

Université de Montréal

L'inhibition des cytochromes P450 dans les cas d'insuffisance rénale
chronique : rôle de l'hormone parathyroïdienne.

par
Josée Michaud

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
de Docteur (PhD) en Pharmacologie.

Juillet, 2012

© Josée Michaud, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
L'inhibition des cytochromes P450 dans les cas d'insuffisance rénale
chronique : rôle de l'hormone parathyroïdienne.

présentée par :
Josée Michaud

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Patrick du Souich
Président-rapporteur
et
Représentant du doyen

Dr Vincent Pichette
Directeur de recherche

Dr Mohsen Agharazii
Examineur externe

Dr Jean Spénard
Membre du jury

Résumé en français

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est associée à une réduction du métabolisme de plusieurs médicaments, due à une diminution du cytochrome P450 (CYP450) hépatique. Nos études précédentes ont montré que l'IRC affecte l'activité *in vivo* et *in vitro*, de même que l'expression protéique et génique des différents isoformes du CYP450, via la présence du sérum urémique et de l'hormone parathyroïdienne (PTH).

Ce projet de doctorat se divise en quatre parties.

Premièrement, nous avons développé une méthode d'analyse de l'activité du CYP450, à l'aide de la production du 3-hydroxy-5,5-diméthyl-4-[4-(méthylsulfonyl)phényl] furan-2(5H)-one (DFH) à partir du 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-diméthyl-4-[4-méthylsulfonyl]phényl furan-2(5H)-one (DFB). Cette méthode nous a permis de mieux quantifier l'activité dans les études subséquentes.

Deuxièmement, l'activité du CYP450 3A est diminuée chez les patients atteints d'IRC. De plus, il a déjà été démontré que des toxines urémiques dialysables seraient impliquées puisque l'hémodialyse prévient cette inhibition du CYP450. Par contre, le mécanisme expliquant l'amélioration transitoire la composition du sérum

de patients atteints d'IRC par l'hémodialyse n'est pas connu. L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de l'hémodialyse sur l'expression protéique et génique, de même que sur l'activité du CYP450 3A2 dans un modèle d'hépatocytes de rat en culture.

Troisièmement, la déficience en calcidiol est fréquente dans les cas d'IRC et l'étiologie est peu connue. Nous avons récemment montré que l'IRC est associée à une diminution du métabolisme des médicaments par le foie suite à une réduction des différents isoformes du CYP450 en partie médiée par l'hormone parathyroïdienne (PTH). La 25-hydroxylation de la vitamine D, au niveau du foie, permet la formation du calcidiol par différents isoformes du CYP450 (CYP2C11, 27A1, 2R1, 3A2 et 2J3) et pourrait être ainsi altérée en présence d'IRC. Les objectifs de cette étude sont de a) confirmer la diminution de synthèse de calcidiol en présence d'IRC et b) évaluer le rôle de la PTH dans la déficience en calcidiol.

Finalement, afin de mieux comprendre les inhibitions du CYP450, nous avons étudié les voies de signalisation impliquées dans la régulation du CYP450 en présence d'IRC et avec la PTH puisque les mécanismes d'action demeurent imprécis. La contribution des facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires suivants est étudiée ; le récepteur pregnane X (PXR), le récepteur constitutif androstane (CAR) et le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), puisqu'ils sont potentiellement activés par le récepteur de la PTH et ces molécules ont été précédemment impliqués dans la régulation du CYP450.

Les résultats obtenus montrent que l'hémodialyse des patients atteints d'IRC améliore transitoirement l'expression du CYP450 lorsque des hépatocytes sont mis en culture avec du sérum provenant de ces patients. Aussi, la 25-hydroxylation de la vitamine D est affectée par l'IRC. Les voies de signalisation du NF- κ B et les facteurs nucléaires PXR et CAR sont impliqués dans l'inhibition du CYP450.

En conclusion, l'IRC affecte, non seulement le métabolisme des médicaments mais aussi l'hydroxylation de la vitamine D, un des rôles endogènes effectués par le CYP450. Ces études nous permettent de mieux comprendre les effets de l'IRC afin de mieux cibler les traitements de choix pour les patients qui en sont atteints.

Mots clés : Cytochrome P450, Vitamine D, Hormone parathyroïdienne, Dialyse, Insuffisance rénale chronique, Facteurs nucléaires, Hépatocytes, PXR, CAR, NF- κ B, DFB, DFH.

Résumé en anglais (Abstract)

Chronic renal failure (CRF) is associated with a decrease in drug metabolism, due to a down-regulation of hepatic cytochrome P450 (CYP450). Previous studies indicated that CRF modifies activity, protein and mRNA expression of different CYP450 isoforms *in vivo* and *in vitro* via circulating mediators and parathyroid hormone (PTH).

This PhD project is divided in four parts.

First, we have developed an assay in order to measure the CYP3A's activity, using the production of 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl] furan-2(5H)-one (DFB). This method will be used in the next studies.

Secondly, CYP450 activity and expression are decreased in patients with end-stage renal disease (ESRD). It has been shown that dialyzable uremic toxins could be implicated in these decreases. Recent studies indicated that hemodialysis can prevent the inhibition of P450 although the mechanism remains to be defined. The aim of this study was to evaluate the effect of hemodialysis on P450 expression and activity using a rat hepatocytes culture model.

Thirdly, calcidiol insufficiency is highly prevalent in CRF and the pathophysiology of this phenomenon is poorly understood. Recently, we have demonstrated that CRF is associated with a decrease in hepatic drug metabolism due to a reduction in liver CYP450, which is in part mediated by PTH. The formation of calcidiol, through hepatic 25-hydroxylation, is also mediated by several CYP450 isoforms (CYP2C11, 27A1, 2R1, 3A2 and 2J3) and could thus be altered in CRF. The objectives of the present study in rats presenting a CRF were a) to confirm the role of CRF on calcidiol levels and b) to evaluate the role of PTH in calcidiol apparent deficiency.

Finally, in order to understand all the CYP450 inhibitions, we evaluated the mechanisms of action of CYP450. CRF and PTH cause an inhibition of CYP450 although the mechanisms remain to be defined. The aim of this study was to evaluate the contribution of different nuclear receptors or transcription factors like; pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) and nuclear factor kappa B (NF- κ B).

The results obtained show that the hemodialysis of CRF patients improves the CYP450's expression in the cultured hepatocytes, with the serum from these patients. Also, the vitamin D 25-hydroxylation is affected by CRF. The activation of NF- κ B and nuclear factors PXR and CAR are implicated in the CYP450's inhibition.

In conclusion, CRF affects not only drug metabolism but also vitamin D hydroxylation, one of the endogenous roles performed by CYP450. This study will enable us to understand the effect of CRF on CYP450 regulation in order to improve the treatment of CRF patients.

Keywords : Cytochrome P450, Vitamin D, Parathyroid Hormone, Dialysis, Chronic renal failure, Nuclear Factors, Hepatocytes, PXR, CAR, NF- κ B, DFB, DFH.

Table des matières

<i>Résumé en français</i>	<i>iii</i>
<i>Résumé en anglais (Abstract)</i>	<i>vi</i>
<i>Table des matières</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xi</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>xii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xiii</i>
<i>Dédicace</i>	<i>xv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xvi</i>
1. Introduction	18
1. L'insuffisance rénale chronique	18
1.1 Définition/prévalence	18
1.2 Étiologie	19
1.3 Pathologies associées.....	21
1.4 Traitements de remplacement de la fonction rénale	27
1.5 Problèmes de pharmacocinétique en présence d'IRC	34
1.5.1 Absorption.....	35
1.5.2 Distribution.....	40
1.5.3 Métabolisme	42
1.5.4 Élimination	43
2. Cytochrome P450	46
2.1 Rôles des CYP450s dans la biotransformation des xénobiotiques.....	51
2.1.1 Isoformes impliqués dans le métabolisme des médicaments.....	53
2.1.1.1 Famille CYP1A.....	53
2.1.1.2 Famille CYP2	54
2.1.1.3 Famille CYP3A.....	57
2.2 Rôles des CYP450s dans la biotransformation des endobiotiques	58
2.2.1 Stéroïdes.....	59
2.2.2 Cholestérol et acides biliaires.....	60
2.2.3 Acide rétinoïque	60
2.2.4 Acide arachidonique.....	60
2.2.5 Vitamine D.....	61
2.3 Inhibition/Induction des CYP450s	64
2.3.1 Inhibition des CYP450s en présence d'IRC	65
2.3.2 Inhibition des CYP450s par la PTH.....	69
2.3.3 Effet de la dialyse/transplantation sur le CYP450	71
2.4 Méthodes d'analyse de l'activité des CYP450s	72
2.5 Régulation des CYP450s	73
2.5.1 PXR	74
2.5.2 CAR	77
2.5.3 VDR.....	78
2.5.4 NF-κB	79

3. L'hormone parathyroïdienne	81
3.1 L'hyperparathyroïdie secondaire	83
3.2 Récepteurs à PTH et voies d'activation.....	86
3.3 Effets des voies de signalisation de la PTH sur le CYP450.....	88
3.3.1 PKA	88
3.3.2 PKC	89
3.3.3 Activation NF-κB.....	90
4. Hypothèses	91
5. Objectifs	92
6. Article 1	93
7. Article 2	117
8. Article 3	144
9. Article 4	190
10. Discussion	222
10.1 Mise au point d'une méthode d'analyse de l'activité du CYP450.....	222
10.2 Effet de l'hémodialyse sur l'expression du CYP450.	231
10.3 Effet de l'IRC sur l'hydroxylation de la vitamine D.	242
10.4 Voies de signalisation cellulaires activées lors de la diminution du CYP450.....	258
11. Conclusion	264
12. Bibliographie	268

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification de l'IRC</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 2 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs du CYP1A1/2.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 3 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs de la famille CYP2.....</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 4 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs du CYP3A4</i>	<i>58</i>
<i>Tableau 5 : Substrats endogènes des CYP450s</i>	<i>59</i>
Article 2	
<i>Table 1 : Demographic characteristics of ESRD patients.....</i>	<i>139</i>
Article 3	
<i>Table 1 : Physical and biochemical characteristics and vitamin D concentrations of the control rats and rats with CRF</i>	<i>179</i>
<i>Table 2 : Physical and biochemical characteristics and vitamin D levels of rats with PTX.....</i>	<i>180</i>
<i>Table 3 : Nucleotide sequences of PCR primers</i>	<i>181</i>
Article 4	
<i>Tableau 1 : Caractéristiques biochimiques des rats.....</i>	<i>221</i>
<i>Tableau 2 : Numéro de référence des amorces PCR.....</i>	<i>221</i>

Liste des figures

Figure 1: Dialyse péritonéale	29
Figure 2 : L'hémodialyse	31
Figure 3 : Les transporteurs intestinaux	38
Figure 4 : Les transporteurs hépatiques	39
Figure 5 : Les transporteurs rénaux	45
Figure 6 : Cycle catalytique du CYP450.....	49
Figure 7 : Implication des enzymes de phase I et II dans le métabolisme des médicaments.....	51
Figure 8 : Principaux isoformes hépatiques responsables du métabolisme des médicaments chez l'humain (Guengerich 2003).	52
Figure 9 : Représentation de l'expression relative des différents CYP450s hépatiques chez l'humain ..	55
Figure 10 : Hydroxylation de la vitamine D.....	63
Figure 11 : Représentation du mode de fonctionnement de PXR	75
Figure 12 : Représentation du mode de fonctionnement du NF- κ B.....	80
Figure 13 : La régulation du calcium et du phosphate.....	85
Figure 14 : L'hyperparathyroïdie secondaire	86
Figure 15 : Voies de signalisation activées par la liaison de la PTH sur son récepteur (modifiée de Friedman (Friedman and Goodman 2006)).	88
Figure 16 : Résumé des résultats	267

Article 1

Figure 1 : Chemical structure of the substrate 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5, 5- dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl] furan-2(5H)-one (DFB)	113
Figure 2 : Specificity of anti-rat CYP450 antibodies	114
Figure 3 : Inhibition of DFB metabolism by immuno-neutralizing antibody.....	115
Figure 4 : Selectivity of DFB for CYP3A isoform	116

Article 2

Figure 1 : Effect of hemodialysis on downregulation of protein expression of cytochrome P450 induced by uremic serum	140
Figure 2 : Effect of hemodialysis on downregulation of mRNA of cytochrome P450 induced by uremic serum	141
Figure 3 : Effect of hemodialysis on downregulation of CYP3A activity induced by uremic serum....	142
Figure 4 : Effect of NF- κ B inhibition by andrographolide on the downregulation of cytochrome P450 by uremic serum	143

Article 3

Figure 1 : Vitamin D ₃ biotransformation pathway	182
Figure 2 : Increases in serum creatinine and PTH correlate with reduction in serum 25(OH)D ₃ concentration.....	183
Figure 3 : In vivo 25(OH)D ₃ production decreases in rats with CRF.....	184
Figure 4 : Uremic serum contains factors reducing 25-hydroxylation of vitamin D ₃ by hepatocytes.185	
Figure 5: CRF downregulates the protein and mRNA expression of various CYP450s implicated in 25(OH)D ₃ hydroxylation.....	186
Figure 6: Serum PTH concentration regulates 25-hydroxylation of vitamin D ₃	188

Article 4

Figure 1: Effet de l'IRC sur la diminution de l'expression protéique et génique de PXR	214
Figure 2 : Effet de l'IRC sur la diminution de l'expression protéique et génique de CAR	216
Figure 3 : Effet de l'IRC sur l'accumulation nucléaire de NF- κ B dans les foies de rats	218

Liste des abréviations

1,25(OH)₂D₃ : 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (calcitriol)

¹⁴C : Carbone 14

25(OH)D₃ : 25-hydrovitamine D₃ (calcidiol)

AGE : Produits de glycation avancés

AhR : Récepteur aryl hydrocarbure

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

CaR : récepteur membranaire du calcium

CAR : Récepteur constitutif androstane

CRP : Protéine C-réactive

CYP450 : Cytochrome P450

DFG : Débit de filtration glomérulaire

EPO : Érythropoïétine

GR : Récepteur glucocorticoïde

HPTS : Hyperparathyroïdie secondaire

IL-1 : Interleukine-1

IL-6 : Interleukine-6

IRC : Insuffisance rénale chronique

KDa : Kilodalton

LPS : Lipopolysaccharide

MRP2 : *Multi-drug resistance related protein de type 2*

NAT : N-acétyltransférases

NF- κ B : Facteur nucléaire kappa B

OAT : *Organic anion transporter*

OATP : *Organic anion transporting polypeptides*

P-gp : P-glycoprotéine

pH : Potentiel hydrogène

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptors*

PTH : Hormone parathyroïdienne

PTHrR : Récepteur à la PTH de type 1

PTHrP : Parathyroid-hormone-related protein

PTX : Parathyroïdectomie

PXR : Récepteur pregnane X

RXR : Récepteur acide rétinoïque

sICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire

URAT : *Urate transporter*

VDR : Récepteur vitamine D

Dédicace

Les chemins tortueux ont au moins
l'avantage de te garder éveillé.

Germain Véronneau

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Dr Vincent Pichette, de m'avoir accueillie dans son équipe pour un tout premier stage, qui s'est transformé en une maîtrise et un doctorat. Il a été d'un grand soutien et un mentor pour mon apprentissage. Je le remercie d'avoir été présent ainsi que pour tous ses conseils professionnels mais aussi personnels.

De plus, je tiens à remercier les membres de ce jury, les docteurs du Souich, Spénard et Agharazii, d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Je remercie tous les membres du laboratoire présents et passés, qui ont su mettre de la vie dans chaque journée et me donner leurs aides techniques et leurs encouragements : Caroline, Christopher, Émilie, Jessica, Judith, Mélina et Stéphanie. Un merci particulier à François pour son aide, ses idées et son support durant les 11 dernières années. De plus, je remercie Louise Lévesque et Julie Dubeau qui m'ont beaucoup aidée avec les animaux.

Je suis aussi très reconnaissante au du département de pharmacologie de l'Université de Montréal, à la Fondation de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, au Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ), aux Instituts de recherche en santé

du Canada (IRSC), à la Fondation Marc Bourgie, à la Fondation J.A. De Sève et au Groupe Financier RBC ainsi que la FESP, pour leur support financier.

Je remercie le Dr Denis DeBlois qui m'a permis de participer à un stage en développement du médicament à Barcelone.

Finalement, je tiens à remercier du plus profond de mon cœur, tous mes amis et ma famille, qui m'ont toujours permis de croire en mes rêves et qui jour après jour sont là pour moi et m'encouragent à continuer : Gaétan, Lisette, Simon, Nadine, Arianne, Caroline, les familles Michaud et Fortin et tout ceux qui n'apparaissent pas mais qui se reconnaissent...

1. Introduction

1. *L'insuffisance rénale chronique*

1.1 Définition/prévalence

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une maladie caractérisée par une diminution de néphrons fonctionnels où les reins ne sont donc plus en mesure de concentrer ou diluer l'urine. La fonction principale du rein n'est alors plus complétée correctement et des problèmes d'homéostasie apparaissent progressivement ainsi qu'un changement dans la concentration des électrolytiques.

L'IRC se divise en 5 stades, selon l'atteinte et la sévérité de la maladie (voir [Tableau 1](#)). Les différents stades sont déterminés par le débit de filtration glomérulaire (DFG) du patient, principal marqueur de la fonction rénale. Le stade 1 est défini comme un DFG égal ou supérieur à $90 \text{ mL/min/1,73 m}^2$, mais où il y a un dommage rénal. Ensuite, le stade 2 est caractérisé par une faible diminution du DFG entre $60\text{-}89 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ et un dommage rénal léger. Le stade 3 est associé à une atteinte rénale modérée et le DFG varie alors entre $30\text{-}59 \text{ mL/min/1,73 m}^2$. Au stade 4, le DFG se situe entre $15\text{-}29 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ et des dommages sévères sont présents. Finalement, le stade 5 est aussi appelé la phase terminale de l'IRC et le DGF est inférieur à $15 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ (Levey, Eckardt et al. 2005). Lorsqu'un patient atteint ce stade, seulement les thérapies de remplacement rénales, c'est-à-

dire les traitements de dialyse ou la transplantation rénale, peuvent assurer sa survie.

Tableau 1 : Classification de l'IRC

Stade	Description	Classification par la sévérité	
		DFG mL/min/1,73m ²	Associée à
1	Domage rénal avec un DFG normal	≥90	Albuminurie, protéinurie, hématurie
2	Domage rénal léger et faible diminution du DFG	60-89	Albuminurie, protéinurie, hématurie
3	Atteinte rénale modérée et diminution du DFG	30-59	Insuffisance rénale modérée
4	Dommages sévères et diminution du DFG	15-29	Insuffisance rénale sévère
5	Défaillance rénale	<15 (ou dialyse)	Phase terminale de l'IRC, urémie

Traduit de l'article (Levey, Eckardt et al. 2005).

1.2 Étiologie

Le diabète et l'hypertension sont les deux principales causes de l'IRC (Guyton and Hall 2000). Elle peut aussi être causée par une glomérulonéphrite chronique, une pyélonéphrite chronique, une maladie rénale polykystique ou une perte de tissu rénal suite à un traumatisme. De plus, le vieillissement cause une perte progressive de la fonction rénale à raison de 1 mL/min/an à partir de 40 ans (Silva 2005). À lui seul le vieillissement ne cause pas d'IRC mais lorsqu'associé au diabète, à l'hypertension ou à l'obésité, il peut augmenter les risques de progresser vers un stade plus important de la maladie.

L'IRC est en forte progression mondialement, mais particulièrement dans les pays développés où le diabète et l'hypertension sont aussi de plus en plus prévalents (Levey, Astor et al. 2010). Au Canada, 1,9 à 2,3 millions de personnes sont atteintes d'IRC (stade 1 à 5) et près de 38 000 Canadiens souffrent du stade terminal de l'IRC (stade 5). Le nombre de patients canadiens atteint du stade terminal d'IRC a triplé dans les 20 dernières années, ce qui s'explique par un accroissement du diabète, une augmentation des taux d'obésité et le vieillissement de la population (www.cihi.ca). Dans les pays sous-développés, les principales causes sont les glomérulonéphrites post-infectieuses (streptocoque, E. Coli, hépatite, schistosomiase, malaria) et les infections urinaires non-traitées.

Selon l'institut canadien d'information sur la santé (ICIS) (www.cihi.ca), les coûts associés à l'hémodialyse sont de 60 000 \$/an par patient, alors que le coût d'une transplantation rénale est de 23 000 \$ accompagné de 6 000 \$ annuellement pour les traitements anti-rejets. De plus, les complications médicales liées à l'IRC sont très nombreuses, nécessitant le suivi des patients par différents spécialistes, des hospitalisations plus fréquentes ainsi que des risques d'interactions médicamenteuses augmentés. Tous ces traitements sont très coûteux et une augmentation constante de l'incidence de l'IRC impose des coûts de plus en plus importants sur un système de santé déjà surchargé.

1.3 Pathologies associées

L'IRC cause de nombreuses complications sur le plan médical pour les patients qui en sont atteints. Les reins sont responsables de trois fonctions majeures dans le corps humain, telles que l'élimination des déchets azotés du corps à l'aide de la filtration et de la production d'urine, la production d'hormones endocrines (l'érythropoïétine, les hormones qui régulent la pression sanguine et la vitamine D) et la régulation d'électrolytes dans le sang. Des dommages importants aux reins compromettent ces trois fonctions (Guyton and Hall 2000).

L'accumulation de produits endogènes apparaît progressivement selon la perte de fonction rénale et elle est causée par une augmentation de l'urée et d'autres déchets tels que l'urée et la créatinine. Ce sont des sous-produits du métabolisme des protéines et sont généralement filtrés pour être éliminés de la circulation sanguine. L'urée et la créatinine sont généralement des marqueurs fournissant aux cliniciens de l'information sur le degré d'IRC.

L'acidose peut aussi survenir chez les patients atteints d'IRC, puisque le corps produit un peu plus de produits acides que de produits basiques. En présence d'IRC, les reins sont incapables de générer suffisamment d'ammoniaque dans les tubules proximaux afin de permettre l'excrétion des acides endogènes sous forme d'ammonium. Normalement, le pouvoir tampon du sang et le phosphate contenu dans les os peuvent neutraliser une partie de ces acides mais, lorsque le pouvoir

tampon ne suffit plus, le pH du sang peut chuter jusqu'à des niveaux pouvant causer le coma ou le décès (Kraut and Madias 2011).

De plus, une dysfonction de la filtration peut aussi provoquer un œdème général causé par une rétention hydrosodée. En plus de l'œdème, cette rétention hydrosodée provoque aussi de l'hypertension artérielle, par l'augmentation du volume plasmatique. L'hypertension est responsable de l'apparition de l'IRC, mais l'IRC entraîne aussi une augmentation de la tension artérielle. Cette hypertension est secondaire aux lésions rénales qui réduisent la capacité des reins d'excréter le sodium et l'eau, ainsi qu'à une augmentation de la sécrétion rénale de rénine responsable de la production d'angiotensine, un vasoconstricteur.

Le rein est responsable aussi de la production de certaines hormones, telle que l'érythropoïétine. L'érythropoïétine est responsable de la production des globules rouges dans la moelle osseuse, appelée érythropoïèse. L'érythropoïétine est synthétisée dans les cellules rénales situées dans l'interstitium en réponse à l'hypoxie. L'apparition de l'IRC cause une diminution de la masse rénale qui provoque alors une diminution de la production d'érythropoïétine et induit donc, chez les patients atteints d'IRC, une anémie. L'anémie peut aussi être causée par une destruction accrue des globules rouges lors du passage du sang dans les filtres de l'hémodialyseur et aussi à la réduction de la demie-vie des globules rouges causée par l'environnement urémique. De plus, la diminution de l'absorption du fer

au niveau de l'intestin et l'état inflammatoire général sont d'autres facteurs qui influencent l'apparition de l'anémie chez les patients atteints d'IRC (Gaweda, Goldsmith et al. 2010). Finalement, les patients atteints d'IRC ne sont pas à l'abri des causes d'anémie touchant la population générale.

