved in methanol (final concentration in reaction mixture was 1%). The final concentrations of ketoconazole and clarithromycin ranged from 0.03 to 3 μ M, and 1 to 70 μ M, respectively. Briefly, the reaction mixtures containing enzymatic sources, potassium buffer, NADPH regenerating system and chemical inhibitors were prewarmed at 37°C for 8 minutes, as described previously, before the addition of domperidone. Concentration of domperidone was fixed at 200 μ M in experiments with microsomes from human livers, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 or microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 but was fixed at 300 μ M in experiments conducted with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A5. Formation rate of the major ring-hydroxylated metabolite of domperidone was expressed as a percentage of metabolite formed under control incubations.

Determination of the relative proportion of CYP3A4 and CYP3A5 in human liver microsomes. The strategy used to determine the relative proportion of CYP3A4 and CYP3A5 in human liver microsomes was based on the different kinetic parameters (K_m) obtained from experiments conducted with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5, in the presence or absence of cytochrome b5. Series of incubations were made at low concentrations (K_m determined with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4) or high concentrations of domperidone (fixed at 2-times K_m for CYP3A5; saturation) using human liver microsomes from different donors. These incubations were conducted as described previously. Incubations at low domperidone concentrations were used to estimate content of CYP3A4 while content of CYP3A5 was estimated mostly from incubations performed at high concentrations of domperidone:

$$\% \text{ content of CYP3A4} = \frac{2 \times \text{formation rate of M3 obtained at } K_m \text{ for CYP3A4} \times 100}{\text{maximum formation rate of M3 at saturation}}$$

$$\% \text{ content of CYP3A5} = 100 - (\% \text{ content of CYP3A4})$$

Statistical analysis. Enzyme kinetic parameters were determined by nonlinear regression analysis using Michaelis-Menten equation while inhibitor potencies (IC_{50} values) were determined by non linear regression analysis using Hill's equation.

RESULTS

***In Vitro* Metabolism of Domperidone.** Kinetic parameters associated with the formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite were estimated from various enzymatic sources to characterize further the relative contribution of CYP3A isozymes, especially CYP3A4 and CYP3A5, in the biotransformation of domperidone (Table 1). First, K_m value determined from human liver microsomes was similar to the one determined from lymphoblast-expressed CYP3A4 (36 μM vs 34 μM); a result consistent with our previous observations that CYP3As are major enzymes involved in the formation of domperidone major ring-hydroxylated metabolite. On the other hand, microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 exhibited much greater affinity (K_m of 5 μM) towards domperidone compared to human liver microsomes (36 μM) or microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A5 (150 μM). Affinity of CYP3A4 towards domperidone was reduced when cytochrome b5 was added to the incubation mixture (26 μM) while cytochromes b5 had no influence of K_m determined for CYP3A5 (K_m remained at ~ 150 μM).

Formation rate of the major ring-hydroxylated metabolite of domperidone also varied with enzymatic sources used. For instance, formation rates corrected for the amount of CYP450 added to the incubation mixture were higher in the presence of human liver microsomes or microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 compared to formation rates estimated with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5 (11-fold and 8-fold, respectively) in the absence of cytochrome b5. Because the latter are purified enzymatic sources, a

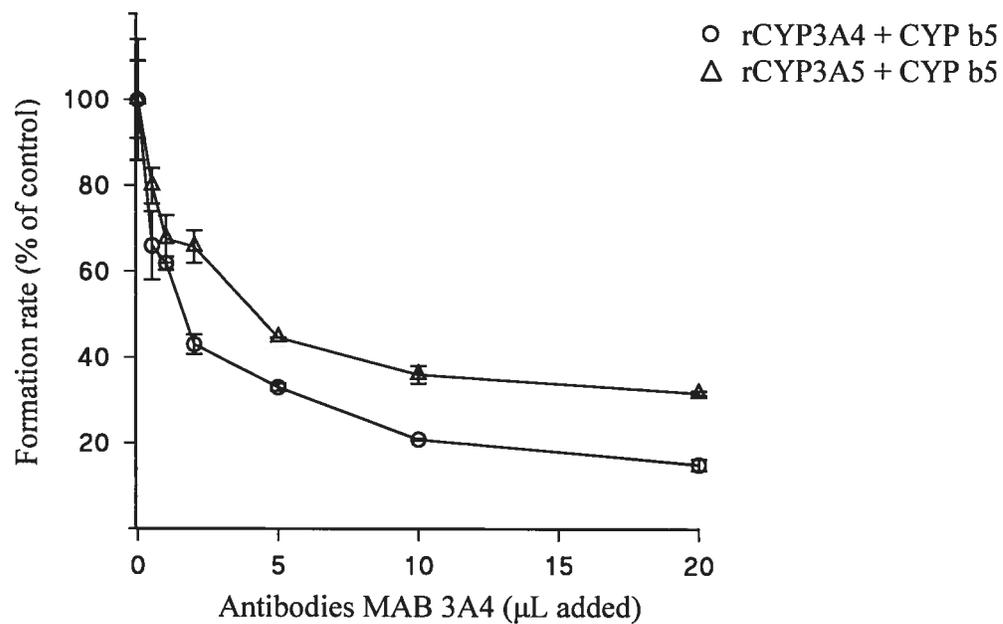
Table 1. Kinetic parameters for the formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite from various enzymatic sources.