La vitamine D est essentielle à l'homéostasie du calcium et du phosphate dans l'organisme ainsi qu'à la formation de l'os. La vitamine D est hydroxylée par le rein pour se transformer en forme active (1,25-dihydroxyvitamine D). Les carences en vitamine D active causent une hyperparathyroïdie secondaire (HPTS), se manifestant par des concentrations de parathormone élevés, secondairement à une hypocalcémie et une hyperphosphatémie (Levi and Silver 2005, Levi and Silver 2005). De plus, ces désordres phosphocalciques peuvent mener à l'ostéomalacie, caractérisée par une déminéralisation des os ainsi qu'à une ostéite fibreuse et l'os adynamique. (Les causes et les détails de l'HPTS seront discutés dans la section 3).

De plus, la concentration sérique des électrolytes est finement régulée par le rein, permettant soit l'excrétion de ceux-ci dans l'urine ou leur réabsorption pour permettre de conserver des concentrations optimales (Guyton and Hall 2000). On observe chez les patients atteints d'IRC une hypocalcémie, une hyperphosphatémie, une rétention de sodium et une hyperkaliémie. Un changement de concentration de certains électrolytes dans le sang peut affecter le fonctionnement de nombreux systèmes comme par exemple le système cardiovasculaire. Une hyperkaliémie peut

provoquer des troubles de la conduction cardiaque et des arythmies. L'hyperphosphatémie et l'hypocalcémie sont responsables de la progression de l'HPTS et des troubles osseux. La rétention sodique cause de l'œdème, qui est à l'origine de l'hypertension artérielle.

Les désordres lipidiques sont aussi très fréquents chez les patients atteints d'IRC et peuvent être expliqués par plusieurs facteurs (Tsimihodimos, Mitrogianni et al. 2011, Vaziri and Norris 2011). La diminution des niveaux du HDL-cholestérol s'explique par la diminution de l'estérification du cholestérol libre, la diminution des composants du HDL-cholestérol (apolipoprotéines AI et AIII) et l'augmentation de l'activité de la protéine de transfert cholestéryl-ester (Vaziri 2009). De plus, les patients atteints d'IRC présentent des taux plasmatiques de triglycérides élevés, secondairement à une augmentation des niveaux d'apoprotéine CIII, inhibiteur de la lipoprotéine lipase. L'hypertriglycéridémie est secondaire à une augmentation de la synthèse des triglycérides et à une diminution de leur clairance. Puisque le catabolisme des triglycérides est diminué, il y a accumulation de certaines lipoprotéines (VLDL, chylomicrons, LDL-cholestérol et Lp(a)). Certaines de ces lipoprotéines peuvent alors provoquer la formation de radicaux libres, ce qui provoque un stress oxydatif et une détérioration de la fonction endothéliale (Chmielewski, Carrero et al. 2008).

L'IRC est considérée comme un état inflammatoire. Cet état est causé par l'activation des monocytes/lymphocytes ce qui provoque une production de cytokines pro-inflammatoires (l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1 (IL-1) et TNF- α) (Stenvinkel, Ketteler et al. 2005, Carrero and Stenvinkel 2010, Cheung, Paik et al. 2010). L'état inflammatoire observé dans les cas d'IRC et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires sont la cause majeure du stress oxydatif et de l'atteinte endothéliale (Stenvinkel and Alvestrand 2002, Santoro, Bellinghieri et al. 2010). On observe aussi une augmentation de la synthèse de protéine C-réactive (CRP) et de fibrinogène, l'accumulation de molécules de type produits de glycation avancés (AGE) et l'augmentation de la molécule d'adhésion intracellulaire (sICAM-1) (Stenvinkel and Alvestrand 2002). De plus, l'hémodialyse est responsable aussi de l'état inflammatoire des patients atteints d'IRC. L'interaction entre le sang et la membrane de l'hémodialyseur et de la tubulure, l'activation du complément ainsi que la stérilité du dialysat sont des facteurs qui peuvent aggraver l'état inflammatoire. Les infections fréquentes, particulièrement celles des accès vasculaires, peuvent produire une micro-inflammation. L'inflammation est aussi responsable de la diminution de la synthèse hépatique de l'albumine. Les récentes découvertes suggèrent que les dysfonctions endothéliales et l'inflammation contribuent à la mortalité cardiovasculaire importante chez les patients atteints d'IRC (Stenvinkel, Heimbürger et al. 1999). De plus, l'inflammation joue un rôle clé dans le développement de l'artériosclérose.

En plus de l'atteinte endothéliale par l'inflammation, les risques cardiovasculaires sont aussi causés par une calcification vasculaire (Eddington, Sinha et al. 2009). Les traitements à base de calcium de l'HPTS, peuvent provoquer une sursaturation sérique et causer des dépôts de calcium et de phosphore, induisant ainsi une calcification vasculaire et un épaissement accrue de l'intima et de la média. Ces calcifications sont responsables des risques cardiovasculaires élevés chez les patients atteints d'IRC, puisqu'elles induisent une rigidité vasculaire, une hypertrophie ventriculaire gauche et ultimement, une insuffisance cardiaque (Eddington, Sinha et al. 2009).

En résumé, le développement des complications cardiovasculaires chez les patients atteints d'IRC implique de multiples facteurs de risques dont les effets sont additifs. Aux facteurs de risque classiques dans la population générale (sexe, âge, hypertension artérielle, diabète, hyperlipidémie, tabac et obésité) s'ajoutent les autres facteurs spécifiques à la population atteinte d'IRC tels que les problèmes électrolytiques (phosphocalcique), les dyslipidémies, l'état inflammatoire et le stress oxydatif.

La prévalence du diabète est très importante chez les patients atteints d'IRC puisque la néphropathie diabétique fait partie des facteurs de risque qui induisent l'apparition de l'IRC. Les études suggèrent que l'IRC cause aussi directement certains problèmes reliés à l'homéostasie du glucose et au métabolisme de l'insuline. En

effet, les patients souffrants d'IRC présentent une diminution de la néoglucogénèse rénale et une augmentation de la néoglucogénèse hépatique. De plus, on observe une augmentation des concentrations de l'insuline suite à une diminution de sa dégradation par les tissus périphériques et aussi une diminution de la clairance rénale de l'insuline. Par ailleurs, la résistance à l'insuline en présence d'IRC est très fréquente et secondaire à des phénomènes tels que les dysfonctions hormonales, l'inflammation, les dyslipidémies, l'anémie, l'accumulation de toxines urémiques, le stress oxydatif et l'acidose métabolique. Il est à noter que la résistance à l'insuline est aussi un facteur de risque pour la progression des maladies cardiaques, l'hypertension, les dyslipidémies et l'inflammation (Siew and Ikizler 2010, Pham, Utzschneider et al. 2011).

1.4 Traitements de remplacement de la fonction rénale

Lorsque les patients atteignent le stade 5 de l'IRC, seulement des traitements de dialyse ou une transplantation rénale permettent la survie. La dialyse se définit par une diffusion des molécules en solution à travers une membrane semi-perméable selon un gradient électrochimique (Himmelfarb and Ikizler 2010). Il existe deux formes de dialyse, la dialyse péritonéale et l'hémodialyse.

La dialyse péritonéale est une forme de dialyse qui peut être faite à la maison et permet une plus grande autonomie (voir [Figure 1](#)). Elle s'effectue au niveau du péritoine, qui sert de membrane d'échange semi-perméable. Il est

composé de deux feuillets, un feuillet pariétal et un feuillet viscéral, ce qui forme une cavité à l'intérieur de l'abdomen. La cavité péritonéale est alors remplie de dialysat. Les feuillets fortement vascularisés permettent un échange entre le sang et le dialysat. L'épuration des déchets métaboliques et des électrolytes s'effectue par une diffusion libre depuis le sang vers le dialysat à travers le péritoine. De plus, le dialysat contient aussi une grande concentration de glucose ce qui augmente son osmolarité causant ainsi un transfert de l'eau excédentaire vers le dialysat. Cette ultrafiltration permet de rétablir le volume plasmatique. Le dialysat est changé environ 4 fois par jour, via un cycle d'infusion/stase/drainage, selon la prescription recommandée. La dialyse péritonéale requiert un cathéter abdominal et peut aussi être effectuée la nuit. Une attention particulière doit être portée à l'hygiène pour éviter les infections (Abbasi, Chertow et al. 2010, Himmelfarb and Ikizler 2010, Clase 2011, McFarlane 2011).

Figure 1: Dialyse péritonéale

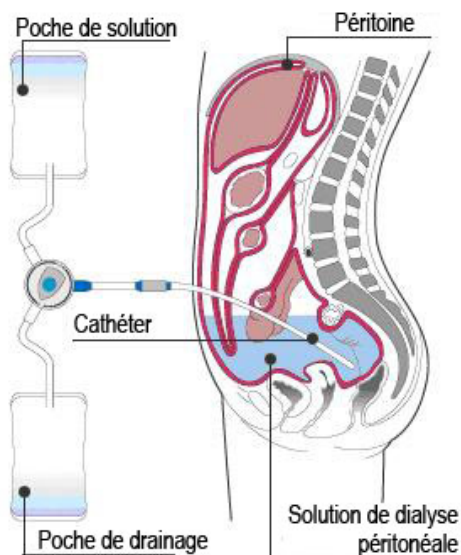


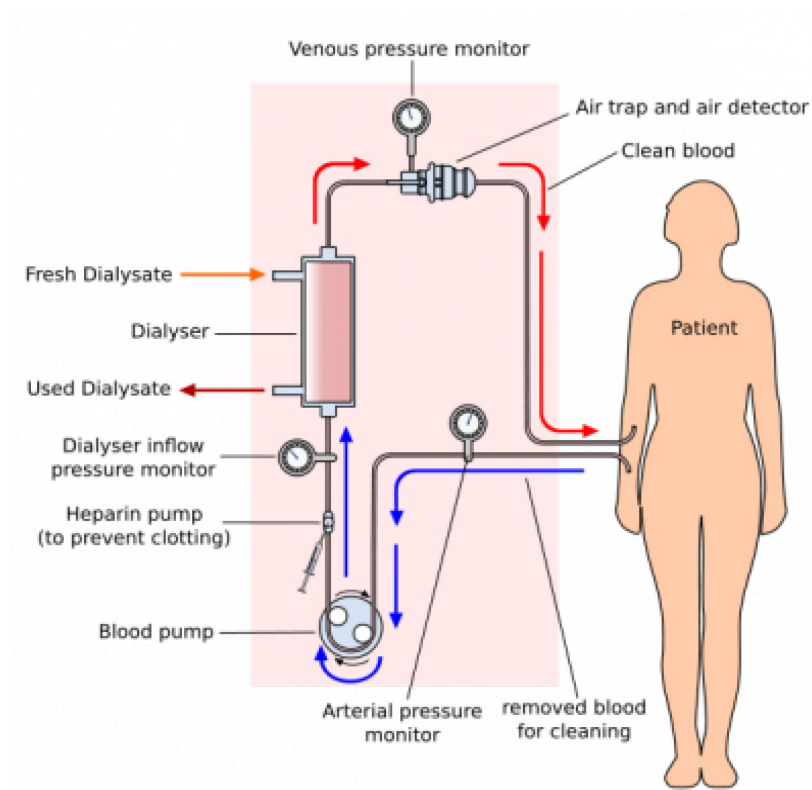
Schéma de la dialyse péritonéale où un cathéter implanté dans la cavité abdominale est relié à une solution de dialysat. La solution de dialysat entre en contact avec le péritoine qui sert alors de filtre. Les molécules suivent un gradient de concentration et traversent le péritoine. La solution de dialysat est purgée dans une poche de drainage et le cycle recommence.

(<http://www.nephrocarefrance.fr/3264.htm>)

L'hémodialyse est le traitement le plus utilisé dans les cas d'IRC terminale (voir Figure 2). Elle a pour but de restaurer l'environnement intra et extracellulaire. Elle consiste à épurer le sang à travers un filtre semi-perméable artificiel branché à une machine appelée hémodialyseur. Les séances sont habituellement d'une durée de quatre heures et doivent être effectuées au moins trois fois par semaine. Deux types d'accès vasculaires sont utilisés : un cathéter central ou une fistule

artério-veineuse (une connexion entre une veine et une artère du bras). Brièvement, le sang circule hors du patient pour entrer dans le filtre, où il est en contact avec une membrane semi-perméable. Le sang épuré est réinfusé au patient. Dans le filtre, le sang circule dans un compartiment et le dialysat dans un autre compartiment. Les deux compartiments sont séparés par la membrane. De plus, le sang circule à contre sens du dialysat pour augmenter les échanges (Abbasi, Chertow et al. 2010, Himmelfarb and Ikizler 2010, Clase 2011, McFarlane 2011).

Figure 2 : L'hémodialyse



Représentation graphique d'un traitement d'hémodialyse. Le sang du patient est pompé hors du corps par l'hémodialyseur. Ce sang passe dans un filtre où circule une solution de dialysat à contre-sens. C'est dans ce filtre que s'effectuent les échanges de molécules à excréter et les électrolytes du dialysat. Le sang épuré est alors retourné dans la circulation sanguine du patient.
(www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Hémofiltration)

Dans les deux formes de dialyse, le fonctionnement est le même. Le but est de rééquilibrer les électrolytes et de retirer du volume. Le statut physiologique du patient doit être analysé pour permettre d'établir la composition du dialysat. Pour chaque condition, la composition du dialysat est différente mais en général, le but est de causer une diminution de la concentration de l'urée, de la créatinine et du

potassium dans le plasma. Il y a aussi une diffusion depuis le dialysat vers le plasma du calcium et du bicarbonate, afin d'augmenter leur concentration plasmatique. Finalement, l'ultrafiltration permet de diminuer le volume plasmatique en retirant l'eau excédentaire (Abbasi, Chertow et al. 2010, Himmelfarb and Ikizler 2010, Clase 2011, McFarlane 2011).

Le dialysat a habituellement un pH acide (5,2 à 5,6) ou un pH neutre. Il est composé d'une solution tampon et d'électrolytes tels que du sodium (130-145 mmol/L), du potassium (2-3 mmol/L), du calcium (1,25-1,75 mmol/L), du magnésium (0,5 mmol/L), un tampon basique (bicarbonate 30-40 mmol/L) et du chlore (concentration variable). Le passage des électrolytes de part et d'autre de la membrane se fait selon un gradient de concentration par diffusion passive. Certains déchets vont être extraits du plasma vers le dialysat où la concentration est moindre, alors que certains électrolytes vont être ajoutés. Le phénomène de l'ultrafiltration est permis par la pression hydrostatique et provoque une diminution de la rétention d'eau chez les patients (Himmelfarb and Ikizler 2010).

La technologie d'aujourd'hui fait appel à des membranes beaucoup plus performantes, appelée membrane *high-flux* qui ont de plus larges pores, ce qui laisse passer de plus grosses molécules comme la β 2-microglobuline, les toxines urémiques et le sulfate de p-crésol. Une variété de matériaux synthétiques a aussi été développée au cours de la dernière décennie, améliorant ainsi l'efficacité de la

dialyse et la survie des patients (Ward 2011). La nanotechnologie est utilisée pour créer des pores de dimension uniforme, permettant ainsi la filtration de nombreuses molécules, mais ne laissant pas passer des molécules plus larges comme l'albumine (66 000 kDa). Les nouveaux matériaux à base de polymère sont moins bioactifs, donc ils activent moins le complément que les anciennes membranes à base de cellulose, ce qui diminue les réactions inflammatoires chez les patients.

La vitesse de l'ultrafiltration et les concentrations de dialysat doivent être bien définies puisqu'une trop grande vitesse d'extraction de certains électrolytes et de l'eau peut causer une hypotension ou un arrêt cardiaque. Le choix du filtre, de la composition du dialysat, de la fréquence, de la durée des séances, de la vitesse de filtration sont prescrits par le néphrologue pour chacun des patients, selon un modèle de cinétique de l'urée.

Finalement, des médicaments sont administrés aux patients lors de la dialyse. L'héparine est ajoutée pour ses effets anti-coagulants. De plus, de l'érythropoïétine, du fer, des analogues de la vitamine D et des antibiotiques peuvent être administrés au besoin lors des séances.

En plus de la dialyse, la transplantation rénale est une autre option offerte aux patients. C'est le traitement de choix. Par contre, tous les patients ne sont pas admissibles pour une telle intervention. L'état général du patient, son âge et les

antécédents médicaux sont des éléments à considérer pour orienter un candidat vers la greffe rénale ou non. De plus, la disponibilité des reins pour la greffe est un autre obstacle de taille qui guette les gens en attente d'une greffe. Les reins peuvent provenir d'un donneur vivant ou d'un donneur cadavérique. Dans les deux cas, le receveur et le rein transplanté doivent être compatibles tant au niveau du groupe sanguin que de certains antigènes tissulaires. Même en cas de compatibilité parfaite, le succès d'une greffe n'est pas garanti et, pour augmenter les chances de succès, le patient est soumis à un traitement antirejet qui consiste en l'administration de médicaments immunosuppresseurs. Comme il s'agit d'un traitement comportant plusieurs effets secondaires importants, le sujet doit donc être dans un état général permettant la transplantation (Clase 2011).

1.5 Problèmes de pharmacocinétique en présence d'IRC

Les patients atteints d'IRC présentent un nombre élevé de comorbidités (hypertension, diabète, dyslipidémie, anémie, problèmes cardiovasculaires) et doivent être soumis à plusieurs traitements. De plus, ils doivent être traités pour les complications dues à la diminution de leur fonction rénale. En moyenne onze médicaments différents et plus de 14 doses par jour sont administrés à ces patients (Kaplan, Mason et al. 1994, Grabe, Low et al. 1997).

L'un des principaux paramètres pharmacocinétique touché par l'IRC est la clairance rénale des médicaments, due à une diminution du DFG et de la sécrétion tubulaire. Les doses des médicaments sont ajustées selon le DFG mais, malgré cet

ajustement, un grand nombre de patients atteints d'IRC demeurent très à risque de réactions indésirables aux médicaments et de toxicité, causées par des doses supratherapeutiques pour leurs conditions (Cantu, Ellerbeck et al. 1992).

Plusieurs études ont démontré que d'autres modifications cinétiques peuvent survenir et que les changements pathophysiologiques secondaires à l'IRC entraînent donc des modifications du profil pharmacologique des médicaments (Nolin, Frye et al. 2003, Nolin 2008). En effet, plusieurs paramètres pharmacocinétiques tels que l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination sont modifiés en présence d'IRC.

1.5.1 Absorption

L'absorption des médicaments est une étape clé puisqu'elle agit directement sur la biodisponibilité c'est-à-dire, le pourcentage de la dose administrée qui atteint la circulation systémique. L'absorption dépend, entre autres, des propriétés physicochimiques du médicament, de la route d'administration, du patient, du type de membrane à traverser et du débit sanguin au site d'absorption. Elle dépend aussi de la surface et du temps de contact du médicament avec la zone d'absorption, ainsi que des phénomènes de dissolution, de diffusion, de premier passage et de transport des médicaments. De plus, la présence de nourriture peut être un facteur qui influence l'absorption d'un médicament.

L'absorption et la biodisponibilité des médicaments sont modifiées chez les patients souffrants d'IRC puisque certains facteurs sont altérés. La maladie affecte le tractus gastro-intestinal et aussi les phénomènes de premier passage et de transport des médicaments (Hassan, Al-Ramahi et al. 2009, Liles 2011).

Les patients atteints d'IRC souffrent de gastroparésie, ce qui provoque une augmentation du temps de la vidange gastrique, ce qui peut affecter le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximum et/ou augmenter la dégradation du médicament s'il est instable dans l'estomac (Lam, Banerji et al. 1997, Etemad 1998). L'augmentation du pH gastrique est une manifestation observée en IRC et elle est expliquée par l'hypersécrétion d'urée dans la salive qui provoque la formation accrue d'ammoniaque dans le tractus par l'uréase gastrique (St Peter, Redic-Kill et al. 1992). L'ionisation et la dissolution, de certains médicaments qui sont habituellement mieux absorbés dans un environnement acide, peuvent alors être altérées en présence d'un pH plus élevé, diminuant la biodisponibilité. Finalement, les nausées, les vomissements, la diarrhée et l'œdème des parois intestinales observées chez certains patients atteints d'IRC peuvent diminuer l'absorption orale des médicaments (Swan and Bennett 1992).

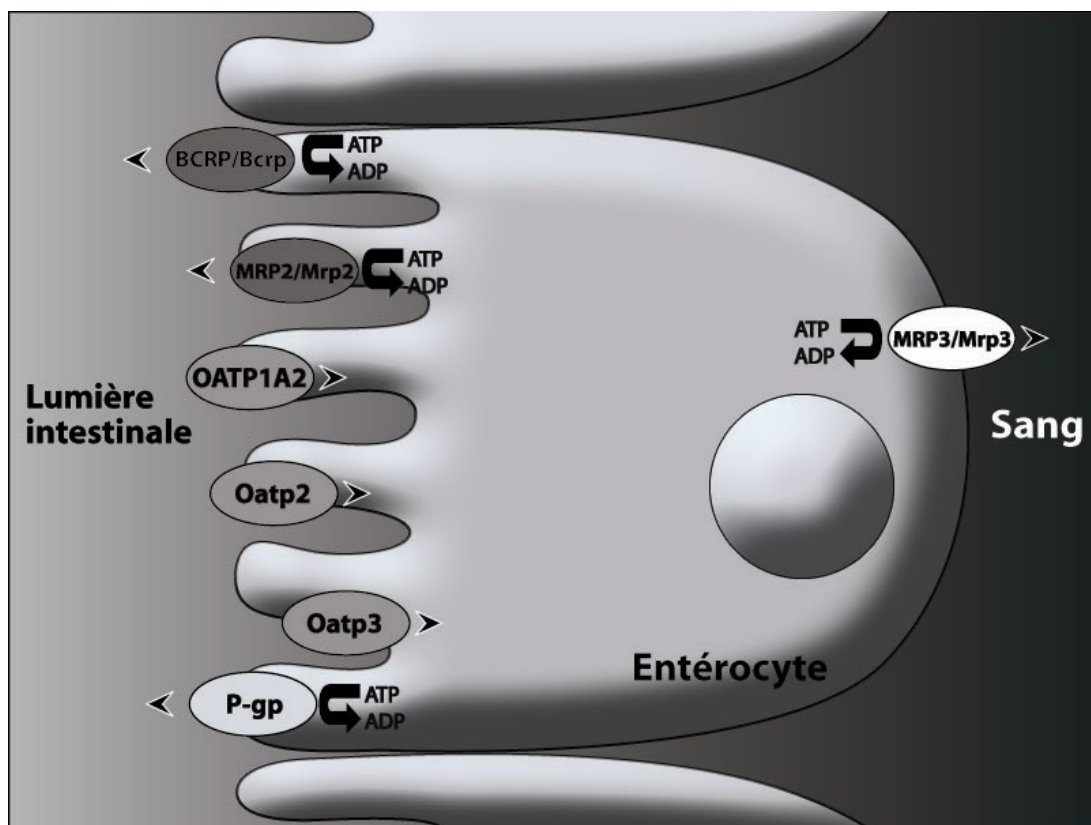
Les modifications du métabolisme de premier passage, l'extrusion des médicaments et la présence de nourriture sont parmi les déterminants les plus importants de la biodisponibilité. Brièvement, un médicament pris oralement doit

entrer dans l'entérocyte soit par diffusion passive ou soit par transport via un transporteur d'influx intestinal [*organic anion transporting polypeptides* (OATP)] (voir Figure 3). À l'intérieur de la cellule, le médicament peut être métabolisé par les enzymes du cytochrome P450 (CYP450) de l'intestin (CYP3A). La molécule mère ou les métabolites peuvent alors être excrétés dans la lumière intestinale par des transporteurs d'efflux apicaux [P-glycoprotéine (P-gp), *multi-drug resistance related protein* de type 2 (MRP2)] ou alors être excrétés par des transporteurs d'efflux basaux dans la circulation portale (MRP1, MRP3). La circulation via la veine porte amène alors le médicament ou ses métabolites vers le foie, où ils diffusent de façon passive ou sont transportés par les transporteurs hépatiques d'influx apicaux (OATP) (voir Figure 4). À l'intérieur de l'hépatocyte, la molécule mère ou ses métabolites sont métabolisés par les enzymes du CYP450 hépatique ou les enzymes de phase II. Ils sont alors sécrétés par des transporteurs d'efflux vers la bile (P-gp, MRPs) ou retournés dans la circulation systémique par diffusion passive ou à l'aide de transporteurs (MRPs). Ces processus de premier passage et de recyclage entéro-hépatique sont affectés à plusieurs niveaux par l'IRC (Naud, Michaud et al. 2007, Naud, Michaud et al. 2008).

Les études animales ont montré une diminution du métabolisme intestinal chez les rats néphrectomisés. L'étude de Leblond *et al* a démontré que l'IRC est associée à une réduction de 30% de l'activité du CYP450 intestinal dans un modèle de rats ayant subi une néphrectomie 5/6^e (Leblond, Petrucci et al. 2002). De plus, il a

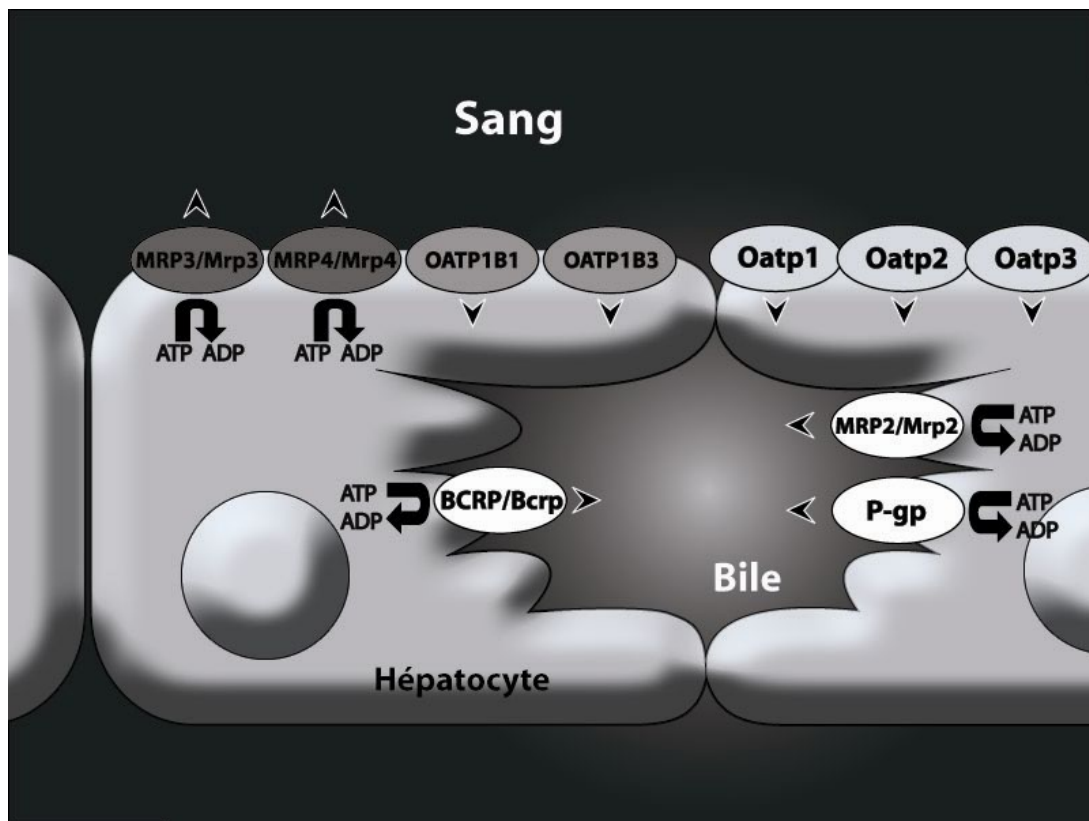
été suggéré que cette diminution était secondaire à une réduction de près de 40% de l'expression génique du CYP450 3A intestinal. Le CYP3A compte pour le trois quart des isoformes du CYP450 contenus dans l'intestin (Watkins, Wrighton et al. 1987). Ainsi, un changement dans son expression et son activité pourrait expliquer l'augmentation de la biodisponibilité de plusieurs médicaments en présence d'IRC.

Figure 3 : Les transporteurs intestinaux



Représentation graphique d'une cellule intestinale et de ses transporteurs membranaires. La direction des flèches représente la direction du transport de chacun des transporteurs d'influx ou d'efflux. Bcrp: *breast cancer resistance protein*, Mrp: *multidrug resistance related protein*, Oatp: *organic anion transporting polypeptide*, P-gp: *p-glycoprotein*. Les symboles en majuscules représentent les transporteurs retrouvés chez l'humain et ceux en minuscules, ceux retrouvés chez les rongeurs. Source : Laboratoire Dr Pichette

Figure 4 : Les transporteurs hépatiques



Représentation graphique d'une cellule hépatique et ses transporteurs membranaires. La direction des flèches représente la direction du transport de chacun des transporteurs d'influx ou d'efflux. Bcrp: *Breast cancer resistance protein*, Mrp: *multidrug resistance related protein*, Oatp: *organic anion transporting polypeptide*, P-gp: *p-glycoprotein*. Les symboles en majuscules représentent les transporteurs retrouvés chez l'humain et ceux en minuscules, ceux retrouvés chez les rongeurs. Source : Laboratoire Dr Pichette

Le transport intestinal joue aussi un rôle essentiel dans la biodisponibilité des médicaments. L'étude de Naud *et al* a permis de montrer une réduction de l'expression protéique de la P-gp, du MRP2 et du MRP3, sans changement dans l'expression de l'ARNm, dans un modèle d'IRC induite par néphrectomie chez le rat

(Naud, Michaud et al. 2007). De plus, cette étude a démontré que les transporteurs d'influx tels que les OATP2 et OATP3 ne sont pas altérés par l'IRC. L'inhibition des transporteurs d'efflux apicaux comme la P-gp et le MRP2, qui favorisent la sécrétion des médicaments vers la lumière intestinale, peut alors contribuer à une augmentation de la biodisponibilité de certains médicaments puisqu'une plus grande quantité de ceux-ci pourrait atteindre la circulation systémique (Chan, Lowes et al. 2004).

En résumé, en plus des modifications des caractéristiques physiologiques du tractus intestinal, la diminution de l'expression des CYP450s et des transporteurs d'efflux intestinaux pourrait expliquer une augmentation de la biodisponibilité des médicaments administrés oralement.

1.5.2 Distribution

Suite à l'absorption d'un médicament, celui-ci se retrouve dans le sang et il est par la suite distribué dans l'organisme. La distribution d'un médicament dans l'organisme fait appel au concept du volume de distribution. Le volume apparent de distribution réfère à la capacité d'un médicament à pénétrer dans les compartiments, selon ses caractéristiques physicochimiques et la présence de transporteurs membranaires. Chez les patients atteints d'IRC, le volume de distribution de nombreux médicaments peut être significativement changé suite à des altérations de la composition corporelle en eau et des changements dans la

liaison aux tissus et aux protéines plasmatiques (Nolin, Frye et al. 2003, Hassan, Al-Ramahi et al. 2009, Liles 2011).

L'IRC induit des changements dans la composition corporelle des patients. Premièrement, la rétention hydrosodée caractérisée par des œdèmes et de l'ascite augmente le volume de distribution pour la diffusion des médicaments hydrophiles. Par contre, l'atrophie musculaire et l'augmentation des tissus adipeux chez les patients souffrants d'IRC peuvent réduire le volume de distribution et augmenter les concentrations sériques des médicaments hydrophiles (Launay-Vacher, Storme et al. 2001, Nolin, Frye et al. 2003, Gabardi and Abramson 2005).

L'IRC induit aussi plusieurs changements dans la liaison aux protéines plasmatiques principalement au niveau de l'albumine. Premièrement, chez les patients atteints d'IRC, l'albumine est carbamylée entraînant un changement de la conformation de l'albumine (Erill, Calvo et al. 1980, Vanholder, De Smet et al. 1993, Lam, Banerji et al. 1997, Matzke and Frye 1997, Galli 2007). L'accès aux sites de liaison est ainsi réduit et cause une diminution de la liaison des médicaments acides à l'albumine. Deuxièmement, il existe une compétition aux niveaux des sites de fixation aux protéines entre les acides organiques qui s'accumulent chez les patients atteints d'IRC et les médicaments acides (Vanholder, De Smet et al. 1993, Lam, Banerji et al. 1997, Matzke and Frye 1997). L'acide hippurique (Vanholder, De Smet et al. 1993), l'indoxyl sulfate (Bowmer and Lindup 1982) et l'acide 3-carboxy-

4-méthyl-5-propyl-2-furanyl propanoïque (Henderson and Lindup 1990) inhibent la liaison des médicaments à l'albumine. Troisièmement, l'hypoalbuminémie observée en présence d'IRC induit aussi une diminution de la liaison à l'albumine des médicaments acides.

La diminution de la liaison des médicaments acides à l'albumine peut entraîner une augmentation de la fraction libre des médicaments et mener à de la toxicité, particulièrement pour les médicaments acides fortement liés aux protéines plasmatiques et à index thérapeutique faible tels que la phénytoïne, la warfarine, l'acide valproïque et certains hypoglycémifiants oraux.

À l'opposé, les médicaments basiques se lient à la glycoprotéine acide α_1 . Chez les patients atteints d'IRC, la concentration sérique de cette protéine est souvent élevée, mais la liaison des médicaments basiques ne semble pas affectée (Elston, Bayliss et al. 1993).

1.5.3 Métabolisme

Le métabolisme hépatique et intestinal est affecté chez les sujets atteints d'IRC. Plusieurs études animales ont montré une diminution de certains isoformes du CYP450 dans un modèle de rats néphrectomisés (Leblond, Giroux et al. 2000, Leblond, Guevin et al. 2001, Leblond, Petrucci et al. 2002). L'expression protéique, l'expression génique ainsi que l'activité enzymatique sont affectées (plus de détails

sont donnés dans la section 2.3.1). Parallèlement, des études chez des sujets humains ont démontré une diminution du métabolisme de l'érythromycine marquée au ^{14}C (30%), lors de test d'exhalation (Dowling, Briglia et al. 2003). De plus, de nombreuses études ont démontré une diminution de la clairance non-rénale des médicaments tels que la cibenzoline, la cyclophosphamide, la reboxetine, le felbamate et la roxithromycin, suggérant ainsi une diminution de l'activité des CYP450s hépatiques (Gabardi and Abramson 2005).

L'IRC affecte aussi l'expression des enzymes de phase II. Des études animales ont démontré une diminution d'au moins 30% de l'expression protéique et génique de la N-acétyltransférases 1 et 2 (NAT1 et NAT2), alors que l'activité de la NAT2 a été réduite de 50% (Simard, Naud et al. 2008). Par contre, l'étude de Patterson a mis en évidence que l'IRC ne provoque aucun changement dans la glucuronidation (Patterson and Cohn 1984). De nombreuses études chez l'humain suggèrent une diminution de l'acétylation (isoniazide), de la glucuronidation (morphine, zidovudine), de la sulfonation (acétaminophène) et de la méthylation (dobutamine) chez les patients atteints d'IRC (Nolin, Frye et al. 2003, Gabardi and Abramson 2005).

1.5.4 Élimination

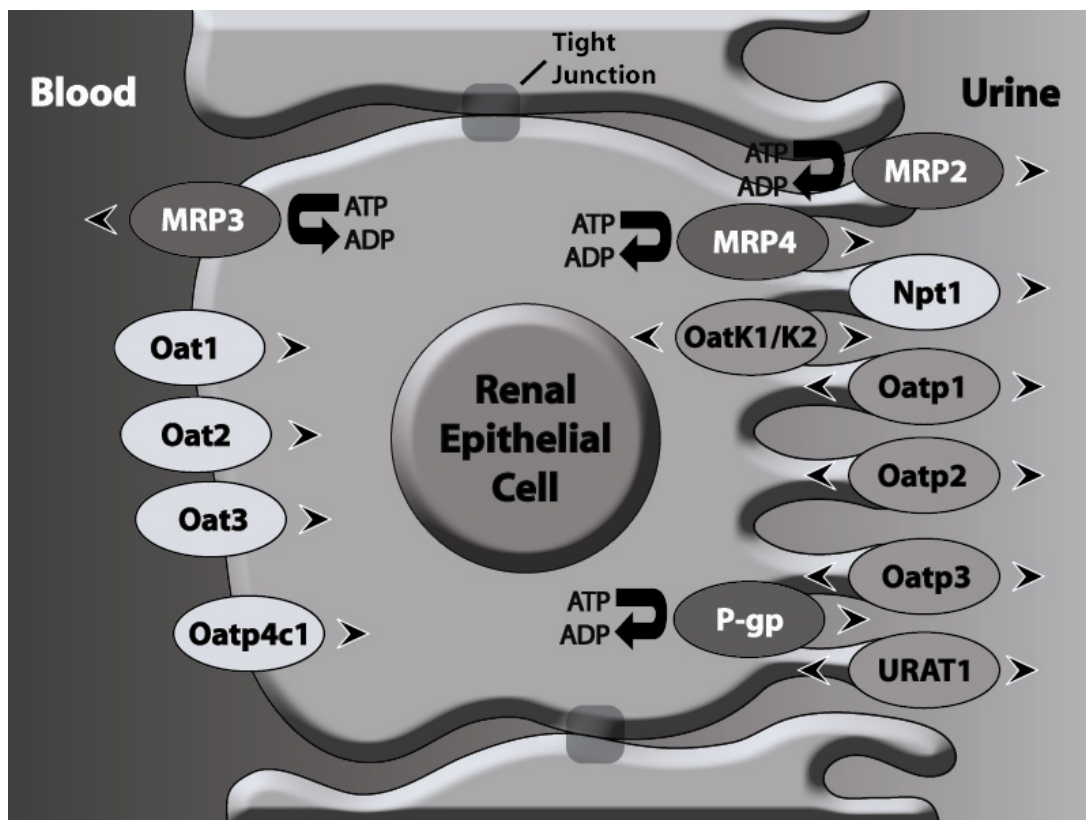
Les médicaments et leurs métabolites sont éliminés principalement par l'urine et la bile. La clairance rénale des médicaments et de leurs métabolites

comporte trois phénomènes soient la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption. Dans un premier temps, un médicament est filtré par le glomérule selon son poids moléculaire et sa liaison aux protéines plasmatiques. Ensuite, un médicament peut être éliminé via la sécrétion tubulaire, qui nécessite l'action du transport actif. Finalement, le médicament peut être réabsorbé du tubule vers le sang par du transport actif ou passif.

L'IRC est une pathologie qui affecte la fonction rénale et conséquemment toutes les étapes de l'élimination rénale. Le débit de filtration glomérulaire diminue progressivement entraînant des diminutions de la clairance rénale des médicaments. Les doses des médicaments éliminés par clairance rénale sont ajustées selon le DFG. Peu d'études ont mis en évidence la diminution de la sécrétion tubulaire via des transporteurs rénaux chez les patients atteints d'IRC, mais de nombreux médicaments éliminés dans l'urine via la sécrétion tubulaire possèdent une pharmacocinétique modifiée en IRC. En effet, une augmentation des concentrations sériques de la sitagliptine (OAT3, P-gp), de l'entecavir, de la varenicline (OCT2) a été observée chez les patients souffrants d'IRC, suggérant une modification de l'expression des transporteurs rénaux (Nolin, Frye et al. 2003, Campoy and Elwell 2005, Gabardi and Abramson 2005, Nolin 2008). Plus récemment, notre laboratoire a mis en évidence une diminution de l'expression des transporteurs d'influx (OAT1, OAT2 et OAT3) ainsi que les transporteurs bidirectionnels (OATK1/K2, OATP1, OATP4C1 et URAT1), combinée à une

augmentation de l'expression des transporteurs d'efflux (MRP2, MRP3 et MRP4) ainsi que les transporteurs bidirectionnels (OATP2 et OATP3) dans un modèle expérimental de rats néphrectomisés (voir Figure 5). Ces changements dans l'expression des transporteurs pourraient être une réponse adaptative et protectrice contre l'accumulation des toxines urémiques et la toxicité rénale (Naud, Michaud et al. 2011).

Figure 5 : Les transporteurs rénaux



Représentation graphique d'une cellule rénale et ses transporteurs membranaires. La direction des flèches représente la direction du transport de chacun des transporteurs d'influx ou d'efflux. MRP: *multidrug resistance related protein*, Npt1: *Sodium-dependent phosphate transport protein 1*, Oat: *organic anion transporter*, Oatp: *organic anion transporting polypeptide*, P-gp: *p-glycoprotein*, URAT1: *urate transporter* (Naud, Michaud et al. 2011).

2. Cytochrome P450

Les cytochromes P450 (CYP450) constituent une superfamille d'hémoprotéine de 57 gènes encodant pour des enzymes qui métabolisent les xénobiotiques et les substances endogènes. Les CYP450 font partie de la famille des enzymes de phase I du métabolisme des médicaments. Ces enzymes ont été nommées ainsi puisqu'elles possèdent un pic d'absorption spectrophotométrique à 450 nm lorsqu'elles sont réduites et liées au monoxyde de carbone (Lewis 2001).

Les études suggèrent que les cytochromes P450 sont apparus, il y a 3,5 millions d'année et ils sont présents chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Avec le temps, les organismes ont développé des systèmes limitant l'accumulation de composés toxiques. Comme les molécules hydrophobes ont la capacité de franchir les membranes, elles peuvent s'accumuler et devenir un élément toxique pour une cellule. Les CYP450 jouent donc un rôle important dans les phénomènes de détoxification, de métabolisme et de biotransformation (Chang and Kam 1999).

Les implications physiologiques et physiopathologiques des CYP450 sont nombreuses et se retrouvent dans beaucoup de domaines tels que la microbiologie, la toxicologie, la physiologie, les sciences environnementales, la biologie végétale, l'endocrinologie, le métabolisme, la carcinogenèse et sans oublier, la pharmacologie (Bernhardt 1995).

Plus de 7700 gènes ont été séquencés en incluant toutes les espèces. Chez l'homme c'est donc plus de 57 gènes et 47 pseudogènes qui ont été séquencés. Ils sont classés en familles et en sous-familles selon le degré d'homologie de leur séquence protéique. La nomenclature internationale désigne un gène en le nommant par CYP, suivi d'un chiffre qui définit la famille, d'une lettre majuscule pour la sous-famille et d'un chiffre pour chaque gène. Suivant ce système, les membres d'une même famille possèdent au moins 40% de similarité dans leur séquence protéique, alors que 55% d'homologie et plus doit être observée à l'intérieur d'une même sous-famille. À ce jour, au total plus de 780 familles ont été trouvées, mais seulement 18 familles ont été identifiées chez l'humain (Chang and Kam 1999, Lewis 2001, Nebert and Russell 2002, Gueguen, Mouzat et al. 2006).

Chez l'humain, les CYPs sont principalement situés dans le foie, mais ils sont aussi localisés dans plusieurs organes tels que l'intestin, le cerveau, les reins, le cœur, les poumons, les testicules, le placenta, les seins, la peau, l'épithélium nasal, le pancréas et la rate. Par contre, le foie demeure le site principal du métabolisme des médicaments où la quantité des CYPs y est très abondante. Les CYPs sont ancrés à la membrane du réticulum endoplasmique. L'expression des CYPs est principalement ubiquitaire, mais certains isoformes ne sont exprimés que de manière constitutive dans certains tissus. Même si le site majeur de la biotransformation est le foie, le métabolisme extra-hépatique contribue à

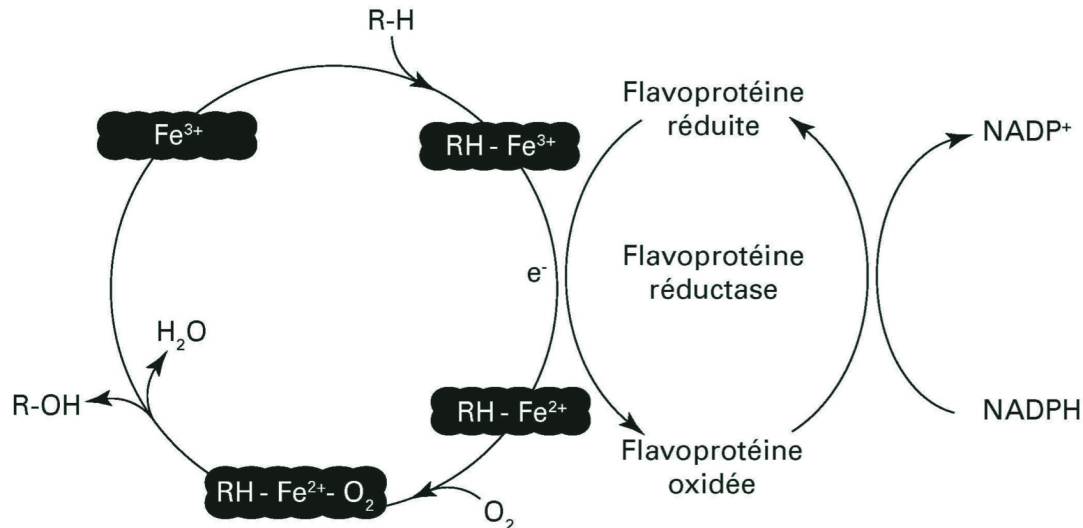
l'élimination des médicaments. La biotransformation effectuée par l'intestin est très importante car elle peut être responsable d'une diminution de la biodisponibilité (Lewis 2001) (voir section 1.5.1 Absorption).

Des changements dans l'activité des CYP450s peuvent être causés par des polymorphismes génétiques, l'inhibition des enzymes, l'induction des enzymes, des pathologies et des facteurs physiologiques ou environnementaux. Ces changements peuvent avoir des conséquences cliniques très importantes, telles qu'une diminution de l'efficacité, une augmentation de la toxicité, une augmentation de la production de métabolites toxiques et des interactions entre les médicaments. Par exemple, une diminution de la clairance de certains médicaments peut engendrer des conséquences cliniques majeures telles que les torsades de pointes, des effets sédatifs trop importants, des rhabdomyolyses, des hypotensions et des effets anticoagulants trop importants (Coleman 2010) pour ne nommer que celles-là.