	Human liver microsomes	Lymphoblast-expressed CYP3A4	Baculovirus-expressed human recombinant		Baculovirus-expressed human recombinant		
			CYP3A4	CYP3A5	CYP3A4		
			(Without cytochrome b5)		(With cytochrome b5)		
			CYP3A4	CYP3A7	CYP3A5		
K_m (μM)	36 +/-3	34 +/-5	4.7 +/-1.5	154 +/-34	17 +/-4	26 +/-3	140 +/-34
V_{max}	5.6 +/- 0.1	8.1 +/-0.7	0.47 +/-0.02	0.7 +/-0.01	1.30 +/-0.05	12.2 +/-0.4	2.8 +/-0.2
(nmol/nmol P450/min)							

greater catalytic activity was expected with these microsomes compared with those obtained from human livers or from lymphoblast-expressed CYP3A4. Experiments were repeated to evaluate further the potential contribution and modulatory role of cytochrome b5 on activity of microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5. The addition of cytochromes b5 increased the catalytic activity of both CYP3A4 and CYP3A5 such that highest values were observed in the presence of microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4. Consequently, the addition of cytochrome b5 to incubations performed with microsomes from expressed recombinant CYP450 systems appears to favour conditions that reflect activity observed in human liver microsomes. Results obtained also suggest that at low substrate concentration, CYP3A4 catalyzes preferentially the oxidation of domperidone into its major ring-hydroxylated metabolite.

Inhibition of *in vitro* formation of Domperidone Major Metabolite by Monoclonal Antibodies. Effects of monoclonal antibodies directed against CYP3A4 on domperidone metabolism were evaluated using microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5, in the presence of cytochrome b5. Formation rate of domperidone ring-hydroxylated metabolite determined with microsomes from either baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5 were significantly inhibited by anti-human CYP3A4 (Figure 1). Inhibition was however greater in the presence of microsomes from recombinant CYP3A4 and reached 86% at maximal amount of antibodies added.

Figure 1. Effects of monoclonal antibodies directed against CYP3A4 on formation rates of major ring-hydroxylated metabolite of domperidone.

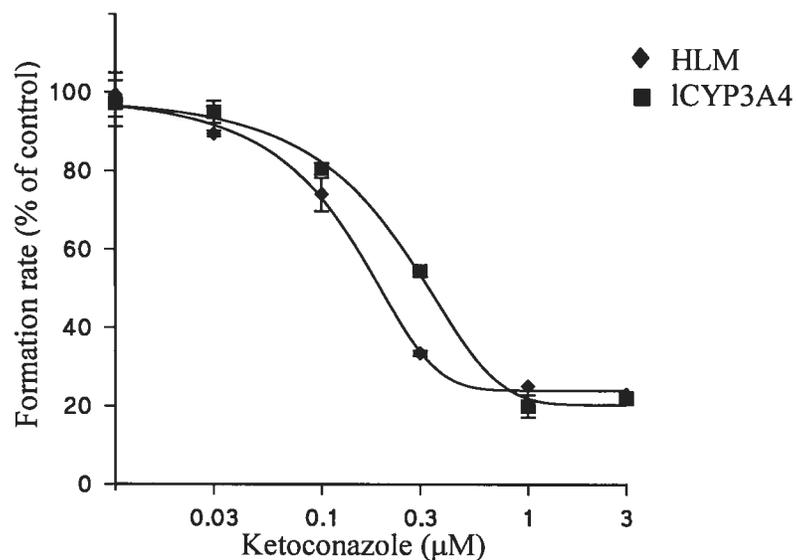


Inhibition of *in vitro* Metabolism of Domperidone by Ketoconazole or Clarithromycin. Ketoconazole (0.03-3 μM ,) significantly inhibited the formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite (figure 2). IC_{50} determined from all enzymatic sources tested ranged from 0.05 to 2.09 μM . The presence of cytochrome b5 had a major influence on inhibition characteristics observed with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5. Under these conditions, inhibition of domperidone ring-hydroxylated metabolite formation by ketoconazole appeared stronger for CYP3A4 compared to CYP3A5 (IC_{50} of 0.29 vs 2.09 μM). Moreover, IC_{50} determined with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 in the presence of cytochrome b5 was of the same order of magnitude than IC_{50} determined with human liver microsomes and microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4.

In contrast, formation of the ring-hydroxylated metabolite of domperidone formed by human liver microsomes, microsomes from lymphoblast-expressed human CYP3A4, microsomes from baculovirus-expressed human CYP3A4 or CYP3A5 in the presence of cytochrome b5, showed only limited inhibition by clarithromycin used at concentrations as high as 70 μM (Figure 3). On the other hand, formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite was inhibited up to 50% by clarithromycin 70 μM when incubations were performed with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5, in the absence of cytochromes b5.

Figure 2. Effects of ketoconazole on domperidone ring-hydroxylated metabolite formation in A) human liver microsomes (HLM) and microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 (lCYP3A4), B) microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 (rCYP3A4) and CYP3A5 (rCYP3A5) with or without cytochrome b5 (CYPb5).