Les CYP450s font partie d'un système d'enzymes : les mono-oxygénases et présentent en leurs centres un groupement hème. Elles possèdent des propriétés catalytiques d'oxydation et de réduction, ce qui permet une grande variété de réaction dont la plus importante réalisée par les CYPs : l'hydroxylation. La boucle d'oxydoréduction, appelée cycle catalytique, implique la participation d'une source d'électrons (la NADP CYP450 réductase ou la ferrédoxine), de la NADPH et de l'oxygène (voir [Figure 6](#)). Premièrement, il y a liaison de la molécule à transformer

avec le site actif de l'enzyme où se trouve le fer. Le fer, habituellement sous forme oxydée (Fe^{3+}) forme un complexe avec le substrat. Un électron est alors transféré à partir de la réductase afin de réduire le fer (Fe^{2+}). Ensuite, il y a liaison de l'oxygène au complexe Fe^{2+} -substrat et un réarrangement se forme avec l'arrivée d'un proton et d'un deuxième électron par le NADPH en Fe^{2+}OOH . Ensuite, il y a bris du complexe et relâche d'une molécule d'eau et du $(\text{FeO})^{3+}$. Finalement, ce complexe transfère sa molécule d'oxygène au substrat pour la formation d'un métabolite oxydé. L'ajout d'un proton à ce métabolite donnera sa forme hydroxylée finale (Lewis 2001, Katzung 2004).

Figure 6 : Cycle catalytique du CYP450



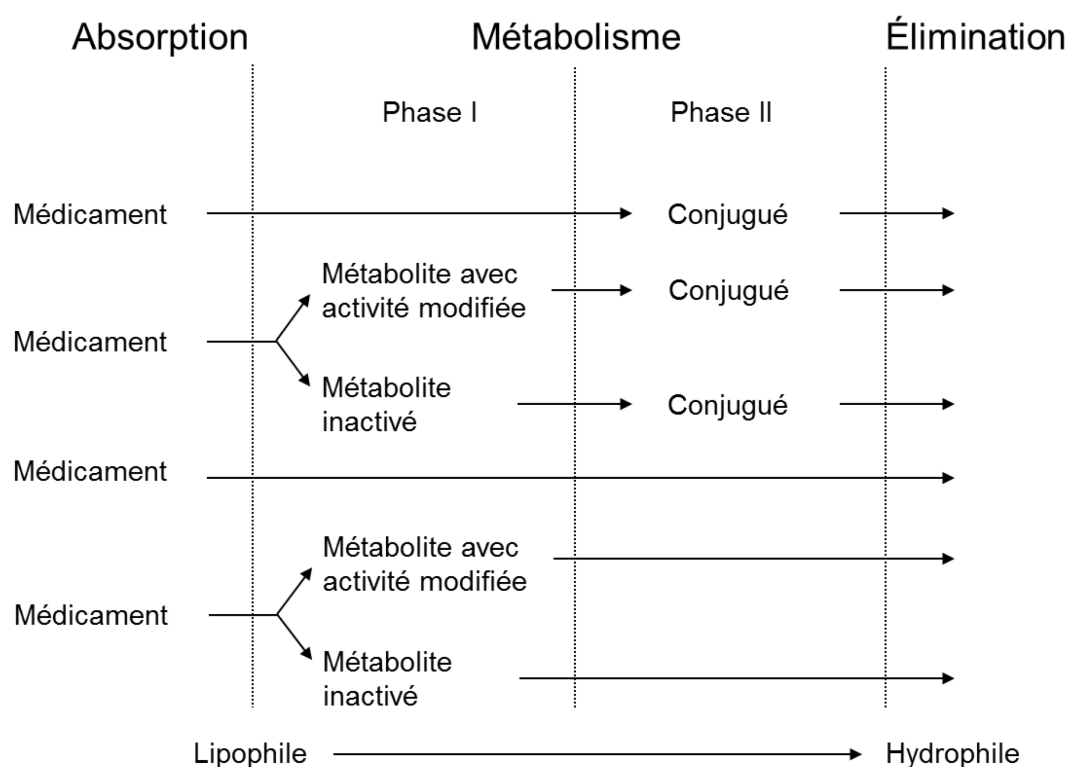
1- Liaison du substrat sur le site catalytique du CYP450, 2- La flavoprotéine réductase participe à la réduction du fer en Fe^{2+} , 3- Formation du complexe $\text{RH-Fe}^{3+}\text{-O}_2$ par la liaison de l'oxygène, 4- Libération du substrat oxydé et d'une molécule d'eau (Beaulieu P and C. 2010).

Le CYP450 peut catalyser une variété de réactions incluant l'époxidation, la N-déalkylation, la O-déalkylation, la S-oxydation et l'hydroxylation des résidus aromatiques. Ces réactions peuvent aussi avoir comme résultat d'activer ou d'inactiver un composé. Le but de l'hydroxylation des médicaments par le CYP450 est d'augmenter leur hydrophilicité afin de favoriser l'élimination dans l'urine, la bile et les fèces (Lewis 2001, Katzung 2004). La majorité des médicaments possède une formulation légèrement lipophile, afin de permettre aux composés de traverser les membranes cellulaires tout en leur assurant une certaine solubilité dans les fluides corporels. Comme les médicaments sont lipophiles, cela limite leur élimination rénale. Par ailleurs, certains métabolites carcinogènes, mutagènes, tératogènes ou cytotoxiques peuvent être bioactivés par les CYP450s.

Les enzymes de phase II peuvent aussi participer à rendre les médicaments plus polaires. Ces réactions de phase II sont des réactions de conjugaison telles que la glucuronidation, l'acétylation, la sulfonation, la méthylation et l'ajout de glutathion. La biotransformation par conjugaison entraîne la formation de complexes solubles, ce qui augmente leur élimination. Par contre, la méthylation et l'acétylation n'augmentent pas l'hydrosolubilité des médicaments. La conjugaison d'un groupement polaire nécessite des enzymes de transfert de haute énergie de type transférases, uniques à chaque type de conjugaison. Comme pour les CYP450s, les enzymes de phase II sont localisées principalement dans le foie, mais on en retrouve aussi dans l'intestin, les reins, les poumons, la prostate, la peau, le cerveau

et la rate. C'est la réaction de glucuronidation qui est la réaction de conjugaison la plus importante chez l'humain. De plus, les enzymes de phase II peuvent conjuguer un composé qui a préalablement été métabolisé par le CYP450 (Coleman 2010) (voir Figure 7).

Figure 7 : Implication des enzymes de phase I et II dans le métabolisme des médicaments



Différentes voies que peut prendre un médicament lors de son métabolisme par les enzymes de phase I et II. Le but est d'en augmenter l'hydrophilicité.

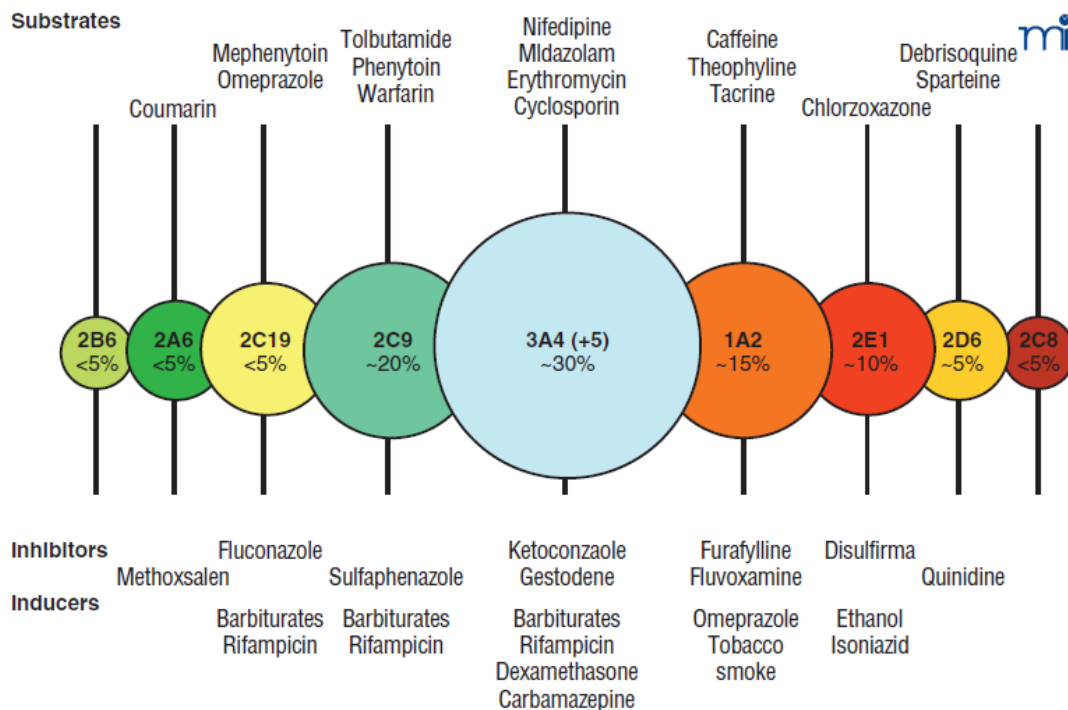
2.1 Rôles des CYP450s dans la biotransformation des xénobiotiques

Les CYPs jouent un rôle primordial dans la détoxification des xénobiotiques.

Les xénobiotiques comprennent les médicaments, les composés chimiques, les

produits de santé naturels, les polluants environnementaux et les pesticides provenant de l'alimentation, de l'environnement ou des produits cosmétiques. Chez l'humain, trois familles (CYP 1, 2 et 3) participent au métabolisme des médicaments ; elles représentent plus de 90% des enzymes impliquées et plus de 2000 substrats ont été identifiés (Nebert and Russell 2002) (voir Figure 8 et Figure 9).

Figure 8 : Principaux isoformes hépatiques responsables du métabolisme des médicaments chez l'humain (Guengerich 2003).



Représentation visuelle de l'abondance relative de chacune des isoformes hépatiques du CYP450 ainsi que des exemples de substrats, d'inhibiteurs et d'inducteurs.

2.1.1 Isoformes impliqués dans le métabolisme des médicaments

2.1.1.1 Famille CYP1A

La famille CYP1A est caractérisée par deux gènes et est principalement impliquée dans le métabolisme des composés de types hydrocarbures aromatiques polycycliques (fumée de cigarette, produits d'incinération de composés industriels, aliments grillés au barbecue) et les arylamines. Le CYP1A1 (aryl hydrocarbure hydroxylase) est situé principalement dans les poumons et peut être induit par les hydrocarbures aromatiques polycycliques. De plus, il est sensible aux effets inducteurs de l'oxyde nitrique. Le CYP1A2 (oxydation arylamine) est localisé dans le foie (13% des CYPs hépatiques) et il est important dans la déméthylation de la caféine et la théophylline (voir [Tableau 2](#)). Le CYP1A2 peut être aussi induit par la fumée de cigarette, la viande cuite au barbecue et l'oméprazole (Nebert and Russell 2002, Ma and Lu 2007).

Tableau 2 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs du CYP1A1/2

	Substrats	Inhibiteurs	Inducteurs
CYP1A1/2	acétaminophène, aminopyrine, caféine, clomipramine, éthoxyrésorufine, tamoxifène, théophylline, warfarine	ciprofloxacine, contraceptifs oraux, enoxacin, methoxsalen, mexiletine, phenylpropanolamine, flurafylline, fluvoxamine thiabendazole, zileuton α -naphthoflavone	3-méthylcholanthrène, benzopyrine, dioxine, tabac, hydrocarbures aromatiques polycycliques, oméprazole, lansoprazole, moricizine, phénobarbital, montelukast, phénytoïne

Selon les lignes directrices de la FDA : Drug Development and Drug Interactions : Tables of substrates, inhibitors and inducers.

2.1.1.2 Famille CYP2

C'est la plus large famille du CYP450 et elle inclue les sous-familles 2A, 2B, 2C, 2D et 2E et ce sont les sous-familles 2C et 2D qui sont les plus importantes dans le métabolisme des médicaments. Chez l'humain, la famille 2C (2C8, 2C9, 2C18, et 2C19) métabolise près de 50% des médicaments les plus fréquemment prescrits (voir [Tableau 3](#)). Le CYP2C9 est responsable de la biotransformation des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des anticoagulants (warfarine) et de certains hypoglycémifiants oraux. Le CYP2C19 est impliqué dans le métabolisme de l'hexobarbitone, du diazépam, de l'oméprazole, du phénobarbital et de la S-méphénytoïne. Chez l'humain, le CYP2D6 participe à la transformation de plus 20% des médicaments prescrits. Il est impliqué dans le métabolisme d'une grande variété de médicaments, tels que les inhibiteurs de la recapture de sérotonine, les analgésiques (codéine), les anti-arythmiques et les β -bloqueurs (métoprolol). Finalement, le CYP2E1 est une enzyme impliquée dans le métabolisme des agents anesthésiques volatils (isoflurane, trichloroéthylène et chloroforme), l'éthanol et les composés aromatiques. Certains membres de cette famille (2C9, 2C19, 2D6) sont polymorphiques. Ces polymorphismes créent des métaboliseurs rapides, intermédiaires ou lents, ce qui peut avoir un impact négatif sur l'effet thérapeutique d'un médicament (Chang and Kam 1999, Nebert and Russell 2002, Gueguen, Mouzat et al. 2006).

Figure 9 : Représentation de l'expression relative des différents CYP450s hépatiques chez l'humain

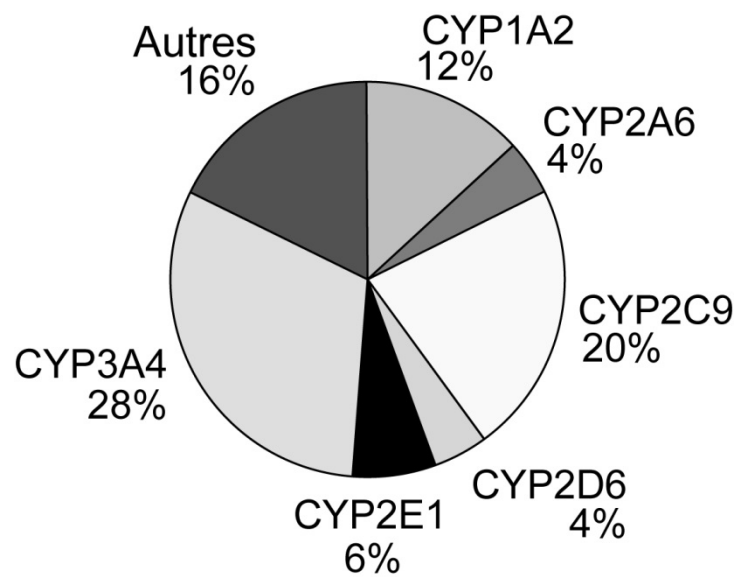


Tableau 3 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs de la famille CYP2

	Substrats	Inhibiteurs	Inducteurs
CYP2C9	célécoxib, diclofénac, ibuprofène, phénobarbital, phénytoïne, tolbutamide, torasémide, sulfaphénazole, S-warfarine	amiodarone fluconazole, fluvoxamine, fluoxetine, sulfaphénazole miconazole, oxandrolone, capecitabine, cotrimoxazole, etravirine, fluvastatin, metronidazole, tigecycline, voriconazole, zafirlukast	barbituriques, rifampicine, aprepitant, bosentan, phenobarbital, millepertuis, carbamazépine,
CYP2C19	citalopram, diazépam, imipramide, S-méphénytoïne, naproxène, oméprazole, phénobarbital, propranolol, esoméprazole, lansoprazole, pantoprazole,	fluconazole, ticlopidine, nootkatone, oméprazole, fluvoxamine, moclobemide esoméprazole, fluoxetine, armodafinil, carbamazépine, cimetidine, etravirine, felbamate, ketoconazole, voriconazole	barbituriques, rifampicine, artemisinin
CYP2D6	antidépresseurs tricycliques, chlopromazine, codéine, dextrométhorphane, imipramine, métoprolol, perphénazine, propranolol, tamoxifène desipramine, atomoxetine	paroxetine, quinidine, fluoxetine, bupropion, cinacalcet, duloxetine, terbinafine, amiodarone, celecoxib, cimetidine, desvenlafaxine, diltiazem, diphenhydramine, escitalopram, febuxostat, gefitinib, hydralazine, hydroxychloroquine, imatinib, methadone, propafenone, ranitidine, ritonavir, sertraline, telithromycin, verapamil	Aucun connu
CYP2E1	acétaminophène, alcool, benzène,	clométhiazole, disulfiram,	éthanol, cétones, isoniazide

Selon les lignes directrices de la FDA : Drug Development and Drug Interactions : Tables of substrates, inhibitors and inducers.

2.1.1.3 Famille CYP3A

Cette sous-famille est très abondante, elle compte pour 30% du contenu hépatique et 70% du contenu en CYP450 intestinal. Cette sous-famille est contrôlée par quatre gènes soient le CYP3A4, 3A5, 3A7 et 3A43. Le CYP3A4 est la forme la plus commune et la plus abondante de cette sous-famille dans le foie et l'intestin alors que le CYP3A5 est surtout retrouvé dans le foie. Chez le rat, ce sont les CYP3A1/2 qui correspondent au CYP3A4 de l'humain. La rifampicine, le phénobarbital et la phénytoïne sont des inducteurs connus du CYP3A. L'enzyme est inhibée par le kétoconazole, l'érythromycine et les bioflavones contenues, entre autres, dans le jus de pamplemousse. Le CYP3A participe à la biotransformation d'une très grande variété de médicaments (près de 50% de tous les médicaments prescrits – antibiotiques, anesthésiques, antihistaminiques, corticostéroïdes, statines, inhibiteurs de la protéase du VIH, benzodiazépines et immunosuppresseurs) (voir [Tableau 4](#)). Puisque le CYP3A4 a de nombreux inhibiteurs, inducteurs et substrats, il est impliqué dans multiple interactions médicamenteuses et l'efficacité clinique du médicament peut parfois en être affectée. Finalement, le CYP3A7 est retrouvé dans les foies fœtaux et dans l'endothélium utérin (Chang and Kam 1999, Nebert and Russell 2002, Gueguen, Mouzat et al. 2006).

Tableau 4 : Substrats, inhibiteurs et inducteurs du CYP3A4

	Substrats	Inhibiteurs	Inducteurs
CYP3A4	acétaminophène, aminopyrine, amiodarone, amprénavir, cocaïne, cyclophosphamide, cyclosporine, diltiazem, érythromycine, indinavir, lidocaïne, losartan, midazolam, oméprazole, paclitaxel, quinidine, tacrolimus, terfénadine, vérapamil, warfarine buspirone, felodipine, lovastatin, eletriptan, sildenafil, simvastatin, triazolam	clarithromycin, conivaptan, mibefradil, darunavir/ritonavir, diltiazem, fluconazole, fosamprenavir, imatinib, verapamil kétoconazole, gestodène, itraconazole, azamulin, troleandomycin, vérapamil, atazanavir, clarithromycin, indinavir, nefazodone, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, telithromycin, boceprevir, nefazodone, posaconazole, telaprevir, voriconazole, amprenavir, aprepitant, atazanavir, ciprofloxacine	barbituriques, rifampicine, pregnenolone-16- α - carbonitrile, dexaméthasone, carbamazépine, avasimibe, phénytoin, millepertuis, bosentan, efavirenz, etravirine, modafinil, nafcillin, amprenavir, aprepitant, armodafinil, echinacea, pioglitazone, prednisone, rufinamide

Selon les lignes directrices de la FDA : Drug Development and Drug Interactions : Tables of substrates, inhibitors and inducers.

2.2 Rôles des CYP450s dans la biotransformation des endobiotiques

En plus du métabolisme des xénobiotiques, les CYPs sont aussi impliqués dans la biotransformation et la synthèse de molécules endogènes : les hormones stéroïdiennes (progestérone, prégnénolone, cortisol, testostérone, estradiol), les éicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes), les acides biliaires, les acides gras, la vitamine D, les amines biogènes et les rétinoïdes (voir [Tableau 5](#)). Les familles 4 à 51 sont impliquées dans la transformation des composés endogènes. De plus, les familles 1 à 3 en plus de leur rôle avec les composés exogènes, participent aussi à la biotransformation des molécules endogènes. Certaines familles sont situées dans le

réticulum endoplasmique alors que d'autres sont des enzymes mitochondriales (Lewis 2001).

Tableau 5 : Substrats endogènes des CYP450s

Substrats	CYP450	Références
Stéroïdes	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1, CYP21A2	(Waxman, Lapenson et al. 1991, Nebert and Russell 2002)
Cholestérol et acides biliaires	CYP3A4, CYP7A1, CYP7B1, CYP8B1, CYP27A1, CYP39A1, CYP46A1, CYP51A1	(Nebert and Russell 2002, McLean, Hans et al. 2012)
Acide rétinoïque	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1	(Ray, Bain et al. 1997, Nebert and Russell 2002)
Acide arachidonique et autres éicosanoïdes	CYP1A1, CYP2B, CYP2C, CYP2E, CYP2G, CYP2J, CYP4A, CYP5A1, CYP8A1	(Kroetz and Zeldin 2002, Nebert and Russell 2002)
Vitamine D	CYP2J3, CYP2R1, CYP3A4, CYP27A1, CYP27B1, CYP24A1	(Ohyama and Yamasaki 2004, Prosser and Jones 2004, Sakaki, Kagawa et al. 2005, Aiba, Yamasaki et al. 2006, Tissandie, Gueguen et al. 2006)

2.2.1 Stéroïdes

Six CYPs participent à la stéroïdogénèse (CYP11A1, 11B1, 11B2, 17A1, 19A1 et 21A2). Les CYP11 sont situés dans les mitochondries et participent à la synthèse de corticostérone. Le CYP17A1 est impliqué dans la synthèse du cortisol, de la testostérone et des oestrogènes. Le CYP19A1 synthétise des oestrogènes à partir des androgènes, alors que le CYP21A2 catalyse une étape essentielle à la biosynthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes (Waxman, Lapenson et al. 1991, Nebert and Russell 2002).

2.2.2 Cholestérol et acides biliaires

Au moins huit isoformes sont impliqués dans la conversion du cholestérol. Premièrement, il y a le CYP51A1, l'isoforme le mieux conservé au cours des siècles, qui catalyse la production de cholestérol à partir du lanostérol. Les autres CYPs (CYP3, 7, 8, 27, 39 et 46) participent à l'élimination du cholestérol de l'organisme en le transformant en acides biliaires, où les acides biliaires seront solubilisés et excrétés. Il s'agit de la principale route d'élimination du cholestérol chez les mammifères (Nebert and Russell 2002, McLean, Hans et al. 2012).

2.2.3 Acide rétinoïque

L'hydroxylation de la vitamine A (acide rétinoïque) est assurée par la famille CYP26 qui est composée de 3 membres (CYP26A1, 26B1, 26C1). Le CYP26 régule les niveaux cellulaires d'acide rétinoïque, par l'hydroxylation de celle-ci. L'acide rétinoïque est impliqué dans la régulation de certains gènes aux niveaux embryonnaire et tissulaire et son hydroxylation en régule l'activité (Ray, Bain et al. 1997, Nebert and Russell 2002).

2.2.4 Acide arachidonique

Au moins quatorze enzymes (CYP1, 2, 3, 4, 5A1, 8A1) sont impliquées dans le métabolisme de l'acide arachidonique, qui est converti en métabolites éicosanoïdes. Les CYPs participent à l'époxidation, la réduction et l'oxydation de l'acide arachidonique et ses métabolites. Les métabolites produits sont des prostaglandines

D, F et E, des éicosanoïdes (acide époxyéicosatriénoïque, acide hydroxyéicosatétraénoïque), des leucotriènes et de la tromboxane A. Ces métabolites jouent un rôle dans une grande variété de processus biologiques tels que la vasoconstriction/vasodilatation, l'œdème, la réponse allergique, la chimiotaxie, l'hyperthermie, l'agrégation plaquettaire, la résorption osseuse et la réponse à la douleur (Kroetz and Zeldin 2002, Nebert and Russell 2002).