A)



B)

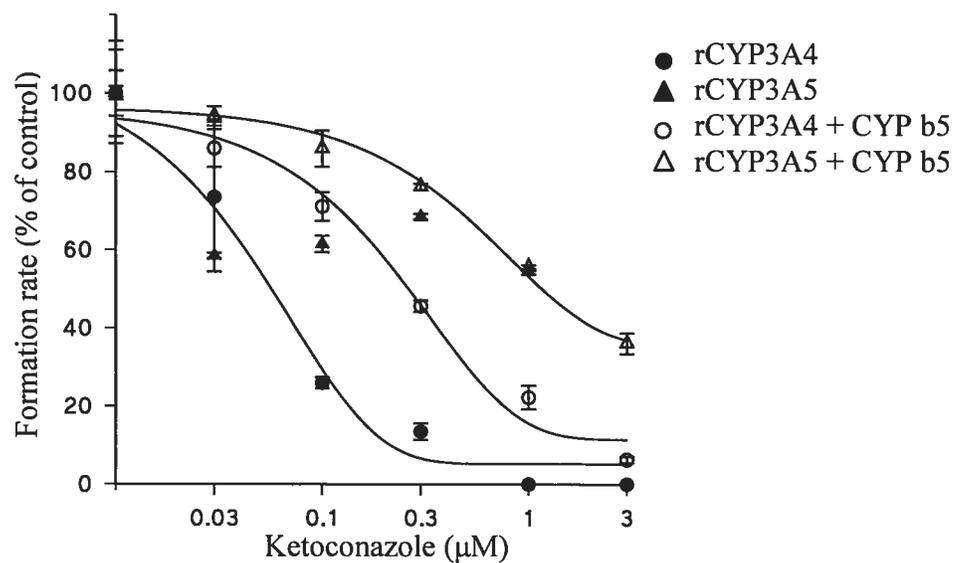
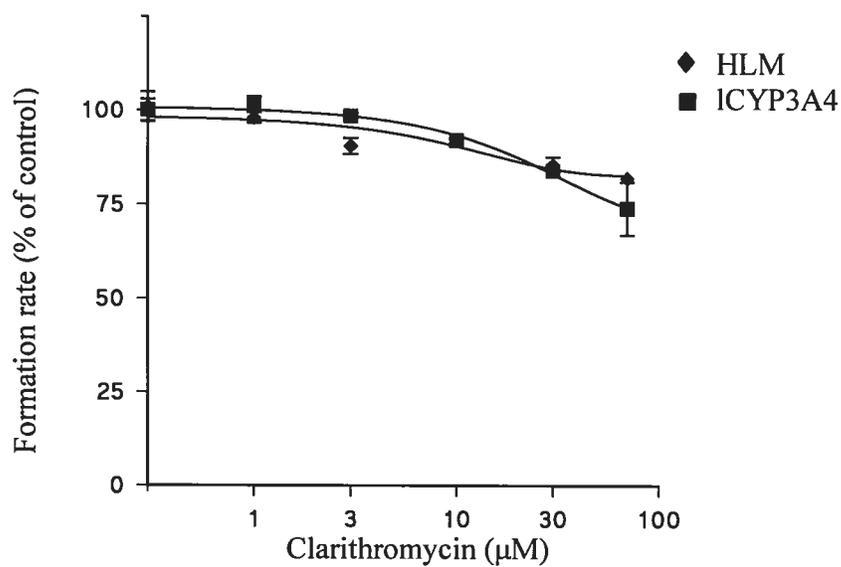
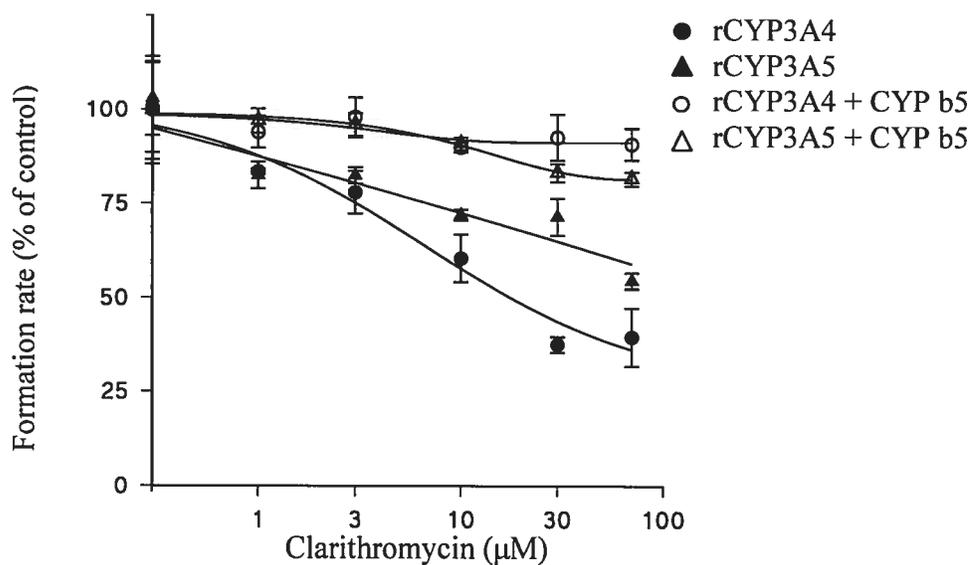


Figure 3. Effects of clarithromycin on domperidone ring-hydroxylated metabolite formation in A) human liver microsomes(HLM) and microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 (lCYP3A4), B) microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 (rCYP3A4) and CYP3A5 (rCYP3A5) with or without cytochrome b5 (CYPb5).

A)



B)

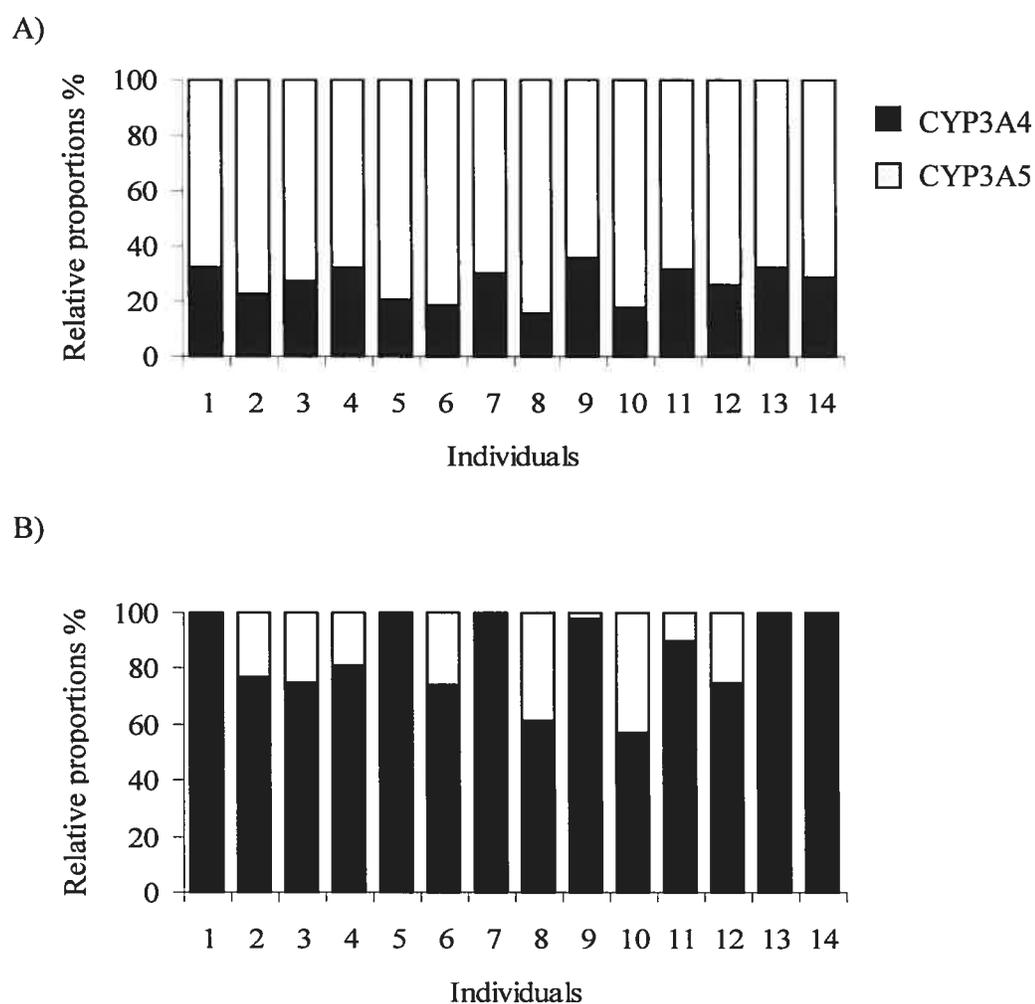


These results suggest that addition of cytochrome b5 modulates the domperidone-ketoconazole and domperidone-clarithromycin interaction. They also suggest that the presence of cytochrome b5 reproduces conditions more similar to those observed in human liver microsomes.

Relative Proportions of CYP3A4 and CYP3A5 in Human Liver Microsomes.

Using a strategy taking advantage of the different K_m values determined for the formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite by microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 and CYP3A5, an attempt was made to determine the relative proportions of CYP3A4 and CYP3A5 in human liver microsomes. Incubations were performed with human liver microsomes from 14 donors either at low concentration of domperidone (in the range of K_m for CYP3A4) or at a high concentration of domperidone (300 μM ; saturation of enzymes). A first series of experiments was conducted using domperidone concentrations of 5 μM (K_m determined for CYP3A4 without cytochrome b5) and 200 μM . Under these conditions, relative amounts of CYP3A5 were predicted to be higher than those of CYP3A4 in all livers tested with little intersubject variability (Figure 4A). In a second series of experiments, concentrations of domperidone were fixed at 26 μM (K_m determined for CYP3A4 with cytochrome b5) and 300 μM (Figure 4B). Under these conditions, relative proportions of CYP3A4 and CYP3A5 were predicted to show considerable variability among each individual. Indeed, relative amounts of CYP3A5 varied from 0-45%, with relative proportions of CYP3A4 being estimated to be higher than those of CYP3A5 in each liver tested.