2.2.5 Vitamine D

L'hydroxylation de la vitamine D ainsi que sa dégradation sont effectuées par plusieurs isoformes des CYP450s hépatique et rénal, soit mitochondrial ou soit situé dans le réticulum endoplasmique. Deux types d'hydroxylation sont nécessaires afin d'activer la vitamine D, une 25-hydroxylase hépatique et une 1 α -hydroxylase rénale. De plus, le catabolisme de la vitamine D est aussi assuré par une 24-hydroxylase. Toutes ces hydroxylases font partie de la famille du CYP450. Brièvement, la première étape est une hydroxylation en position C25 ce qui amène la formation de 25-hydroxyvitamine D₃ (25(OH)D₃), la forme circulante la plus abondante. Cette 25-hydroxylation, par le foie, est assurée par plusieurs isoformes chez le rat tels que le CYP2C11, 2J3, 2R1, 3A2 et 27A1. Ensuite, la 25(OH)D₃ est hydroxylée en position C1 α par le CYP27B1 mitochondrial, ce qui conduit à la formation de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃), la forme active de la vitamine D. Cette 1 α -hydroxylation se réalise dans les reins. Le catabolisme de la vitamine D est assuré par le CYP24A1, ce qui conduit à l'hydroxylation de la 1,25(OH)₂D₃, en position 24,

pour donner la forme inactive la 1,24,25-trihydroxyvitamine D₃ (1,24,25(OH)₃D₃), l'acide calcitroïque (voir [Figure 10](#)). Cette 24-hydroxylase est ubiquitaire, afin de contrôler les niveaux de vitamine D active dans tout l'organisme, mais elle est principalement active dans les reins (Ohyama and Yamasaki 2004, Prosser and Jones 2004, Sakaki, Kagawa et al. 2005, Aiba, Yamasaki et al. 2006, Tissandie, Gueguen et al. 2006).

Figure 10 : Hydroxylation de la vitamine D

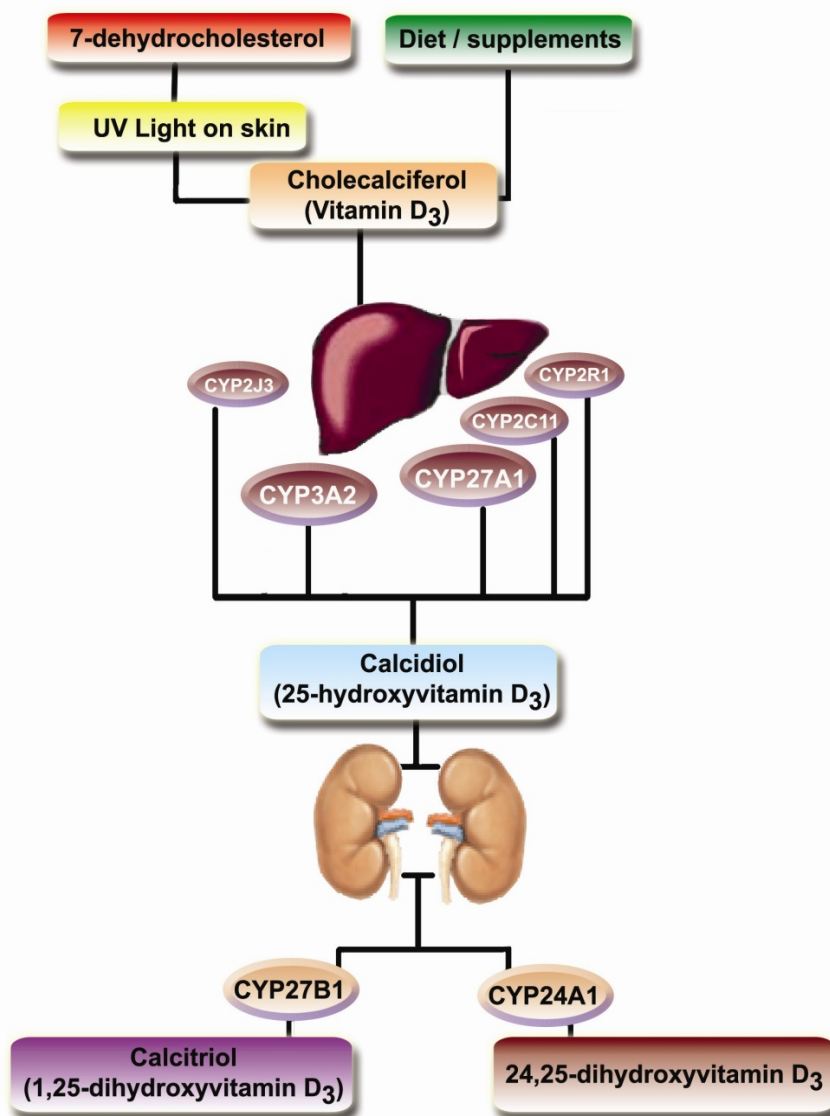


Schéma représentant les différentes étapes de l'hydroxylation de la vitamine D chez l'humain. Premièrement, la transformation du 7-dehydrocholestérol en vitamine D₃, par l'action du soleil au niveau de la peau. La vitamine D₃, synthétisée par la peau ou absorbée dans la diète, est hydroxylée en position 25 par l'action de certains isoformes hépatiques. Ensuite, la 25-hydroxyvitamine D₃ est hydroxylée en position 1 dans les reins. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ est la forme active de la vitamine D et peut être dégradée par l'ajout d'un groupement hydroxyle en position 24 dans les reins. Source : Laboratoire Dr Pichette

2.3 Inhibition/Induction des CYP450s

Plusieurs conditions ou substrats peuvent affecter l'expression et l'activité des CYP450s. Les inducteurs augmentent l'expression protéique ainsi que l'activité de certains CYP450s, ce qui se traduit par une augmentation de la biotransformation des substrats de ce CYP450 et peuvent parfois avoir des conséquences cliniques importantes sur la pharmacocinétique des médicaments. Les inductions peuvent avoir lieu soit via une induction de la transcription ou de la traduction de la protéine, soit par une diminution de la dégradation de l'enzyme ou par la protection de son ARNm.

L'inhibition des CYPs est aussi très fréquente. Les inhibitions peuvent être directes ou indirectes, ainsi que réversibles ou irréversibles. Les inhibitions irréversibles surviennent lorsque le substrat se lie de façon covalente en entraînant la destruction de l'enzyme. Les inhibitions réversibles se produisent quand un substrat se lie à l'enzyme et demeure à son site actif temporairement. Pendant ce temps, il ne peut y avoir de nouvelle molécule qui s'y fixe. Il y a ensuite dissociation du substrat et du site actif du CYP450 et l'enzyme est de nouveau fonctionnelle. Une inhibition directe se produit quand le substrat se lie directement sur le site actif de l'enzyme, alors que dans les réactions indirectes c'est le métabolite produit par l'enzyme qui se lie sur son site actif. Il peut aussi y avoir compétition entre les substrats et les inhibiteurs, c'est l'affinité pour l'enzyme qui déterminera qui sera transformé en priorité (Coleman 2010).

Certaines pathologies et conditions ont un effet sur l'expression et l'activité des CYP450s. L'inflammation, l'insuffisance hépatique, l'insuffisance cardiaque, l'âge, l'obésité, le diabète et l'insuffisance rénale sont des conditions qui modifient la pharmacocinétique de certains médicaments par la modification de l'expression des CYP450s.

2.3.1 Inhibition des CYP450s en présence d'IRC

Tel que discuté brièvement dans la section 1.6.3, l'IRC affecte l'expression des CYP450s. Déjà en 1980, des études chez l'humain ont montré une diminution de la clairance hépatique de certains médicaments chez les patients atteints d'IRC. C'est alors que le métabolisme de nombreux médicaments a été évalué en présence d'IRC. Ces études suggéraient qu'une diminution de l'activité de certains isoformes du CYP450 était responsable de la diminution du métabolisme hépatique de certains médicaments observée chez les patients souffrants d'IRC (Wedlund, Aslanian et al. 1984, Kevorkian, Michel et al. 1996, Rostami-Hodjegan, Kroemer et al. 1999).

Par la suite, des études animales ont montré une diminution de l'activité et du contenu en CYP450 total dans des microsomes de foie de rats atteints d'IRC. Depuis, les avancés technologiques ont permis de mesurer avec plus de précision l'expression protéique et génique des différents isoformes. Notre laboratoire s'intéresse depuis quelques années aux modifications de la clairance non rénale chez le rat atteint d'IRC, particulièrement aux effets sur la clairance hépatique médié

par le CYP450. Premièrement, une étude *in vivo* a permis de mettre en évidence une diminution de l'activité des trois principaux isoformes impliqués dans le métabolisme des médicaments chez le rat (CYP1A2, 2C11 et 3A2). En effet, des tests d'exhalation ont démontré une diminution significative du métabolisme des marqueurs radioactifs spécifiques pour les CYP2C11 et 3A2. Le métabolisme de l'aminopyrine et de l'érythromycine était diminué d'au moins 35% alors que celui de la caféine était inchangé chez les rats atteints d'IRC (Leblond, Giroux et al. 2000).

Ces études *in vivo* ont été corroborées chez l'humain par une étude qui a démontré une diminution de l'activité du CYP3A4 de 28%, mesurée à l'aide de l'érythromycine marquée chez des patients atteints du stade 5 de l'IRC (Dowling, Briglia et al. 2003).

Notre laboratoire a aussi évalué les effets de l'IRC sur l'expression génique et protéique des différents isoformes du CYP450s *in vitro*. Ces études ont démontré une diminution de l'expression protéique des isoformes du CYP2C11, 3A1, 3A2 de 45%, 85% et 65%, respectivement, chez les rats atteints d'IRC. Par contre, l'expression protéique des isoformes CYP1A2, 2C6, 2D1 et 2E1 n'a pas été modifiée. Par ailleurs, nos travaux ont permis de démontrer une réduction de l'expression de l'ARNm du CYP2C11, 3A1 et 3A2, ce qui suggère un défaut de synthèse protéique. Finalement, nous avons aussi montré une diminution de 50% du métabolisme *in vitro* de l'érythromycine, dans les microsomes de rats souffrants d'IRC. De plus, il

est à noter que les diminutions d'activité et d'expression génique et protéique étaient directement corrélées avec la clairance de créatinine chez les rats atteints d'IRC (Leblond, Guevin et al. 2001).

L'équipe de Tereo et Shen a été la première à avoir émis l'hypothèse de la présence d'un facteur circulant pour expliquer la diminution de l'activité du CYP450 dans les cas d'IRC. Ils ont montré une diminution de l'extraction du 1-propranolol dans des foies de rat normaux perfusés avec du sérum de rats atteints d'IRC. C'est alors que l'hypothèse de la présence d'un facteur sérique dans le sérum de rats atteints d'IRC fut soulevée pour expliquer la diminution de l'activité du CYP450 hépatique (Terao and Shen 1985).

Le laboratoire du Docteur Pichette a ensuite démontré une réduction de 35% du contenu total en CYP450 dans les hépatocytes de rats normaux incubés avec du sérum de rats atteints d'IRC, comparativement à du sérum de rats témoins. Les effets du sérum de rats souffrants d'IRC sur l'expression protéique et génique ont été évalués dans des hépatocytes de rats normaux. Les résultats obtenus, après 24 heures d'incubation, ont montré une réduction significative de 40% de l'expression protéique des isoformes 2C6, 2C11, 3A1 et 3A2 dans les hépatocytes incubés avec du sérum de rats atteints d'IRC. Aussi, l'expression de l'ARNm, du *CYP2C11* et *3A2*, a été diminuée de 27 et 36% respectivement, dans ces mêmes hépatocytes. Ces résultats ont démontré qu'un ou des facteurs sériques présents

dans le sérum étaient responsables de l'inhibition des CYP450 hépatiques chez les rats atteints d'IRC (Guevin, Michaud et al. 2002).

Cette étude a aussi permis de mesurer le poids moléculaire du ou des facteurs qui causent l'inhibition des CYP450 par le sérum. Un fractionnement sérique a démontré que c'est la fraction de 10 à 30 kDa qui cause une réduction de 40% de l'expression protéique de l'isoforme CYP3A2 (Guevin, Michaud et al. 2002).

À l'aide d'un protocole expérimental identique, la même étude a été reprise dans notre laboratoire, mais avec des sujets humains, afin d'établir la présence de facteurs sériques dans le sérum de patients atteints du stade 5 de l'IRC. Les résultats obtenus avec le sérum humain sont similaires aux résultats obtenus lors de l'utilisation du sérum de rats. Le contenu en CYP450 total et l'expression protéique et génique des différents isoformes (CYP1A2, 2C6, 2C11, 2D1, 3A2 et 4A1) présentent une diminution d'au moins 45% dans les hépatocytes incubés avec du sérum de patients atteints d'IRC, alors que le CYP2E1 n'a pas été modifié. De plus, le fractionnement du sérum de patients atteints d'IRC a permis de montrer que l'inhibition du CYP450 hépatique était causée par la fraction 10 à 15 kDa (Michaud, Dube et al. 2005).

Malgré toutes les études sur l'effet de l'IRC sur les xénobiotiques, aucune n'a évalué les effets de l'IRC sur les CYP450s impliqués dans le métabolisme des

endobiotiques. L'un de mes projets de doctorat a été de déterminer les effets de l'IRC sur les CYP450s impliqués dans l'hydroxylation de la vitamine D.

2.3.2 Inhibition des CYP450s par la PTH

De nombreuses molécules s'accumulent chez les individus souffrant d'IRC et pourraient théoriquement être responsables de l'inhibition du CYP450. Premièrement, il existe de nombreuses toxines urémiques ; en effet, plus de 90 toxines ont été identifiées chez les patients atteints d'IRC (Yavuz, Tetta et al. 2005). Les plus connues sont le sulfate d'indoxyle, l'acide 3-carboxy-4-méthyl-5-propyl-2-fluranpropanoïque, l'indoleacétate et l'acide hippurique (Sun, Frassetto et al. 2006). Par contre, très peu d'études ont évalué l'effet de ces toxines sur les enzymes impliquées dans le métabolisme des endobiotiques et des xénobiotiques. Deuxièmement, l'IRC est considérée comme un état inflammatoire (Bistrrian 1998, Stenvinkel, Heimbürger et al. 1999). En effet de nombreuses cytokines sont augmentées chez les patients atteints d'IRC telles que l'IL-1, l'IL-6, les protéines inhibitrices des granulocytes et le facteur de croissance transformant (TGF- β) (Oettinger, Bland et al. 1994, Sunder-Plassmann, Kapiotis et al. 1994, Ziesche, Roth et al. 1994, Akahoshi, Kobayashi et al. 1995, Higuchi, Yamamoto et al. 1997). D'un point de vue théorique, ces cytokines sont capables d'inhiber le CYP450 hépatique *in vitro* et *in vivo*. Finalement, l'IRC est associée à plusieurs pathologies dont l'hyperparathyroïdie secondaire qui est caractérisée par des concentrations de parathormone (PTH) jusqu'à 150 pmol/L (normal 5 pmol/L). Point intéressant,

plusieurs cytokines et la PTH possèdent un poids moléculaire entre 10 et 15 kDa, qui est le poids moléculaire du ou des facteurs qui semblent responsables de l'inhibition du CYP450 dans nos études (Guevin, Michaud et al. 2002, Michaud, Dube et al. 2005, Yavuz, Tetta et al. 2005).

Des études ont mis en évidence que l'augmentation de la PTH chez les individus atteints d'IRC est responsable de la diminution de la synthèse de plusieurs protéines au niveau hépatique telles que la lipase hépatique, le récepteur de la vasopressine et de l'angiotensine II, ainsi que dans les cardiomyocytes, tel que le facteur de croissance insulino-mimétique de type I (IGF-1) (Klin, Smogorzewski et al. 1994, Massry, Klin et al. 1995, Klin, Smogorzewski et al. 1996, Qing, Ding et al. 1999). Ces données ont été la base de mon hypothèse de maîtrise. Lors de mon projet de maîtrise, nous avons émis l'hypothèse que la PTH pouvait être un des facteurs sériques impliqués dans la diminution du CYP450 en présence d'IRC. Afin de démontrer cette hypothèse, nous avons incubé des hépatocytes de rats avec du sérum dont la PTH a été immunoneutralisée (grâce à des anticorps) et aussi avec du sérum provenant de rats souffrant d'IRC ayant subi, au préalable, une parathyroïdectomie (IRC-PTX). De plus, nous avons évalué l'effet de la parathyroïdectomie (PTX) sur le CYP450 hépatique dans un modèle *in vivo*. Finalement, nous avons évalué l'effet de la PTH 1-34 sur le CYP450 dans des hépatocytes en culture. Les résultats de ces expériences ont démontré que la déplétion du sérum par les anticorps anti-PTH a annulé l'effet inhibiteur du sérum

de rats atteints d'IRC. De plus, le sérum de rats IRC-PTX n'a eu aucun effet inhibiteur sur le CYP450, comparativement au sérum de rats présentant une IRC, lorsqu'il a été incubé avec des hépatocytes. *In vivo*, la PTX a prévenu partiellement l'inhibition du CYP450 hépatique en présence d'IRC. Ensuite, l'ajout de PTH (à des concentrations similaires à celles retrouvées dans les cas d'IRC) à des hépatocytes en culture a entraîné une inhibition de l'expression du CYP450. Tous ces résultats ont mis en évidence que la PTH est, au moins en partie, responsable de la diminution du CYP450 en présence d'IRC (Michaud, Naud et al. 2006).

Nos études précédentes ont permis de démontrer que la PTH avait des effets inhibiteurs sur les isoformes du CYP450 impliqués dans la biotransformation des médicaments. L'un des projets de mon doctorat a été d'évaluer l'hypothèse selon laquelle la PTH pourrait non seulement inhiber le CYP450 responsable du métabolisme des médicaments mais serait aussi impliquée dans la diminution des fonctions endogènes du CYP450.

2.3.3 Effet de la dialyse/transplantation sur le CYP450

Afin de préciser les effets de la dialyse et de la transplantation sur l'expression du CYP450 chez les sujets atteints d'IRC, nous avons évalué l'expression des CYP450s dans des hépatocytes de rats normaux incubés avec du sérum provenant de patients traités à l'aide de la dialyse. Notre équipe a démontré en 2005 que le sérum humain provenant de patient soumis à la dialyse ne provoquait

pas d'inhibition sur le CYP450. Dans ces expériences, les prélèvements ont été effectués un et six mois après le début de l'hémodialyse chronique, toutefois le sérum avait été prélevé juste avant la séance (Michaud, Dube et al. 2005). Ensuite, l'équipe dirigée par Dr Thomas Nolin a démontré que l'activité du CYP3A4, évaluée avant une séance d'hémodialyse à l'aide de l'érythromycine marquée au ^{14}C a été inhibée et que celle-ci s'est rétablie deux heures post-séance d'hémodialyse (Nolin, Appiah et al. 2006). Ces résultats ont démontré qu'une séance de dialyse pouvait faire disparaître l'effet inhibiteur de l'IRC sur le CYP450, à tout le moins *in vivo*.

Afin de mieux comprendre l'effet de la dialyse sur la composition du sérum urémique et son effet sur la modulation du CYP450 *in vitro*, nous avons donc, lors d'un de mes projets de doctorat, étudié les effets du sérum prélevé pré et post dialyse sur l'expression du CYP450 dans un modèle de cellules en culture.

2.4 Méthodes d'analyse de l'activité des CYP450s

Il existe plusieurs méthodes d'analyse de l'activité des CYP450s, qui comprennent l'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), la spectrométrie de masse et la détection par fluorimétrie. Toutes ces méthodes mettent en évidence l'activité des CYP450s par la mesure de la production de métabolites spécifiques à chaque isoforme en présence d'un substrat donné. Les méthodes les plus connues pour mesurer l'activité du CYP3A sont l'hydroxylation de la testostérone et la N-déméthylation de l'érythromycine. Par

contre, plusieurs obstacles techniques (disponibilité de la testostéron et sensibilité du test avec l'érythromycine) ne permettent pas leur utilisation lors des expérimentations dans les cellules en culture. Il existe aussi des méthodes de *High-throughput screening*, qui consistent en une analyse de très nombreux métabolites à la fois, qui sont principalement adaptées à l'industrie pharmaceutique. De plus, quelques compagnies ont récemment développé des méthodes rapides et simples de détection de l'activité des CYP450s humains par des méthodes de fluorimétrie, très peu spécifiques chez le rat.

Les défis restent donc entiers car l'utilisation des méthodes plus précises exige beaucoup de temps et d'argent et les méthodes commerciales, plus rapides, sont beaucoup moins spécifiques. Afin de mieux évaluer les modulations de l'activité du CYP450, nous avons développé une technique plus facilement applicable dans un laboratoire de recherche. L'un de mes projet de doctorat a été de mettre au point une nouvelle technique d'analyse de l'activité des CYP450s.

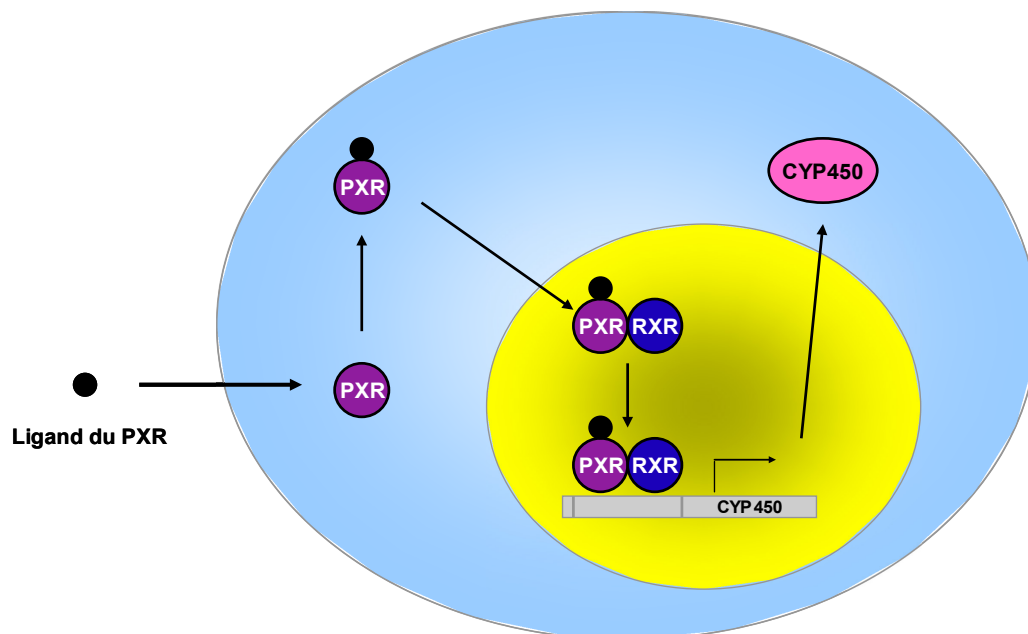
2.5 Régulation des CYP450s

Les CYP450s sont régulés par des facteurs nucléaires qui se lient sur le promoteur du CYP450 et permettent la transcription de l'ARNm. Ces récepteurs nucléaires sont actifs au noyau et sont inductibles suite à la liaison d'un ligand. De plus, la phosphorylation directe du CYP450 peut permettre sa régulation.

2.5.1 PXR

Le *pregnane X receptor* (PXR), aussi appelé *xenobiotic sensing nuclear receptor* (SXR), fait parti de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, sous-famille 1, groupe I, membre 2 (NR1I2). Il forme un hétérodimère avec le *retinoid X receptor* (RXR) et il est principalement exprimé dans le foie et les intestins (Kliewer, Goodwin et al. 2002). Le PXR est le principal régulateur de la transcription du CYP3A. La liaison du ligand (médicament) au PXR dans le cytosol provoque la translocation de la protéine au noyau où le complexe s'hétérodimérise avec le RXR. Cet hétérodimère (ligand-PXR-RXR) se lie au promoteur du CYP3A afin d'agir sur ses gènes cibles (voir [Figure 11](#)). C'est l'activation du récepteur à glucocorticoïde (GR) qui induit l'expression génique de PXR. En plus du CYP3A, le PXR est aussi régulateur de la transcription de plusieurs gènes tels que l'aldéhyde déshydrogénase, l'alcool déshydrogénase, les carboxylestérases, l'UDP-glucoronyl-transférase, la sulfotransférase, le glutathione-transférase, les transporteurs membranaires ATP-binding cassette et les transporteurs d'anions organiques (Xie 2009, Staudinger, Xu et al. 2011).

Figure 11 : Représentation du mode de fonctionnement de PXR



Représentation graphique du mode de fonctionnement de PXR. Lors de la liaison de PXR et son ligand, le complexe PXR-ligand transloque au noyau, où s'effectuera une hétérodimérisation du complexe avec RXR. C'est sous cette forme hétérodimérisée que PXR-RXR se lie au promoteur du CYP450 pour favoriser sa transcription. Source : Laboratoire Dr Pichette

Le PXR est présent chez de nombreuses espèces, mais sa séquence est assez divergente. En effet, la séquence d'acides aminés partage seulement 76% d'homologie entre le PXR humain et le PXR de souris, alors que le domaine de liaison à l'ADN possède une identité de 96%. Cette différence interspèce de PXR peut expliquer les différences d'induction pharmacologique du CYP3A entre les humains et les rongeurs. Par exemple, le pregnenalone 16 α -carbonitrile (PCN) est un puissant inducteur du PXR chez le rat, alors qu'il a très peu d'effet sur le PXR humain. Par

contre, la rifampicine est un puissant inducteur du PXR humain, alors qu'il n'a aucun effet sur le PXR de rat (Xie 2009, Staudinger, Xu et al. 2011).

Le PXR peut lier une grande variété de xénobiotiques, mais il peut aussi lier des ligands naturels et avoir un effet sur différentes fonctions telles que l'homéostasie du glucose, le métabolisme des lipides et la réponse inflammatoire. Le PXR peut être inhibé par différents phénomènes : 1) la liaison d'une protéine qui provoque des changements de conformation du PXR, 2) des changements post-traductionnels qui bloquent son fonctionnement et 3) une ubiquitination, une phosphorylation ou une acétylation du PXR. Tous ces changements rendent impossible la liaison du PXR au promoteur et empêchent la transcription de ses gènes effecteurs. De plus, ces changements sur le PXR peuvent empêcher l'hétérodimérisation du PXR avec le RXR. La répression de PXR par phosphorylation peut être effectuée par la PKA et la PKC (Staudinger, Xu et al. 2011). De plus, il existe un *cross-talk* entre la voie de signalisation du NF- κ B et le PXR. En effet, suite à l'activation de PXR, le PXR inhibe l'activité du NF- κ B, et par conséquent, les gènes cibles du NF- κ B sont alors traduits. De l'autre côté, l'activation de NF- κ B provoque l'inactivation par phosphorylation de PXR et inhibe ses gènes cibles (Zhou, Tabb et al. 2006).

Finalement, il existe une souris génétiquement modifiée PXR null, qui est viable et fertile. Cette souris a complètement perdu la capacité d'induire le CYP3A en présence de PCN (Teng and Piquette-Miller 2005).

2.5.2 CAR

Le *constitutive androstane receptor* (CAR) fait lui aussi parti de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, sous-famille 1, groupe I, membre 3 (NR1I3). Il se retrouve principalement au niveau du foie. Tout comme le PXR, la liaison d'un ligand au cytosol provoque sa translocation vers le noyau et le CAR s'hétérodimérise avec RXR (Xie 2009). Le CAR-RXR se lie au promoteur du *CYP2B* et induit sa transcription en présence du phénobarbital (Sueyoshi and Negishi 2001). De plus, CAR est un des facteurs de régulation du CYP3A (Assenat, Gerbal-Chaloin et al. 2004).

L'homologie de CAR entre l'humain et la souris est de 72%, il existe donc une spécificité d'espèce pour certains activateurs. Certaines molécules, dont le TCPOBOP, sont des agonistes de CAR chez la souris alors qu'elles n'ont pas d'effet sur le CAR humain. Par contre, le clotrimazole active CAR chez l'humain, alors qu'il n'a pas d'effet chez le rat (Moore, Parks et al. 2000, Wei, Zhang et al. 2000).

CAR peut être inhibé par 1) la liaison d'une protéine directement sur CAR et par 2) la phosphorylation par une protéine kinase activée AMP (AMPK). L'ajout de

IL-1 β et de LPS diminue l'expression de CAR et de ses gènes cibles (Assenat, Gerbal-Chaloin et al. 2004).

L'analyse des sites de liaison de PXR et CAR dans les promoteurs démontre une très grande homologie et cette homologie permet une liaison adaptative sur les différents promoteurs (Willson and Kliewer 2002). C'est-à-dire, que PXR peut se lier à des site sur des promoteurs où CAR se fixe et vice versa. En plus d'être le régulateur de la transcription de CYP2B et 3A, CAR a plusieurs autres gènes cibles tels que l'UDP-glucuronyl-transférase, la sulfotransférase, l'aldéhyde déshydrogénase, l'estérase, la méthyltransférase et le MRP2 (Wei, Zhang et al. 2000, Xie 2009).

Finalement, il existe une souris génétiquement modifiée *CAR null* dont l'induction du CYP2B est inhibé même en présence de phénobarbital (Wei, Zhang et al. 2000). De plus, un double *knock-out* PXR/CAR est aussi un modèle de souris utilisé dans les études d'induction et d'inhibition des CYP450s (Xie 2009).

2.5.3 VDR

Le récepteur à la vitamine D (VDR) est un membre de la famille des récepteurs nucléaires, sous-famille 1, groupe I, membre 1 (NR1I1). Il est principalement situé dans l'intestin, les os, la peau et les glandes parathyroïdiennes. Il est responsable de la régulation de l'homéostasie du calcium, de la prolifération et

différenciation cellulaire et de l'immunomodulation. Il se lie au RXR et forme un hétérodimère (Messa, Alfieri et al. 2011). Son ligand naturel est la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ peut aussi s'autoréguler de façon négative, puisqu'elle régule sa propre synthèse, par la répression de la 1α -hydroxylase (CYP27B1) (Xie 2009).

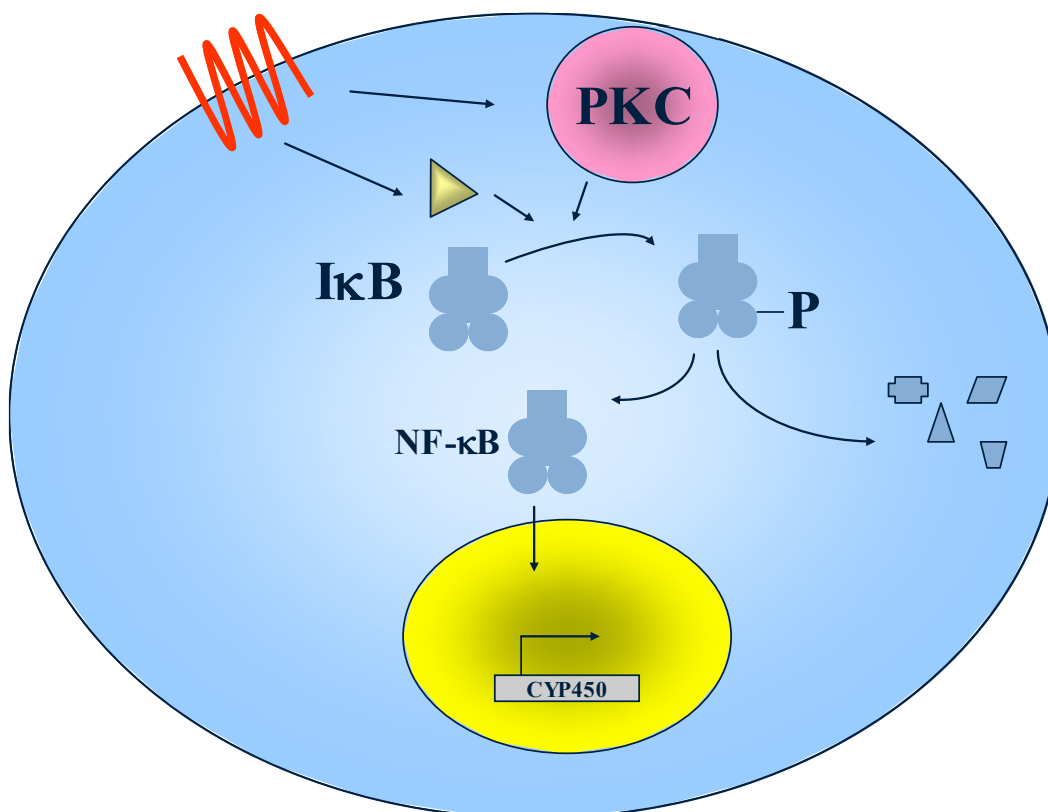
Le VDR est aussi un des facteurs de transcription du CYP3A. Comme il est très faiblement exprimé dans les hépatocytes, son implication dans la détoxification se situe au niveau intestinal. La coexpression de VDR et du CYP3A dans les entérocytes indique que la vitamine D alimentaire pourrait être impliquée dans le métabolisme de premier passage dans l'intestin. En plus du CYP3A, le VDR peut agir sur l'expression de CYP2B6 et 2C9. Le VDR partage les mêmes sites de liaison que PXR et CAR (Xie 2009).

2.5.4 NF- κ B

Le NF- κ B est un facteur de transcription pléiotropique qui joue un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologiques tels que la réponse immunitaire, les réactions inflammatoires, la prolifération cellulaire, l'apoptose et le développement (Li and Verma 2002). La forme la plus abondante du NF- κ B est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : le p65 et le p50 (Ke, Rabson et al. 2001, Li and Verma 2002). Il est séquestré dans le cytoplasme par sa liaison avec son inhibiteur I κ B. Lors de l'activation du complexe, il y a phosphorylation, polyubiquitination et protéolyse du I κ B (voir [Figure 12](#)). Par

conséquent, il y a relâche du NF- κ B qui peut alors effectuer une translocation au noyau et agir sur ses promoteurs cibles. De nombreuses études démontrent que l'activation de NF- κ B est impliquée dans la diminution de l'expression du CYP450 par les cytokines proinflammatoires et le LPS (Tian, Ke et al. 1999, Ke, Rabson et al. 2001, Abdulla, Goralski et al. 2005).

Figure 12 : Représentation du mode de fonctionnement du NF- κ B



Représentation graphique du mode de fonctionnement du NF- κ B. L'activation d'un récepteur (ici le récepteur à PTH couplé aux protéines G, à 7 passages transmembranaires) permet l'activation de la voie de PKA ou de PKC. Ces voies phosphorylent le complexe I κ B (forme bleu), ce qui permet la relâche du NF- κ B (ses deux sous-unités p50 et p65) et la dégradation du complexe. Le NF- κ B transloque au noyau où il peut avoir un effet inhibiteur sur la transcription du CYP450. Le I κ B phosphorylé est dégradé par les protéasomes. Source : Laboratoire Dr Pichette

3. L'hormone parathyroïdienne

L'hormone parathyroïdienne (PTH) est un peptide sécrété par les cellules principales des glandes parathyroïdes, au nombre de quatre chez l'homme, et joue un rôle clé dans le maintien de l'équilibre phosphocalcique. Elle contrôle la concentration ionique de calcium en agissant sur l'absorption intestinale et la réabsorption rénale du calcium, ainsi que sur la résorption osseuse (Abou-Samra, Juppner et al. 1994, Urena, Abou Samra et al. 1994).

La PTH est synthétisée dans les ribosomes sous forme d'une pré-prohormone composée de 115 acides aminés. Celle-ci est ensuite clivée en une prohormone de 90 acides aminés dans le réticulum endoplasmique. Dans l'appareil de Golgi, une dernière modification protéolytique forme un peptide de 84 acides aminés. Cette forme est entreposée dans les granules de sécrétion, situés dans le cytosol (Abou-Samra, Juppner et al. 1994, Hoare and Usdin 2001). La PTH a une demi-vie très courte d'environ quatre minutes et elle est principalement dégradée par les reins en de nombreux fragments (Segre, Niall et al. 1974). Le fragment N-terminal 1-34, qui contient les premiers 34 acides aminés de la PTH, est biologiquement actif (Gensure, Gardella et al. 2005).

La PTH est sécrétée lors d'une hypocalcémie, c'est-à-dire lorsque les concentrations de calcium libre diminuent dans le sang. Afin de rétablir les concentrations sériques de calcium, la PTH stimule l'ostéolyse, qui permet une

relâche du calcium par le tissu osseux. Lors d'une légère baisse de calcium sanguin, la PTH fait augmenter la concentration de calcium en facilitant son transfert du liquide des canalicules de l'os vers le sang. Lors d'une hyperphosphatémie prolongée, la PTH stimule les ostéoclastes, ce qui provoque une dissolution du tissu osseux et inhibe les ostéoblastes qui sont responsables de la formation de l'os. Pendant la dissolution des cristaux de phosphate de calcium, il y a diffusion de calcium mais aussi de phosphate dans le plasma. Cette augmentation de phosphate n'est pas désirable, c'est par l'action de la PTH sur les reins que le phosphate est excrété (Urena, Abou Samra et al. 1994).

Les effets rénaux de la PTH sont responsables de deux phénomènes, soit l'élimination du phosphate et la rétention du calcium. La PTH provoque une augmentation de l'excrétion urinaire du phosphate par la diminution de la réabsorption des ions phosphate au niveau du tubule proximal. De plus, la PTH cause la rétention du calcium, puisqu'elle permet une plus grande réabsorption du calcium par le tubule rénal. L'effet rénal de la PTH a donc deux conséquences positives, elle augmente les niveaux de calcium sérique alors qu'elle diminue ceux du phosphate (Guyton and Hall 2000).

Finalement, la PTH possède une action indirecte sur l'intestin puisqu'elle stimule la formation de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dans le rein qui permet une réabsorption du calcium et du phosphate par l'intestin (Guyton and Hall 2000).

Les effets de la PTH ont pour but de favoriser l'augmentation de calcium dans le plasma. Les cellules principales des glandes parathyroïdiennes sont très sensibles à la concentration sérique de calcium. C'est donc l'augmentation de calcium sérique qui agit comme régulateur de la PTH, par boucle de rétroaction négative (Guyton and Hall 2000).

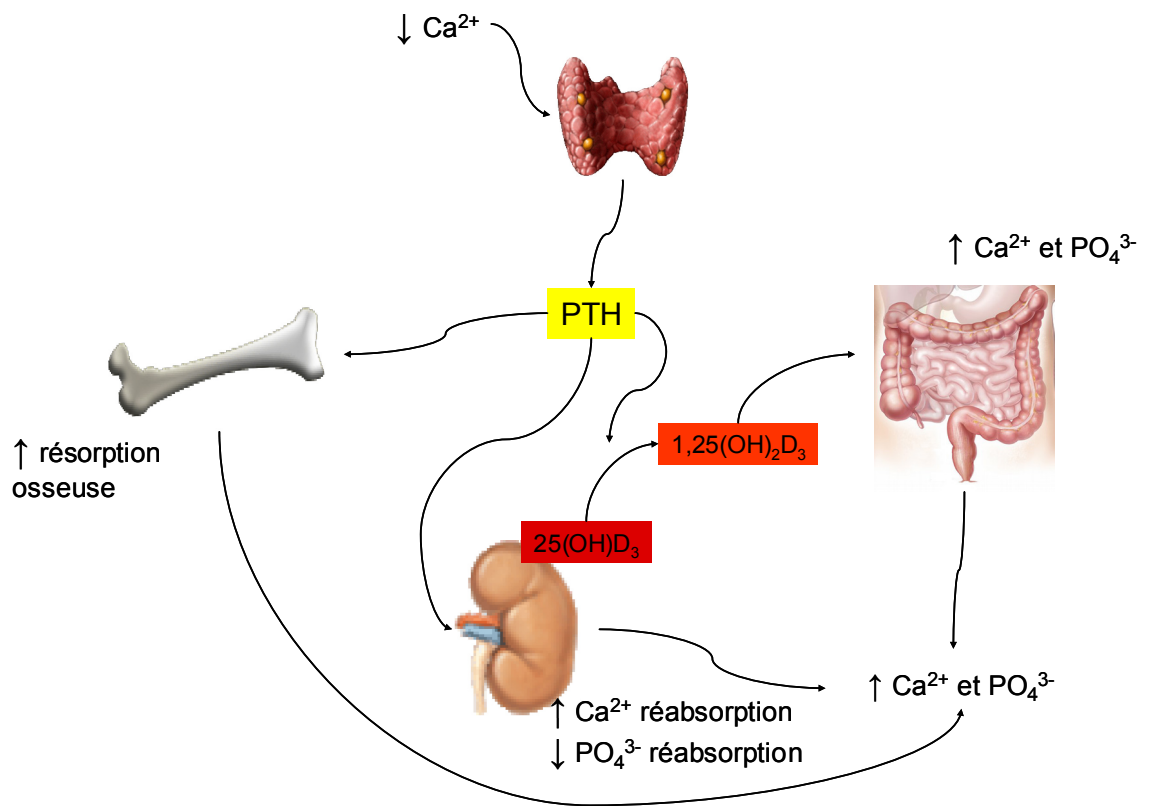
La calcitonine est une hormone peptidique aux effets opposés à la PTH, elle a pour but de diminuer la calcémie. Le *fibroblast growth factor* (FGF23), est une hormone produite par les ostéocytes. Il agit sur les reins afin d'accélérer l'excrétion de phosphate dans l'urine, en plus d'inhiber la synthèse de vitamine D (Lu and Feng 2011).

3.1 L'hyperparathyroïdie secondaire

L'HPTS induit une augmentation des concentrations de PTH circulante. Les concentrations sériques de PTH peuvent augmenter de 5 pmol/L à 150 pmol/L dans les cas d'IRC. Les causes de l'HPTS, chez les patients atteints d'IRC, sont nombreuses. Premièrement, l'hyperphosphatémie stimule la production de PTH. Aussi, elle provoque une augmentation de la liaison du phosphate avec le calcium sanguin, ce qui favorise l'apparition de l'hypocalcémie. Deuxièmement, la concentration de calcium décroît, ce qui stimule la production de PTH, via le récepteur CaSR à la surface des cellules des glandes parathyroïdes. Troisièmement, en présence d'HPTS,

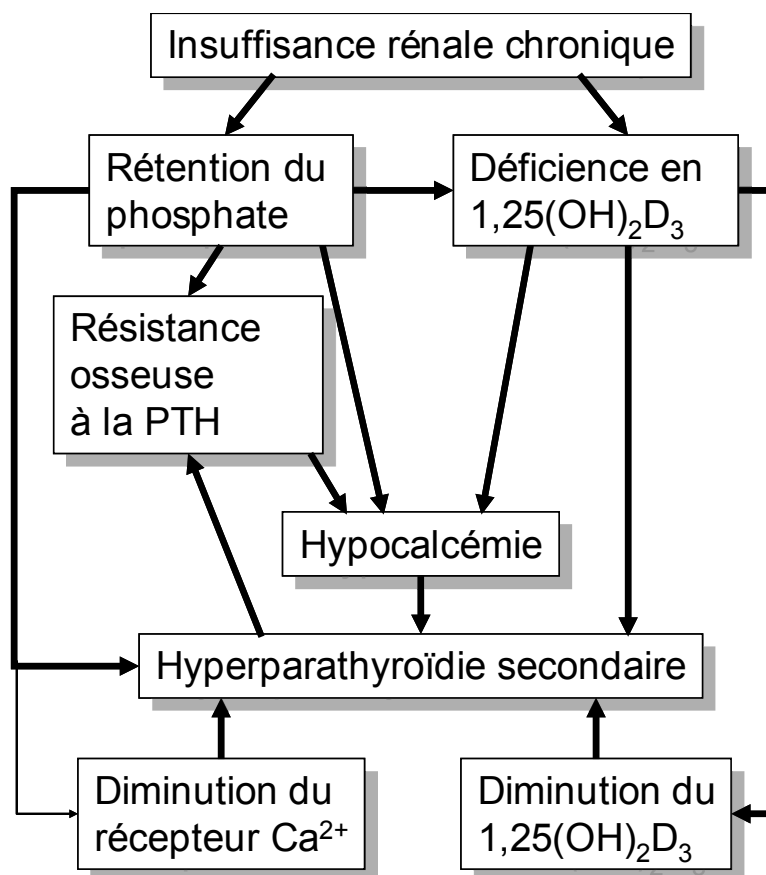
la boucle de rétroaction négative, normalement effectuée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, n'est pas fonctionnelle. En effet, l'IRC provoque une déficience en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, suite à une diminution de l'enzyme 1α -hydroxylase (CYP27B1), présente au niveau des reins seulement. Chez les individus atteints d'IRC, la concentration de vitamine D active est diminuée et ses fonctions (l'absorption du calcium par les intestins, la réabsorption du calcium par les reins et l'arrêt de la relâche de PTH par les glandes parathyroïdes) ne sont plus effectuées normalement, causant ainsi une hypocalcémie (voir [Figure 13](#) et [Figure 14](#)). De plus, la progression de l'IRC provoque une HPTS de plus en plus sévère (Guyton and Hall 2000, Levi and Silver 2005, Silver and Levi 2005, Silver and Levi 2005, Komaba, Kakuta et al. 2011). La résorption osseuse continue cause alors des problèmes d'ostéomalacie chez les patients atteints d'IRC.