Figure 4. Relative proportions of CYP3A4 and CYP3A5 in human liver microsomes from different donors. A) Proportions were calculated from incubations performed with domperidone concentrations fixed 5 μM (K_m for CYP3A4 determined without cytochrome b5) and 300 μM (saturation of enzymes). B) Incubations were performed with domperidone concentrations fixed at 26 μM (K_m for CYP3A4 determined with cytochrome b5) and 300 μM (enzymatic saturation).



DISCUSSION

In the present study, the CYP3A-mediated metabolism of domperidone was characterized by using various enzymatic sources that allow determination of the specific contribution of CYP3A4 and CYP3A5 to the formation of domperidone major ring-hydroxylated metabolite. Experiments conducted revealed that formation rate of domperidone ring-hydroxylated metabolite was higher in the presence of CYP3A4 compared to CYP3A5 and that domperidone exhibits greater affinity towards CYP3A4 compared to CYP3A5. The differences observed in K_m values for the formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite by these isoforms allowed for the characterization of the relative activities of CYP3A4 and CYP3A5 in human liver microsomes. Our study also demonstrated that cytochrome b5 is a key determinant of the catalytic activities of with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 and CYP3A5. Finally, our studies demonstrated that clarithromycin is not a powerful inhibitor of CYP3As *in vitro* when domperidone is used as a substrate marker drug.

Attempts have been made in the past with numerous substrate marker drugs to differentiate specific activities of CYP3A4 and CYP3A5 in enzymatic sources from various tissues. For instance, a first series of studies have demonstrated that CYP3A4 and CYP3A5 both participate in the 1'-hydroxylation of midazolam.^{34,35} Turnover of CYP3A5 to form 1'-hydroxymidazolam was higher (2-times) than that of CYP3A4 but affinity was higher for CYP3A4 (5 μM) compared to CYP3A5 (14 μM).³⁵⁻³⁷ Even though these results looked promising at first glance, K_m values were too close to separate adequately the respective activities of CYP3A4 and CYP3A5 and it is

currently accepted that the use of midazolam does not provide a precise measure of *in vitro* or *in vivo* CYP3A4/5 activity.

Dextromethorphan and testosterone have also been suggested as CYP3A probe drugs to distinguish between CYP3A4 and CYP3A5 activities. With dextromethorphan, assessment of kinetic parameters for the formation of 3-methoxymorphinan failed to differentiate between CYP3A4/5.^{38,39} On the other hand, a 5 to 10-fold difference was measured between these isoforms in K_m values for the *in vitro* 6 β -hydroxylation of testosterone.³⁶ Again, this looked promising but unfortunately, some factors limit the use of testosterone to differentiate *in vitro* and *in vivo* CYP3A4 and CYP3A5 activities. First, other CYP450 isoforms (CYP2C9 and CYP2C19) contribute significantly to the 6 β -hydroxylation of testosterone.⁴⁰ Finally, it can easily be conceived that kinetic parameters of endogenous substrates can not reflect the relative contribution of intestinal CYP3A4 and CYP3A5 activities to the clearance of orally administered CYP3A4/5 substrates.

It is well accepted that cytochrome b5 constitutes an electron transfer component in many oxidative reactions such as CYP450 monooxygenations.⁴¹ However, mechanisms underlying the cytochrome b5-mediated stimulation of CYP450 activities remain controversial. Some hypotheses propose that cytochrome b5 only helps the electron transfer, others propose complexation between cytochrome b5 and CYP450 allowing acceptance of electrons without the need of two interactions with CYP450 reductases; while others suggest structural influences of cytochrome b5 binding on some cytochrome P450s.⁴²⁻⁴⁴ These influences would appear to be substrate and isoform dependent.^{6,42,44-46} Allosteric stimulation by cytochrome b5 has

been proposed for CYP3As such that binding of cytochrome b5 to CYP3As caused structural influences that affect ability of the monooxygenase to undergo redox changes.^{43,44}

Catalytic activities determined for the formation of domperidone major ring-hydroxylated metabolite with microsomes from baculovirus-expressed recombinant human CYP3A4 and CYP3A5 increased 24.4-fold (CYP3A4) and 4-fold (CYP3A5) following addition of cytochrome b5. Without cytochrome b5 added, V_{max} corrected for the amount of CYP450 added was unexpectedly lower than V_{max} measured from human liver microsomes or microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4. These observations are consistent with results from other studies that demonstrated that cytochrome b5 can stimulate CYP3A4 and CYP3A5 activities and that addition of cytochrome b5 differs between recombinants CYP3A4 and CYP3A5.^{19,47-49} Our results also showed that the addition of cytochrome b5 decreased 5-fold affinity determined with microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4; the K_m increased from 5 μM (without cytochrome b5) to 26 μM , a value similar to K_m determined from human liver microsomes (36 μM) or with microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4 (34 μM).