Figure 13 : La régulation du calcium et du phosphate



Représentation graphique de la régulation du calcium. La diminution de la concentration sanguine de calcium est détectée par le CaR, ce qui provoque la sécrétion de PTH dans le sang. La PTH a alors un effet sur les os, les reins et indirectement l'intestin, dans le but commun d'augmenter les concentrations de calcium dans le sang. Source : Laboratoire Dr Pichette

Figure 14 : L'hyperparathyroïdie secondaire



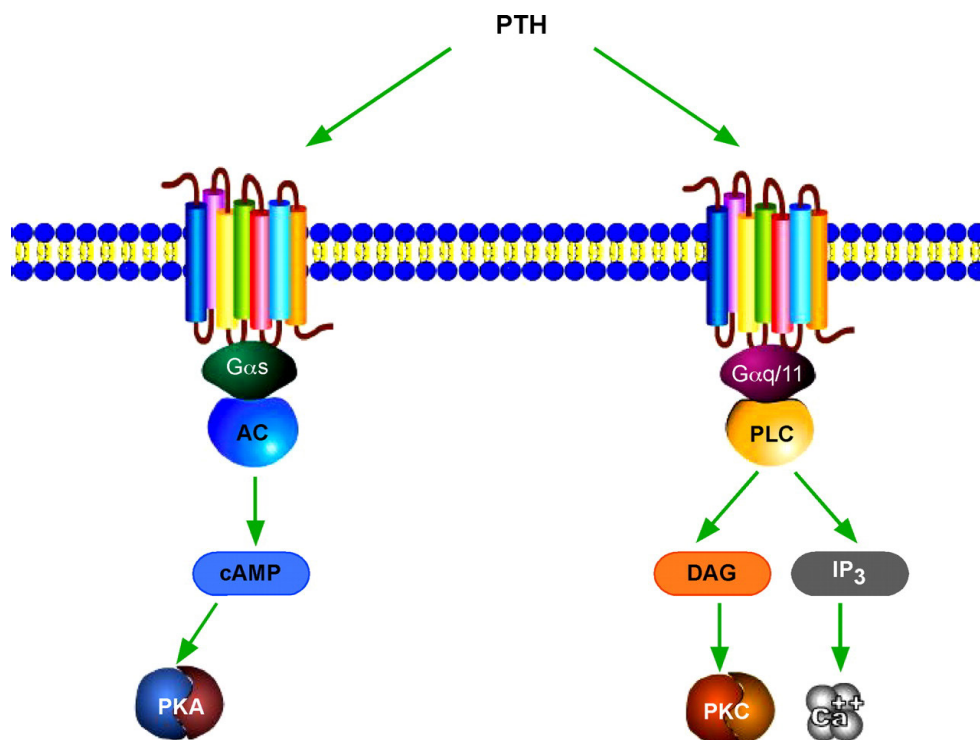
Représentation graphique du phénomène de l'HPTS. L'IRC cause une rétention du phosphate et une déficience en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ qui entraînent une hypocalcémie. Cette hypocalcémie provoque une l'augmentation de la sécrétion de PTH. La carence en vitamine D active et la diminution du récepteur à calcium mettent une pression supplémentaire sur les glandes parathyroïdes. Il se développe alors une hyperparathyroïdie secondaire. Source : Laboratoire Dr Pichette

3.2 Récepteurs à PTH et voies d'activation

Le récepteur à la PTH de type 1 (PTHr) est un membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G de la famille B (Mannstadt, Juppner et al. 1999). Il est situé principalement aux reins et au niveau des os. Le PTHr lie et est activé par la PTH, mais aussi par la protéine apparentée à la PTH (PTHrP-parathyroid-hormone-

related protein). Le PTHR régule les fonctions cellulaires via l'activation de deux sous-types de protéine G : Gs et Gq (voir [Figure 15](#)). Ces protéines G provoquent l'activation de deux voies de signalisation soit l'adénylate cyclase/protéine kinase A (cAMP/PKA) et la phospholipase C/protéine kinase C (PLC/PKC) (Gensure, Gardella et al. 2005, Vilardaga, Romero et al. 2011). C'est la position du ligand à l'intérieur de la poche de liaison du récepteur qui détermine le changement de conformation et qui, conséquemment, active préférentiellement soit cAMP/PKA ou soit PLC/PKC (Hoare and Usdin 2001, Vilardaga, Frank et al. 2001). Il existe aussi un récepteur de type 2 (PTHR2) qui n'est pas impliqué dans la régulation du calcium mais plutôt dans la régulation d'hormones produites par le système nerveux central (Usdin, Bonner et al. 2002).

Figure 15 : Voies de signalisation activées par la liaison de la PTH sur son récepteur (modifiée de Friedman (Friedman and Goodman 2006)).



Représentation graphique de l'activation du récepteur à PTH. Lors de la liaison de la PTH à son récepteur, deux voies d'activation peuvent être activées, Gs ou Gq. La protéine Gs provoque l'activation de la voie du PKA, via l'adénylate cyclase et l'AMPc, alors que la protéine Gq cause une activation de la voie du PKC, via la phospholipase C.

3.3 Effets des voies de signalisation de la PTH sur le CYP450

3.3.1 PKA

Les voies de signalisation activées par la PTH incluent la production d'AMPc, qui active la PKA, entraînant la phosphorylation de plusieurs protéines effectrices, comme le '*cyclic adenosine monophosphate response element binding protein*' (CREB) et la '*glycogène synthase kinase 3-béta*' (GSK-3 β) (Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2002, Swarthout, D'Alonzo et al. 2002).

Les effets de l'activation de la PKA sur le CYP450 demeurent controversés, mais une grande majorité des études démontre que l'augmentation d'AMPc inhibe le CYP450. Par exemple, la production de l'AMPc entraîne la phosphorylation du CYP450, ce qui cause une diminution de l'activité des différents isoformes du CYP450 (Jansson, Epstein et al. 1987, Pyerin, Horn et al. 1987, Jansson, Curti et al. 1990, Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2002, Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2003, Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2005). L'augmentation de la production de l'AMPc provoque aussi une inhibition de l'expression génique des CYP1A1, 2B1, 2B6 et 3A1 (Sidhu and Omiecinski 1995, Galisteo, Marc et al. 1999), de même qu'elle inhibe l'activité des CYP2B et 2E1 (Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2002, Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2003) et diminue le pouvoir inducteur du phénobarbital sur le CYP2B1 et 3A (Morgan 2001).

3.3.2 PKC

Les voies de signalisation de la PTH peuvent aussi directement activer la PKC via la PLC (Swarthout, D'Alonzo et al. 2002). La voie de la PKC, lorsqu'elle est activée, peut diminuer l'activité et l'expression de plusieurs isoformes du CYP450 par différents moyens (LeHoux, Dupuis et al. 2000, Ding and Staudinger 2005). En effet, l'activation de cette voie diminue l'activité du PXR, ce qui inhibe l'expression génique du CYP3A hépatique (Ding and Staudinger 2005). De plus, la PKC peut phosphoryler le récepteur à vitamine D (VDR) et ainsi inhiber l'expression de l'ARNm

du CYP3A4 chez l'humain (Hara, Yasunami et al. 2002). La PKC régule aussi directement l'activité du promoteur du CYP11B2 (LeHoux, Dupuis et al. 2001). Par contre, la PKC augmente l'activité des CYP1B1 et 1A1, suite à l'inactivation du récepteur Ah causée par une diminution de la phosphorylation des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK) (Ikegwonu, Christou et al. 1999).

3.3.3 Activation NF- κ B

Il a été démontré que la PTH cause une augmentation du NF- κ B dans les cellules ostéoblastiques de rats et d'humains et ce de façon dépendante de la dose et de temps (Ali, Gilston et al. 1999, Guillen, Martinez et al. 2002). La PTH pourrait donc agir via le NF- κ B afin d'inhiber le CYP450. De plus, des résultats obtenus dans notre laboratoire suggèrent l'implication de cette voie dans l'inhibition du CYP450 dans des hépatocytes incubés avec de l'andrographolide, un inhibiteur général de la voie du NF- κ B (Michaud, Naud et al. 2006, Michaud, Nolin et al. 2008).

4. Hypothèses

Ce projet de doctorat porte sur les effets de l'IRC sur le métabolisme des médicaments et les rôles endogènes du CYP450. Nous avons émis les hypothèses suivantes :

- que la méthode d'analyse du DFH/DFB est une méthode spécifique, exacte, précise et rapide pour l'analyse de l'activité du CYP3A2 chez le rat
- que la dialyse enlève l'effet inhibiteur du sérum des patients atteints d'IRC sur le CYP450
- que la déficience en 25(OH)D₃ en présence d'IRC pourrait s'expliquer par un défaut de synthèse secondaire à une réduction des CYP450 dans le foie
- que l'activation du NF-κB et la réduction du PXR pourraient être impliquées dans l'inhibition du CYP450 par l'IRC et la PTH

5. Objectifs

Mon projet de doctorat comporte quatre objectifs : a) évaluer une nouvelle méthode d'analyse du CYP3A chez le rat, b) évaluer l'impact de la dialyse sur l'effet inhibiteur du sérum de patients atteint d'IRC sur le CYP450, c) évaluer l'effet de l'IRC sur la synthèse de la vitamine D [25(OH)D₃] et d) préciser les mécanismes intracellulaires de l'inhibition du CYP450 par l'IRC et la PTH.

6. Article 1

Use of a fluorescent substrate for the selective quantification of rat CYP3A in the liver and the intestine.

Journal of Pharmacol Toxicol Methods. 2007 Mar-Apr;55(2):209-13.

Reprinted with the permission from Elsevier B.V.

Copyright © 2007 by Elsevier B.V. All rights reserved.

**USE OF A FLUORESCENT SUBSTRATE FOR THE SELECTIVE
QUANTIFICATION OF RAT CYP3A IN THE LIVER AND THE
INTESTINE**

Josée Michaud^a, Francois A. Leblond^a, Judith Naud^a, Caroline Boisvert^a, Karine
Desbiens^a, Deborah A. Nicoll-Griffith^b, Vincent Pichette^{a,*}

^aService de Néphrologie et Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada,

^bMerck Frosst Centre for Therapeutic Research, Kirkland, Quebec, Canada

Correspondence addressed to:

Vincent Pichette M.D. Ph.D.
Centre de recherche
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal,
Québec, Canada
H1T 2M4
Tel: (514) 252-3489
Fax: (514) 255-3026

ABSTRACT

Introduction: Quantification of cytochrome P450 is a major issue in the development of new drugs. Different assays have been reported, but few are very selective for the 3A isoform of cytochrome P450. The benzyloxy-substituted lactone cyclooxygenase-2 inhibitor 3-[(3, 4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl] phenyl] furan-2(5H)-one has recently been used successfully to probe isoform 3A of cytochrome P450 in the liver. However, its selectivity for the rat isoform remains to be established as well as its applicability in other tissues, such as the intestine. The purpose of this study was to ascertain the specificity of this substrate for the rat 3A isoform of cytochrome P450 using Supersomes and its application in non-hepatic tissues (e.g., intestine). **Methods:** Specificity of the 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl] furan-2(5H)-one for the isoform 3A of rat cytochrome P450 was established by using either isoform-specific inhibitory antibody or microsomes expressing only one cytochrome P450 isoform. Activity was assayed in rat liver and intestinal microsomal protein preparations. **Results:** Experiments with inhibitory antibodies revealed that in liver and intestinal microsomes, more than 90% of the substrate metabolism was inhibited by antibodies against isoform 3A. Selectivity of the substrate for rat 3A isoform was further determined by testing the metabolic activity of various Supersomes™ preparations. **Discussion:** In conclusion, our results validate the usefulness of 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl]

furan-2(5H)-one as a simple and specific substrate to study the activity of the isoform 3A of cytochrome P450 in the rat liver and intestine.

Keywords: Cytochrome P450; Drug; Intestine; Liver; Metabolism; Methods; Microsomes; Rat; Specificity

1. INTRODUCTION

Quantification of CYP3A is a major issue for the study and development of new drugs. Many different assays have been validated and successfully applied despite various pitfalls. The classical testosterone 6 β -hydroxylation assay (Kostrubsky et al., 1999; Spatzenegger & Jaeger, 1995) is probably the most widely used but the fact that the resulting metabolites have to be measured by high-performance liquid chromatography limits its application. In addition, it can hardly be applied for large-scale screening studies since each tested sample must be measured separately. Also, the testosterone 6 β -hydroxylation assay would be difficult to use in rat, because, unlike human, testosterone is metabolized by several CYP450s in rat, different isoforms having different product selectivity (Waxman, 1988).

On the other hand, the CYP3A-selective erythromycin N-demethylase (ERDM) activity (Wang, Newton, Scheri & Lu, 1997) has an interesting selectivity but the Nash assay (Nash, 1953) used to quantify the resulting formation of formaldehyde has a low sensitivity (Kleeberg & Klinger, 1982).

Synthetic fluorescent substrates such as benzyloxyquinoline (BQ) and 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC) have been proposed as probe for the metabolic activity of the human CYP3A4 (Renwick, Surry, Price, Lake & Evans, 2000;

Stresser, Turner, Blanchard, Miller & Crespi, 2002). However, the same specificity was not found in rat since they are also significantly metabolized by CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D (Stresser et al., 2002).

Given the unique catalytic functions ascribed to CYP450 isoforms, there is an ongoing need for substrate and enzymatic assays that provide specificity and sensitivity for the analysis of individual enzymatic activities. Chauret et al. (1999) described a 96-well plate assay to measure cytochrome CYP450 3A in human liver microsomes using a selective fluorescent probe, the 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl] furan-2(5H)-one (DFB) that is specifically metabolized by human CYP3A4 (Fig. 1). It is debenzylated to 3-hydroxy-5,5-dimethyl-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl] furan-2(5H)-one (DFH) by liver microsomes. This metabolite could easily be measured by fluorescence. Recently, Nicoll-Griffith et al. demonstrated that DFB is very specific for human CYP3A4 and is also efficiently metabolized by the rat counterpart, CYP3A1/ 3A2 (Nicoll-Griffith et al., 2004). However, the specificity of this assay for the rat liver CYP3A1/3A2 remains to be clarified. Furthermore, its use for the quantification of CYP3A in other tissue, especially the intestine, has not been assessed.

The objectives of the present study were (a) to establish the specificity of the DFB assay for rat CYP3A1 and CYP3A2 using Supersomes (insect cells transfected

with various rats CYP450 isoform) and (b) to validate the use of this assay in non-hepatic tissue (e.g., the intestine).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

β -NADPH, oxidized glutathione and glutathione reductase were from Sigma Chemicals (St Louis, MO). Goat anti-rat CYP3A2, rabbit anti-rat CYP3A2, goat anti-rat CYP1A1 and goat anti-rat CYP2C11 were from BD Biosciences Discovery Labware (Oakville, Ont, Canada). Rabbit anti-human CYP2D6 was obtained from Oxford Biochemical Research Inc. (Oxford, MI). Microsomes preparation from Baculovirus-infected insectcell (BTI-TN-5B1-4) containing recombinant rat CYP450 isoforms, coexpressed cytochrome CYP450 reductase and cytochrome-b5 (Supersomes™) expressing rat CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13, 2D1, 2D2, 3A1 or 3A2 as well as microsomes from the same insect cells infected with wild-type baculovirus were obtained from BD Biosciences. The DFB and its metabolite, DFH, were kindly provided by Merck Frosst Canada Ltd (Pointe Claire, Que, Canada). All other chemicals were of ACS grade or higher.

2.2. Rat microsomes preparation

Male Sprague–Dawley rats (Charles River, Saint-Charles, Que, Canada), weighing 200–250 g were housed in the Research Centre animal care facility and maintained on Purina rat pellets and water ad libitum. An acclimatisation period of at least 3 days was allowed to the animals before any experimental work was

undertaken. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals.

The rat livers were immediately excised after the animals were sacrificed by decapitation, and microsomes were isolated by differential centrifugation (Cinti, Moldeus & Schenkman, 1972). Samples were maintained at 4°C during microsome preparation. Rat intestinal microsomes were also prepared from the same rats following a previously reported method (Leblond et al., 2002). Briefly, enterocytes were obtained by elution, based on the methods of Weiser et al. (Fasco, Silkworth, Dunbar & Kaminsky, 1993; Weiser, 1973).

2.3. CYP3A2 assay with DFB

Assay of CYP3A2 activity with DFB was based on previously published method (Chauret et al., 1999) with minor modifications. Microsome samples (91 μl of a 0.27 mg ml^{-1} microsomal protein solution in phosphate buffer (125 mM, pH 7.4)) were added to each well of a flat-bottom 96-well polystyrene plate. The substrate DFB (2 μl of a 2.5 mM stock solution in acetonitrile) was then added to the wells. The plate was pre-incubated for 5 min in a 37°C incubator. At this point, a background fluorescence reading of the plate was performed to eliminate any interference at the selected wavelengths (excitation filter: 360/40 nm; emission filter: 460/40 nm) on the cytofluorimeter (Cytofluor 4000/TR, Perspective Biosystems, Framingham, MA). The reaction was then started by adding β -NADPH

(5 μl of a 20 mM solution in phosphate buffer). The plate was incubated for 15 min at 37°C. At the end of the incubation, oxidized glutathione (10 μl of a 100 mM solution in water) and glutathione reductase (10 μl of a 200 Uml⁻¹ solution in phosphate buffer) were added and the plate was left in the dark at room temperature for 15 min. Finally, the reaction was quenched with 120 μl of 60% acetonitrile in Tris buffer (0.05 M, pH 10) and the samples' fluorescences were read on the cytofluorimeter, as described above.

The final production of DFH was quantified with a standard curve made with pure DFH (0–10 μM in 50% Tris–acetonitrile in phosphate buffer).

2.4. Immuno-inhibition of CYP3A metabolism

CYP450 3A1 and 3A2 Supersomes™ as well as rat liver and intestinal microsomes (25 μg) were incubated (during 30 min or 16 h at room temperature) with either 5 μl of goat anti-rat CYP1A1, CYP2C11, rabbit anti-human CYP2D6, or rabbit antirat CYP3A2 in phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) in a total volume of 91 μl . Samples were subsequently assayed for DFB metabolism. Negative controls were made with either phosphate buffer alone or a non-inhibitory goat anti-rat CYP3A2 antibody. Tests were also conducted with 20 μl of antibodies instead of five to ensure that the absence of effect was not due to reduced affinity of the antibodies.

2.5. Selectivity test

Selectivity of DFB for rat CYP3A was further determined by testing the metabolic activity of various Supersomes™ preparations expressing the rat isoforms CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13, 2E1, 3A1 and 3A2. Samples of 25 or 50 µg of each Supersomes™ preparation were assayed with DFB. Resulting production of DFH was compared with a negative control made of wild-type Baculovirus-infected insect cells.

3. RESULTS

3.1. Specificity of anti-rat CYP450 antibodies

To determine if the DFB assay was specific for rat CYP3A2, we used immuno-inhibition by isoform-specific antibodies. Since many commercial antibodies are not as specific as announced by the manufacturer, we first verified the binding capacity of many antibodies by Western blot analysis with a panel of rat CYP450 Supersomes™ preparations. Antibodies from several different suppliers were tried. Results of the most specific ones are reported in Fig. 2. As shown, we found antibodies with specificity for CYP1A1 and CYP3A1/3A2. Antibody against human CYP2D6 recognized the rat CYP2D1/2D2 homologs but also has a weak affinity for CYP2C13. This antibody was also shown to inhibit rat CYP2D activity (result not shown). In the case of the CYP2C family, it has not been possible to find discriminatory antibodies. All tested antibodies against CYP2C11 also reacted against CYP2C6 and CYP2C13 and were thus defined as anti-rat CYP2C.

3.2. Liver and intestinal CYP3A DFB specificity tested by immuno-inhibition assay in Supersomes™ and microsomal incubations

The above-characterized antibodies were used to test the specificity of DFB assay for rat CYP3A. As expected, the inhibitory antibodies against CYP3A2 nearly abolished the metabolism of DFB in microsomes prepared from CYP3A1 or CYP3A2 Supersomes™ (Fig. 3). DFH production was reduced by 95% in the CYP3A

Supersomes™ confirming the high capacity of CYP3A1 and CYP3A2 to metabolise the DFB. This inhibitory effect was also observed in rat liver microsomes treated with anti-CYP3A although there was a residual DFB-metabolizing activity (less than 10%). No inhibition was observed when other antibodies or PBS were used. Furthermore, the non-inhibitory antibody against CYP3A2 induced no reduction in the DFB metabolic activity of all three microsome preparations tested. The observed inhibition is thus not a consequence of a non-specific inhibition or denaturation process.

Similarly, CYP3A activity was measured in intestinal microsomes which produced 0.30 nmol of DFH min⁻¹ mg⁻¹ of microsomal proteins. This activity was reduced by 90% when intestinal microsomes were incubated with CYP3A2-specific antibodies. No other tested antibodies significantly affected the DFB metabolic activity of intestinal microsomes. Similar results (88% inhibition for anti-3A2) were obtained with twice the amount of intestinal microsomes (results not shown).

3.3. DFB specificity testing by using Supersomes™

To further determine the specificity of the DFB for CYP3A, we used a panel of Supersomes™ containing a single rat CYP450 isoform directly in the assay. The interest of these insect cell microsomes is that they expressed no other CYP450 than the ones that have been implanted in these cells. The assay, performed with either 25 or 50 µg of each Supersomes™ preparation, revealed that all but CYP3A1 and

CYP3A2 have negligible activity (Fig. 4). In the case of CYP3A2, we found an activity of $1.38 \pm 0.02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ microsomal proteins. In the case of CYP3A1 Supersomes™, the production of DFH was slightly higher with $1.67 \pm 0.09 \text{ nmol}$ of DFH produced $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ microsomal proteins. Rat liver microsomes exhibited a mean activity of $1.26 \pm 0.05 \text{ nmol}$ of DFH produced $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ microsomal proteins.

4. DISCUSSION

The results of the present study confirm that DFB is a very specific substrate for the study of activity of rat CYP3A family both in the liver and the intestine. Beside CYP3A, of the different CYP450 isoforms tested (CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13, 2E1), no other isoform has a significant activity towards DFB.

Although DFB has been reported to be specific for CYP3A4 in humans (Chauret et al., 1999), very few studies have shown similar results for rat CYP3A isoforms. Recently, Nicoll-Griffith et al. reported that DFB was also a sensitive and specific probe for the metabolic study of liver CYP3A1 and 3A2 in the rat. The specificity of the assay was established by the inhibition of the activity by isoform-specific antibodies (Nicoll-Griffith et al., 2004). However, the specificity of the antibodies used had not been verified.

The important homologies between CYP450 isoforms of the same sub-family obviously preclude the preparation of specific antibodies for certain isoforms. However, we demonstrated that it is possible to have an anti-CYP3A2 that recognizes rat CYP3A1 and CYP3A2 (with a very faint band on CYP2C6 that is detected only by overexposure) (Fig. 2). With this antibody, we obtained a nearly complete inhibition of the DFB metabolizing activity in rat liver microsomes, suggesting that CYP3A1 and CYP3A2 are the main isoforms for the metabolism of

DFB (Fig. 3). A non-specific inhibition by interaction with other serum proteins or by denaturation/degradation could be rejected since incubation with other antibodies produced no reduction in the production of DFH (Fig. 3). In addition, the use of a goat antibody specific for CYP3A2 without inhibitory property has no effect on the production of DFH by either Supersomes™ or rat liver microsomes (Fig. 3). Our results thus confirm the previous finding that rat CYP3A metabolizes DFB (Nicoll-Griffith et al., 2004). Our results also demonstrated that only rat CYP3A1/3A2 isoforms participate in the metabolism of DFB. Even high concentration of CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13, and 2E1 Supersomes™ are totally inefficient to debenzylate DFB (Fig. 4).

In addition to being a sensitive and specific probe for liver CYP3A, we showed that DFB is also useful for the quantification of CYP3A in the intestine. Our results show that only CYP3A1 and CYP3A2 metabolize DFB in intestinal microsome (Fig. 3). This is an important finding because very few substrates are as specific and sensitive as DFB for intestinal CYP3A.

In conclusion, the DFB assay could thus be used reliably for the evaluation of rat CYP3A1/3A2 activity not only in the liver but also in the intestine. This makes of the DFB assay a powerful tool for the study of CYP3A expression and activity.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We thank Merck Frosst Canada Ltd that kindly provided the DFB and DFH that have been used for this assay as well as technical support for the adaptation of the assay.

6. REFERENCES

- Chauret, N., Tremblay, N., Lackman, R. L., Gauthier, J. Y., Silva, J. M., Marois, J., et al. (1999). Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Analytical Biochemistry*, 276, 215–226.
- Cinti, D. L., Moldeus, P., & Schenkman, J. B. (1972). Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca²⁺-sedimented microsomes from rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 21, 3249–3256.
- Fasco, M. J., Silkworth, J. B., Dunbar, D. A., & Kaminsky, L. S. (1993). Rat small intestinal cytochrome P450 probed by warfarin metabolism. *Molecular Pharmacology*, 43, 226–233.
- Kleeberg, U., & Klinger, W. (1982). Sensitive formaldehyde determination with Nash's reagent and a 'tryptophan reaction'. *Journal of Pharmacological Methods*, 8, 19–31.
- Kostrubsky, V. E., Ramachandran, V., Venkataramanan, R., Dorko, K., Esplen, J. E., Zhang, S., et al. (1999). The use of human hepatocyte cultures to study the

induction of cytochrome P-450. *Drug Metabolism and Disposition*, 27, 887–894.

Leblond, F. A., Petrucci, M., Dube, P., Bernier, G., Bonnardeaux, A., & Pichette, V. (2002). Downregulation of intestinal cytochrome P450 in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13, 1579–1585.