The addition of cytochrome b5 to the incubation mixture also had a profound effect on the inhibitory potencies (IC_{50}) of ketoconazole and clarithromycin towards the formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite by microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5. For ketoconazole, inhibitory potency towards CYP3A4 was much stronger in the absence of cytochrome b5 and was in agreement with previous data reported for other CYP3A substrates

(IC₅₀ of 0.044 mM and 0.56 mM for CYP3A4 and CYP3A5 recombinants, respectively).^{50,51} Selectivity towards a greater inhibitory potency for CYP3A4 over CYP3A5 was conserved in the presence of cytochrome b5 and our results suggest an overestimation of the inhibitory potency of ketoconazole towards CYP3As in the absence of cytochrome b5.

Several studies have suggested that clarithromycin is a potent CYP3A inhibitor, especially *in vivo*.⁵² *In vitro* data are more sparse although studies conducted with midazolam estimated a Ki of 10 µM for clarithromycin towards CYP3A activities.⁵³ In our studies, clarithromycin was a very weak inhibitor of domperidone metabolism when incubations were performed with human liver microsomes, microsomes from lymphoblast-expressed CYP3A4, and microsomes from baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5 in the presence of cytochrome b5. Inhibition was observed only with baculovirus-expressed human recombinant CYP3A4 or CYP3A5 in the absence of cytochrome b5 and was more selective towards CYP3A4. Experiments were repeated on several occasions and yield very reproductive data. We have also conducted experiments with erythromycin 500 µM that inhibited formation of domperidone ring-hydroxylated metabolite by more than 75 %. Our results clearly indicate that conclusions relative to mechanisms underlying *in vivo* drug-drug interactions with clarithromycin should be revisited.

The overall objective of our study was to determine, using an enzymatic approach and a selective probe drug, the relative expression of CYP3A4 and CYP3A5 in human liver microsomes. Results obtained considering a Km of 26 µM

for CYP3A4 demonstrated wide intersubject variability in the activity of CYP3A4 and CYP3A5, with most patients showing a greater activity for CYP3A4. Variability and relative proportions measured in our study under these conditions are in agreement with previously reported data using other approaches.^{21,54}

The long term objective of our studies is to develop domperidone as an *in vivo* phenotypic probe drug for CYP3A4 and CYP3A5. Indeed, domperidone possesses several interesting characteristics such as: a very good safety profile; it can be administered both intravenously and orally to provide a measure of CYP3A4/5 activities in intestinal and hepatic tissues; metabolites and parent compound can easily be measured in biological fluids.

CONCLUSION

Results obtained in our study demonstrate that domperidone is a selective substrate of CYP3As with a 6-fold higher affinity towards CYP3A4 compared to CYP3A5. *In vitro* incubations performed at various concentrations of the substrate allowed for the characterization of CYP3A4 and CYP3A5 activities in human liver microsomes. This strategy should permit to determine the relative proportions of CYP3A4 and CYP3A5 activities present in enzymatic sources from various tissues. Our results also demonstrated the mandatory presence of cytochrome b5 to optimize kinetic conditions for CYP3A4 and CYP3A5 and finally, the weak inhibitory potency of clarithromycin towards CYP3A4 and CYP3A5.

REFERENCE LIST

1. Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, et al. Human cytochromes P450. *Molecular Aspects of Medicine* 1999; 20:1-137.
2. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:611-650.
3. Stoilov I. Cytochrome P450s: coupling development and environment. *Trends Genet* 2001; 17:629-632.
4. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene napping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6:1-42.
5. Nelson DR. Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys* 2003; 409:18-24.
6. Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 1986; 261:5051-5060.

7. Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, et al. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11:111-121.
8. Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol* 2001; 59:386-392.
9. Beaune PH, Umbenhauer DR, Bork RW, Lloyd RS, Guengerich FP. Isolation and sequence determination of a cDNA clone related to human cytochrome P-450 nifedipine oxidase. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83:8064-8068.
10. Komori M, Nishio K, Fujitani T, Ohi H, Kitada M, Mima S, et al. Isolation of a new human fetal liver cytochrome P450 cDNA clone: evidence for expression of a limited number of forms of cytochrome P450 in human fetal livers. *Arch Biochem Biophys* 1989; 272:219-225.
11. Schuetz JD, Molowa DT, Guzelian PS. Characterization of a cDNA encoding a new member of the glucocorticoid-responsive cytochromes P450 in human liver. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274:355-365.
12. Aoyama T, Yamano S, Waxman DJ, Lapenson DP, Meyer UA, Fischer V, et al. Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. *J Biol Chem* 1989; 264:10388-10395.

13. Fleming CM, Branch RA, Wilkinson GR, Guengerich FP. Human liver microsomal N-hydroxylation of dapsone by cytochrome P-4503A4. *Mol Pharmacol* 1992; 41:975-980.
14. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Bacchi CE, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:557-566.
15. Rivory LP, Slaviero KA, Hoskins JM, Clarke SJ. The erythromycin breath test for the prediction of drug clearance. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40:151-158.
16. Jones DR, Gorski JC, Haehner BD, O'Mara EM, Jr., Hall SD. Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan *N*-demethylation. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60:374-384.
17. Oellerich M, Raude E, Burdelski M, Schulz M, Schmidt FW, Ringe B, et al. Monoethylglycinexylidide formation kinetics: a novel approach to assessment of liver function. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1987; 25:845-853.
18. Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, et al. Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:825-831.

19. Hirota N, Ito K, Iwatsubo T, Green CE, Tysin CAoN, Suzuki H, et al. In vitro/ in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 2001; 22:53-71.
20. Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002; 62:162-172.
21. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:414-423.
22. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature Genet* 2001; 27:383-391.
23. Harlow GR, Halpert JR. Analysis of human cytochrome P450 3A4 cooperativity: construction and characterization of a site-directed mutant that displays hyperbolic steroid hydroxylation kinetics. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:6636-6641.
24. Kenworthy KE, Clarke SE, Andrews J, Houston JB. Multisite kinetic models for CYP3A4: simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism. *Drug Metab Disp* 2001; 29:1644-1651.

25. Domanski TL, He YA, Khan KK, Roussel F, Wang Q, Halpert JR. Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effects on substrate oxidation and cooperativity. *Biochem* 2001; 40:10150-10160.
26. Kleinbloesem CH, van Brummelen P, Faber H, Danhof M, Vermeulen NP, Breimer DD. Variability in nifedipine pharmacokinetics and dynamics: a new oxidation polymorphism in man. *Biochem Pharmacol* 1984; 33:3721-3724.
27. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, et al. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283:1552-1562.
28. Drolet B, Rousseau G, Daleau P, Cardinal R, Turgeon J. Domperidone should not be considered a no-risk alternative to cisapride in the treatment of gastrointestinal motility disorders. *Circulation* 2000; 102:1883-1885.
29. Drolet B, Khalifa M, Daleau P, Hamelin BA, Turgeon J. Block of the rapid component of the delayed rectifier potassium current by the prokinetic agent cisapride underlies drug-related lengthening of the QT interval. *Circulation* 1998; 97:204-210.
30. Osborne RJ, Slevin ML, Hunter RW, Hamer J. Cardiotoxicity of intravenous domperidone. *Lancet* 1985; 2:385

31. Quinn N, Parkes D, Jackson G, Upward J. Cardiotoxicity of domperidone. *Lancet* 1985; 2:724
32. Bruera E, Villamayor R, Roca E, Barugel M, Tronge J, Chacon R. Q-T interval prolongation and ventricular fibrillation with i.v. domperidone. *Cancer Treatment Reports* 1986; 70:545-546.
33. Osborne RJ, Slevin ML, Hunter RW, Hamer J. Cardiac arrhythmias during cytotoxic chemotherapy: role of domperidone. *Human Toxicology* 1985; 4:617-626.
34. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol* 1989; 36:89-96.
35. Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 1994; 47:1643-1653.
36. Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Disp* 2002; 30:883-891.
37. Chou FC, Tzeng SJ, Huang JD. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese. *Drug Metab Disp* 2001; 29:1205-1209.

38. Wang Y, Unadkat JD. Enzymes in addition to CYP3A4 and 3A5 mediate *N*-demethylation of dextromethorphan in human liver microsomes. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1999; 20:341-346.
39. Krecic-Shepard ME, Barnas CR, Slimko J, Gorski JC, Wainer IW, Schwartz JB. In vivo comparison of putative probes of CYP3A4/5 activity: erythromycin, dextromethorphan, and verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:40-50.
40. Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1997; 346:161-169.
41. Schenkman JB, Jansson I. The many roles of cytochrome *b*₅. *Pharmacol Ther* 2003; 97:139-152.
42. Loughran PA, Roman LJ, Miller RT, Masters BSS. The kinetic and spectral characterization of the *E. coli*-expressed mammalian CYP4A7: cytochrome *b*₅ effects vary with substrate. *Arch Biochem Biophys* 2001; 385:311-321.
43. Imaoka S, Imai Y, Shimada T, Funae Y. Role of phospholipids in reconstituted cytochrome P450 3A form and mechanism of their activation of catalytic activity. *Biochem* 1992; 31:6063-6069.

44. Yamazaki H, Johnson WW, Ueng YF, Shimada T, Guengerich FP. Lack of electron transfer from cytochrome b_5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. *J Biol Chem* 1996; 271:27438-27444.
45. Shet MS, Faulkner KM, Holmans PL, Fisher CW, Estabrook RW. The effects of cytochrome b_5 , NADPH-P450 reductase, and lipid on the rate of 6 β -hydroxylation of testosterone as catalyzed by a human P450 3A4 fusion protein. *Arch Biochem Biophys* 1995; 318:314-321.
46. Vatsis KP, Theoharides AD, Kupfer D, Coon MJ. Hydroxylation of prostaglandins by inducible isozymes of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *J Biol Chem* 1982; 257:11221-11229.
47. Lee CA, Kadwell SH, Kost TA, Serabjit-Singh CJ. CYP3A4 expressed by insect cells infected with a recombinant baculovirus containing both CYP3A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase is catalytically similar to human liver microsomal CYP3A4. *Arch Biochem Biophys* 1995; 319:157-167.
48. Nakajima M, Tane K, Nakamura S, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. Evaluation of approach to predict the contribution of multiple cytochrome P450s in drug metabolism using relative activity factor: effects of the differences in expression levels of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b_5 in the expression system and the differences in the marker activities. *J Pharm Sci* 2002; 91:952-963.

49. Yamazaki H, Nakamura M, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, et al. Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome *b*₅ on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of escherichia coli. *Protein Expression and Purification* 2002; 24:329-337.
50. Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD, Kunze KL. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of *K*_i values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab Disp* 1999; 27:180-187.
51. Patki KC, Von Moltke LL, Greenblatt DJ. In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochrome P450: role of CYP3A4 and CYP3A5. *Drug Metab Disp* 2003; 31:938-944.
52. Ito K, Ogihara K, Kanamitsu SI, Itoh T. Prediction of the in vivo interaction between midazolam and macrolides based on in vitro studies using human liver microsomes. *Drug Metab Disp* 2003; 31:945-954.
53. Mayhew BS, Jones DR, Hall SD. An in vitro model for predicting in vivo inhibition of cytochrome P450 3A4 by metabolic intermediate complex formation. *Drug Metab Disp* 2000; 28:1031-1037.

54. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P-450III_{A5} (HL_{p3}). *Mol Pharmacol* 1990; 38:207-213.

CHAPÎTRE 1V

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GENERALE

Plusieurs facteurs peuvent affecter la réponse d'un patient à son traitement pharmacologique. Parmi ceux-ci, il faut noter les facteurs reliés directement au patient tels que la génétique, la présence de conditions pathologiques et physiologiques et les facteurs reliés aux médicaments. L'utilisation de plus d'un médicament dans l'établissement d'un régime thérapeutique est fréquemment rencontrée en clinique. Bien que plusieurs associations médicamenteuses soient justifiées au niveau de l'efficacité, elles prédisposent cependant les patients à des risques d'interactions médicamenteuses. D'où l'importance d'approfondir les notions reliées aux isoenzymes du cytochrome P450 puisqu'elles constituent un des déterminants majeurs des interactions médicamenteuses et d'effets indésirables qui sont des causes importantes de mortalité et de morbidité.

Parmi les différentes isoenzymes des cytochromes P450, les CYP3A4 et CYP3A5 représentent les isoformes majeures impliquées dans le métabolisme des médicaments. La découverte d'un substrat marqueur pouvant distinguer les médicaments substrats de CYP3A4 et/ou CYP3A5 permettra de mieux comprendre les mécanismes associés aux variabilités interindividuelles observées dans la réponse à ces médicaments. Suite aux résultats obtenus lors de mes travaux de maîtrise, il a été démontré que la dompéridone est un substrat spécifique à la famille CYP3A. De plus, nos résultats suggèrent que la dompéridone pourrait constituer un substrat marqueur des CYP3A4 et CYP3A5. Ainsi, il est possible d'envisager que l'utilisation d'un phénotype à l'aide de la dompéridone et de son métabolite majeur pourra

constituer un outil dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques. En fait, un phénotype réalisé à partir de la dompéridone fournirait un portrait de la capacité catalytique globale pour les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 pour un individu donné à un temps spécifique. Ceci permettra donc une estimation plus précise du devenir du médicament dans l'organisme et par conséquent, de la réponse pharmacologique pour des substrats des CYP3A4/5 d'un patient. L'utilisation de la dompéridone comme substrat marqueur devrait permettre de réduire les problèmes liés aux interactions médicamenteuses potentielles, les effets indésirables, les toxicités ainsi que les échecs thérapeutiques pour des médicaments substrats des CYP3A4/5.

ANNEXE I

DÉCLARATION DES COAUTEURS

DÉCLARATIONS DES COAUTEURS

Véronique Michaud

M.Sc. Sciences Pharmaceutiques (2-700-1-0), option pharmacologie

DOMPERIDONE AS AN IN VITRO SUBSTRATE MARKER DRUG TO DIFFERENTIATE BETWEEN CYP3A4 AND CYP3A5 ACTIVITIES.**Véronique Michaud, B.Pharm., Chantale Simard, Ph.D., Robert Massé, Ph.D. and Jacques Turgeon, Ph.D.**

Article à soumettre au Clinical Pharmacology and Therapeutics

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que VÉRONIQUE MICHAUD inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : l'utilisation de la dompéridone comme substrat marqueur de l'activité *in vitro* des CYP3A4 et CYP3A5.

Chantale Simard

Coauteur

Signature

Date

Robert Massé

Coauteur

Signature

Date

Jacques Turgeon

Coauteur

Date

26-02-04

23/02/04

DÉCLARATIONS DES COAUTEURS

Véronique Michaud

M.Sc. Sciences Pharmaceutiques (2-700-1-0), option pharmacologie

**DOMPERIDONE AS AN IN VITRO SUBSTRATE MARKER DRUG TO DIFFERENTIATE
BETWEEN CYP3A4 AND CYP3A5 ACTIVITIES.**

**Véronique Michaud, B.Pharm., Chantale Simard, Ph.D., Robert Massé, Ph.D.
and Jacques Turgeon, Ph.D.**

Article à soumettre au Clinical Pharmacology and Therapeutics

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que VÉRONIQUE MICHAUD inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : l'utilisation de la dompéridone comme substrat marqueur de l'activité *in vitro* des CYP3A4 et CYP3A5.

Chantale Simard
Coauteur


Signature

9 déc. 2003
Date

Robert Massé
Coauteur

Signature

Date

Jacques Turgeon
Coauteur

Signature

Date