Nash, T. (1953). The calorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsh reaction. *The Biochemical Journal*, 55, 416–421.

Nicoll-Griffith, D. A., Chauret, N., Houle, R., Day, S. H., D'Antoni, M., & Silva, J. M. (2004). Use of a benzyloxy-substituted lactone cyclooxygenase-2 inhibitor as a selective fluorescent probe for CYP3A activity in primary cultured rat and human hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 1509–1515.

Renwick, A. B., Surry, D., Price, R. J., Lake, B. G., & Evans, D. C. (2000). Metabolism of 7-benzyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin by human hepatic cytochrome P450 isoforms. *Xenobiotica*, 30, 955–969.

Spatzenegger, M., & Jaeger, W. (1995). Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 27, 397–417.

Stresser, D. M., Turner, S. D., Blanchard, A. P., Miller, V. P., & Crespi, C. L. (2002).

Cytochrome P450 fluorometric substrates: Identification of isoformselective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4. *Drug Metabolism and Disposition*, 30, 845–852.

Wang, R. W., Newton, D. J., Scheri, T. D., & Lu, A. Y. (1997). Human cytochrome P450

3A4-catalyzed testosterone 6 beta-hydroxylation and erythromycin N-demethylation. Competition during catalysis. *Drug Metabolism and Disposition*, 25, 502–507.

Waxman, D. J. (1988). Interactions of hepatic cytochromes P-450 with steroid

hormones. Regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P-450 enzyme expression. *Biochemical Pharmacology*, 37, 71–84.

Weiser, M. M. (1973). Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein

synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 248, 2536–2541.

7. FIGURES AND LEGENDS

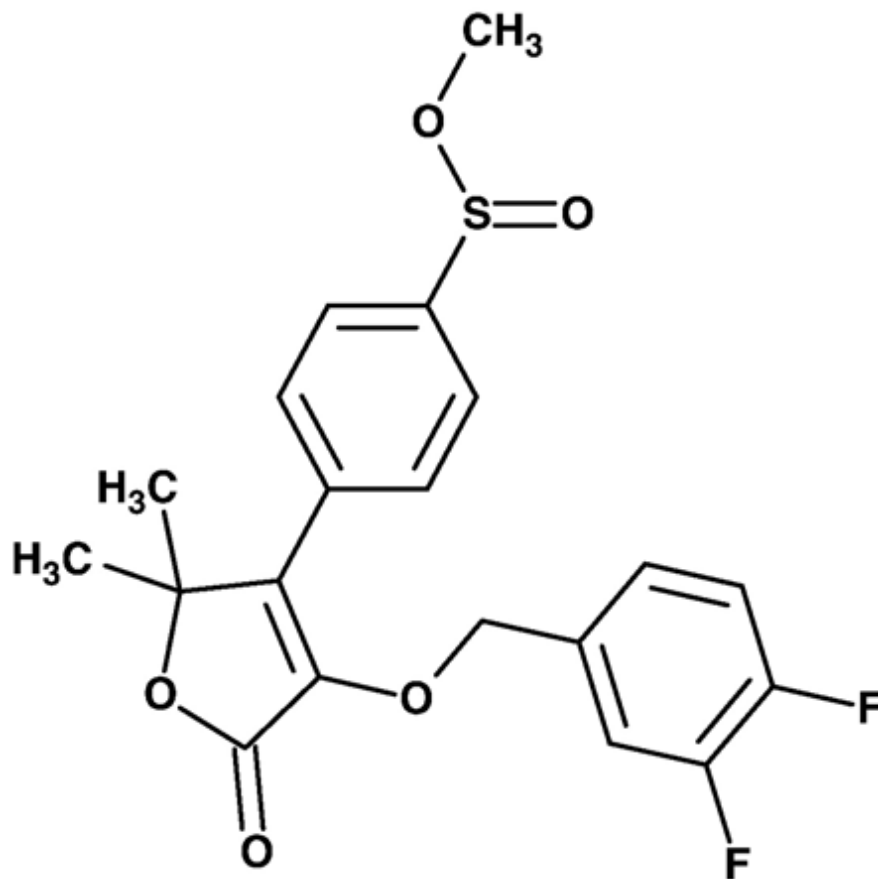


Fig. 1. Chemical structure of the substrate 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl]furan-2(5H)-one (DFB).

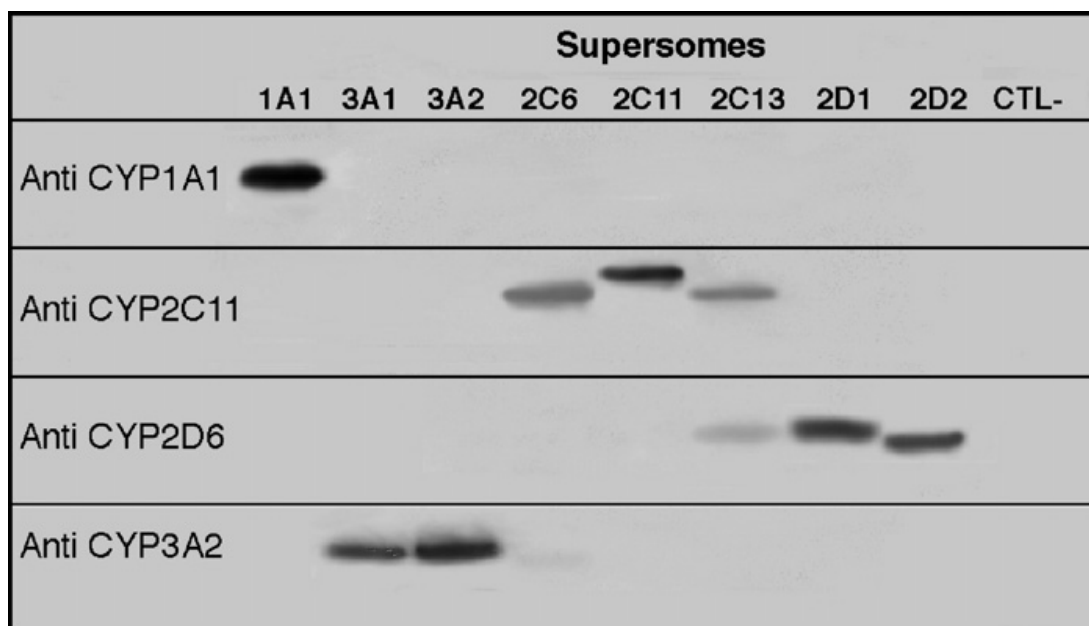


Fig. 2. Specificity of anti-rat CYP450 antibodies was tested on a panel of Baculovirus-insect cell-expressed CYP450 isoforms (Supersomes™). Western blots were performed with 25 µg of each Supersomes™ preparation. A 1:2000 dilution of each tested antibody is incubated overnight with the blot then revealed with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Chemiluminescent signal is recorded on a Fuji LAS3000 digital camera. Negative control is made of empty Baculovirus-insect cell. See Materials and methods for details on antibodies. Only retained antibodies were presented.

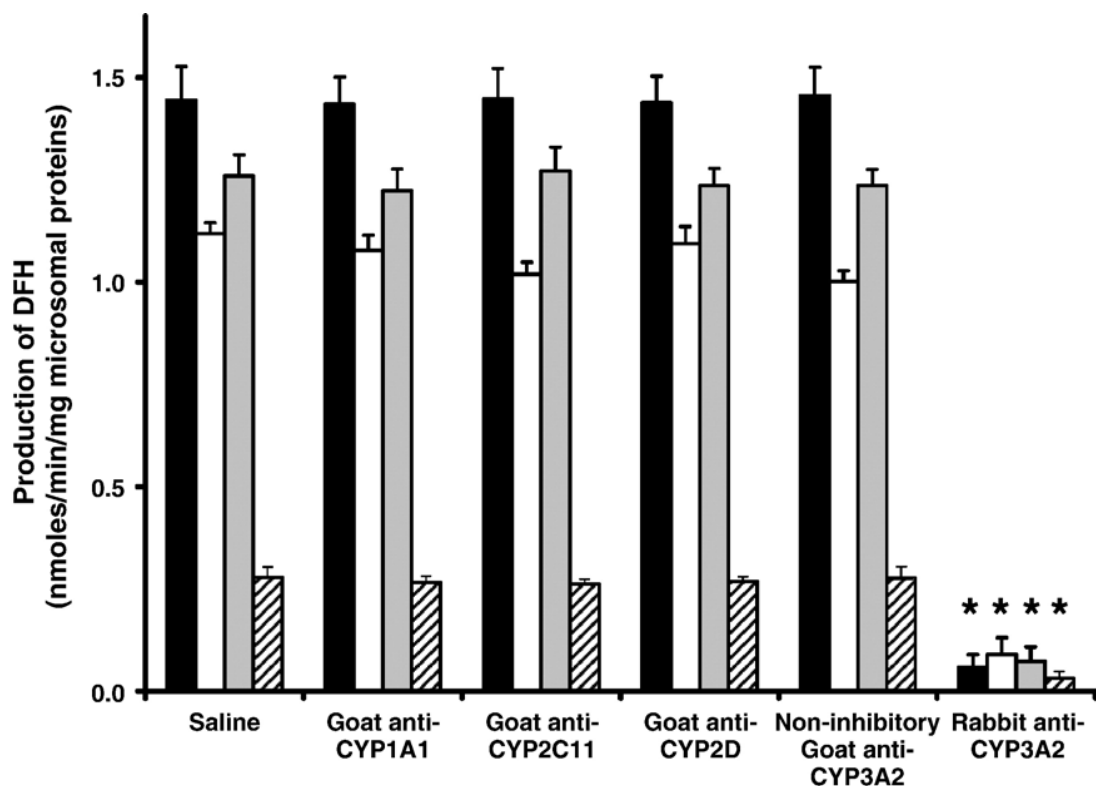


Fig. 3. Inhibition of DFB metabolism by immuno-neutralizing antibody. Sample of 25 μg of CYP3A1 Supersomes™ (black columns), CYP3A2 Supersomes™ (white columns), rat liver microsomes (grey columns), or rat intestinal microsomes (hatched bar) were first incubated with phosphate-buffered saline pH 7.4, or 5 μl of specific inhibitory antibodies against rat CYP1A1, CYP2C and human CYP2D6, a CYP3A specific goat anti-rat CYP3A2 that is not inhibitory for CYP3A activity or an inhibitory CYP3A specific rabbit anti-rat CYP3A2, during 30 min before being assayed with DFB. * $P < 0.01$ vs. sample incubated in saline.

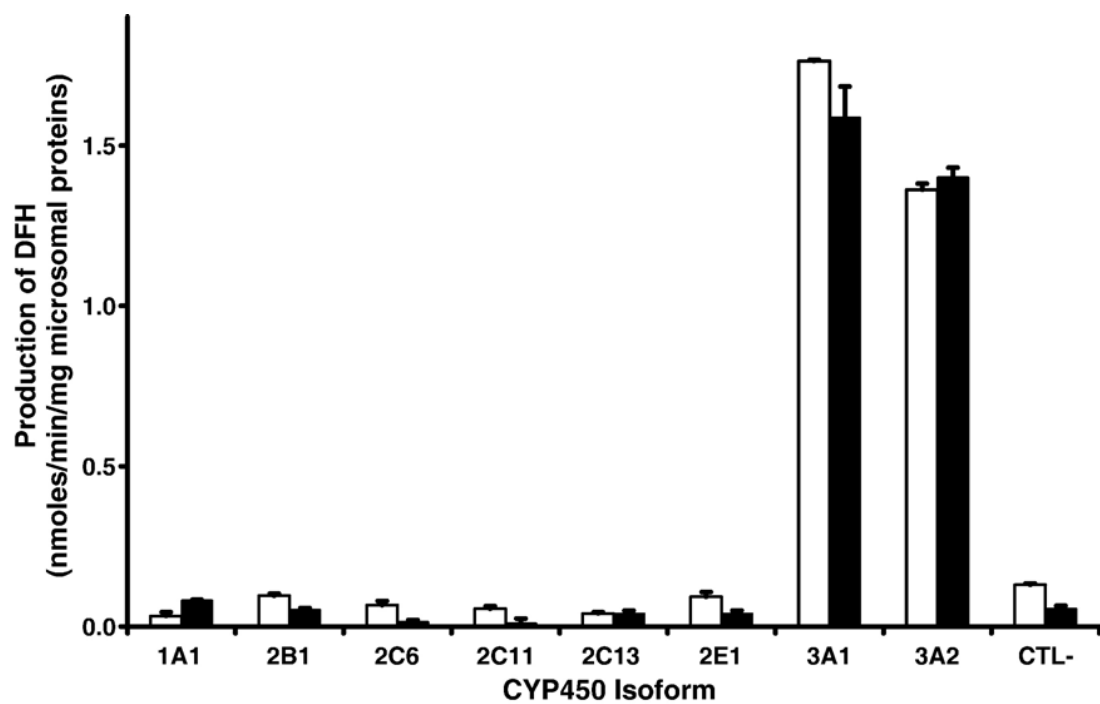


Fig. 4. Selectivity of DFB for CYP3A isoform was tested by assaying 25 µg (white bars) or 50 µg (black bars) of various Supersomes™ preparations. The negative controls were conducted with microsomes of insect cells infected with wild-type Baculovirus.

7. Article 2

Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression.

J Pharmacol Sci. 2008 Oct;108(2):157-63

Reprinted with permission from The Japanese Pharmacological Society.

Copyright © 2008 by The Japanese Pharmacological Society. All rights reserved.

EFFECT OF HEMODIALYSIS ON HEPATIC CYTOCHROME P450

FUNCTIONAL EXPRESSION

Josée Michaud^{1,2}, Thomas D. Nolin^{3,4}, Judith Naud^{1,2}, Mélina Dani^{1,2}, Jean-Philippe Lafrance¹, Francois A. Leblond^{3,4}, Jonathan Himmelfarb^{3,4}, and Vincent Pichette^{1,2,*}

¹Service de Néphrologie et Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve Rosemont, Montréal, Québec, Canada H1T 2M4

²Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Division of Nephrology and Transplantation, Department of Medicine, Maine Medical Center, Portland, ME 04102, USA

⁴Center for Clinical and Translational Research, Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, ME 04074, USA

Correspondence addressed to:

Vincent Pichette M.D. Ph.D.
Centre de recherche
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal,
Québec, Canada
H1T 2M4
Tel: (514) 252-3489
Fax: (514) 255-3026

ABSTRACT

Cytochrome P450 (CYP) functional expression is reduced in uremia and normalized after restoration of kidney function via transplantation. The aim of this study was to evaluate the effect of conventional hemodialysis on the functional expression of CYP1A, 2C, and 3A. We also investigated the role of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in CYP regulation during uremia. Primary cultures of normal rat hepatocytes were incubated with serum obtained from end-stage renal disease patients pre- and post-hemodialysis and healthy control subjects, in the presence and absence of the NF- κ B inhibitor andrographolide. Uremic pre-hemodialysis serum caused significant reductions ($P < 0.01$) in CYP1A (44%), 2C (27%), and 3A (35%) protein expression compared to control serum, while dialyzed serum (i.e., obtained immediately post-hemodialysis) had no effect. *CYP1A2*, *2C11*, and *3A2* mRNA expression, as well as CYP3A activity, were similarly impacted by uremic serum and were improved to >80% of control values after hemodialysis. NF- κ B inhibition nearly eliminated the effect of uremic serum on CYP functional expression. This is the first study to demonstrate that conventional hemodialysis acutely improves altered CYP functional expression observed in rat hepatocytes incubated with uremic human serum.

Keywords: hemodialysis, end-stage renal disease, cytochrome P450, gene expression, drug metabolism

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD), including end-stage renal disease (ESRD), alters the renal clearance (i.e. glomerular filtration) and consequently the pharmacokinetic disposition of drugs, and recent compelling data indicate that alterations in non-renal drug clearance (i.e., metabolism and transport) also occur (1 – 3). Non-renal clearance of drugs consists largely of hepatic metabolism mediated by cytochrome P450 (CYP) enzymes, considered the most significant contributors to drug metabolism in vivo, since they are responsible for the biotransformation of up to 60% – 80% of drugs currently marketed that undergo oxidative metabolism (4).

Several studies have demonstrated modifications in the functional expression of CYP enzymes in experimental models of uremia (1, 5 – 8), and various uremic by products (e.g., “uremic toxins”) have been implicated, including urea, parathyroid hormone, and indoxyl sulfate. However, CYP regulation has not been well studied in chronically uremic ESRD patients undergoing hemodialysis (HD). Decreased activities of CYP2C9 (9) and CYP3A4 (10) have been reported in uremic patients, which could have significant clinical implications since numerous CYP2C9 and 3A4 substrates are frequently prescribed to these patients.

Restoration of kidney function after transplantation leads to a sustained improvement in the uremic state and in hepatic drug metabolism (1, 11). On the

other hand, HD therapy only temporarily improves uremia and does not appear to generate long-term improvements in CYP expression (i.e., pre-HD) (1); moreover, HD results in short-term improvements in the erythromycin breath test (i.e., pre- versus post-HD), which has been interpreted as reflecting hepatic CYP3A4 activity (12). The latter finding implicates one or more rapidly acting, dialyzable uremic toxins, and the acuity of the response suggests that hemodialysis-induced improvements in erythromycin breath test (EBT) results occur independently of transcriptional or translational modification, but the acute effect of HD on CYP expression has not been assessed to date. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effect of conventional hemodialysis on the functional expression of CYPs by incubating primary cultures of normal rat hepatocytes with serum obtained from ESRD patients (pre- and post-HD) and healthy control subjects. Furthermore, we also evaluated the role of nuclear factor- κ B in CYPs downregulation induced by uremic serum since this transcriptional factor was shown to have a key role in regulation of CYP expression in uremia and inflammation (13, 14).

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

This study was approved by the Université de Montreal and Maine Medical Center Institutional Review Boards. The sera from twelve ESRD patients undergoing chronic maintenance HD were obtained after providing written informed consent, and their characteristics are presented in Table 1. Control sera were obtained from healthy volunteers. Eligibility criteria included age ≥ 18 years, normal hepatic function, and non-smoking. All ESRD patients were receiving HD therapy for at least one month in duration, and they underwent HD for 4 h with a high-flux polysulfone membrane and blood flow rates between 350 – 450 mL/min. Subjects taking drugs known to inhibit or induce CYPs or with evidence of an active infection were excluded. Blood samples were obtained immediately pre- and post-HD in ESRD patients, kept on ice, and centrifuged 10 min after collection at $600 \times g$ for 10 min. Serum was harvested and stored at -80°C until experimentation.

Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Saint- Charles, Quebec, Canada) weighing 200 – 300 g were housed in the Research Centre animal care facility and maintained on a Harlan Teklad rodent diet (Harlan Teklad Global Diets, Montreal, Quebec, Canada) and water ad libitum. An acclimatization period of at least 3 days was allowed before any experimental work was undertaken. All of the experiments

were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals and under the supervision of our local animal care committee.

Hepatocyte isolation and culture

Hepatocytes were isolated from normal rats according to the two-step liver perfusion method of Seglen as previously published (7). Collagenase type 4 (Worthington, Lakewood, NJ, USA) was used. After preincubating the hepatocytes for 2 h in William's E medium containing 10% calf serum, the medium was changed for 2 mL of William's E medium containing 10% serum obtained pre-HD, post-HD, or from control subjects. Serum from each subject was treated separately in every experiment and was counted as one replicate. Each serum was tested on at least three different hepatocytes preparations. The number of cells used for each assay is 1.5×10^6 for protein assay, 3.0×10^6 for mRNA, and 4.5×10^6 for activity. The hepatocytes were incubated for another 24 h and then harvested by scraping in phosphate buffered saline. For mRNA analysis, cells were harvested in RLT buffer (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Samples were stored at -80°C until assayed.

Inhibition of nuclear factor- κB (NF- κB)

To assess whether the blockade of the NF- κB signaling pathway could modify the effect of uremic serum, normal hepatocytes were incubated for 24 h in the

presence of 30 μ M andrographolide (Calbiochem, San Diego, CA, USA), a specific NF- κ B inhibitor, with uremic or control serum.

Western blot analysis

Although several CYP isoforms are implicated in the metabolism of drugs, only CYP1A2, 2C11, and 3A2, the more abundant isoforms in the rat liver and most affected by uremia (6), were assessed via Western blotting as described previously (6). Briefly, CYP was detected using polyclonal goat anti-rat 1A1, goat anti-rat 2C11, and rabbit anti-rat 3A2 (Gentest Corporation, Woburn, MA, USA). β -Actin was detected using a mouse anti-chicken β -Actin (Neo-Markers, Fremont, CA, USA). Immune complexes were revealed by secondary antibodies (swine anti-goat IgG or swine antirabbit IgG coupled to peroxidase from Biosource International or Goat anti-mouse IgG coupled to peroxidase from Sigma) and the Luminol derivative of Lumi-Light Western blotting substrate (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Immune reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry on a LAS-3000 LCD camera (Fuji, Stamford, CT, USA) coupled to MultiGauge software (Fuji).

RNA isolation and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis

RNA was extracted from hepatocytes with the Rneasy Mini Kit from Qiagen. One microgram of total RNA was used to prepare cDNA by reverse transcription using the Omniscript RT kit from Qiagen and random primer from Invitrogen

(Burlington, Ontario, Canada). Quantitative PCR analysis was performed using Platinum SYBR green qPCR (Invitrogen) on an iCycler real-time detection system (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). Specific primer sets were designed for each of the four tested mRNA (*1A2*, *2C11*, *3A2*, and *GAPDH*) on the basis of published cDNA sequences with the aid of the Jellyfish computer program (LabVelocity Inc., Los Angeles, CA, USA). All primers were obtained from Sigma and their specificity was confirmed by sequencing the resulting PCR product on an ABI Prism 3100 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Used PCR conditions were optimized to 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The differences in specific mRNA expression were calculated using the delta Ct method (21).

Evaluation of CYP3A activity

In order to evaluate the metabolic activity of CYP3A in hepatocytes incubated with serum from ESRD patients or controls, a selective fluorescent probe, 3-[(3,4- difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl) phenyl]furan-2(5H)-one (DFB), that is specifically metabolized by rat CYP3A was used as previously reported (15). The substrate was added directly to the culture after removal of the culture media and replacement by Krebs buffer containing 12.5 mM HEPES for 30 min. The fluorescence of the metabolite 3-hydroxy-5,5-dimethyl-4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]furan-2(5H)-one (DFH) was read on a cytofluorometer (Cytofluor 4000/TR; Perspective Biosystems, Framingham, MA, USA) using appropriate wavelengths (excitation filter: 360/40 nm and emission filter: 460/40

nm). The standard curve was prepared with known dilutions of DFH. DFB and DFH were provided by Merck Frost (Kirkland, Quebec, Canada).

Blood chemistries

Blood chemistries (urea, creatinine) were determined with a Hitachi 717 autoanalyser (Roche Diagnostics).

Statistical analyses

The results are each expressed as the mean \pm S.E.M. Differences between groups were assessed by using an unpaired two-sided Student's t-test or an ANOVA test. Significant ANOVA was followed by a post-hoc Scheffe analysis. A P value of <0.05 was considered statistically significant for all comparisons.

RESULTS

CYP expression

As shown in Fig. 1, there was a significant decrease in CYP1A (44%), 2C (27%), and 3A (35%) protein expression in hepatocytes incubated with uremic pre-HD serum compared to control serum, while serum obtained immediately post-HD had no effect on CYP protein expression. CYP mRNA expression was similarly impacted by uremic serum (Fig. 2). Specifically, mRNA expression of CYP1A2, 2C11, and 3A2 was reduced by 50%, 34%, and 40%, respectively, in hepatocytes incubated with pre-HD serum and was improved but not completely normalized in hepatocytes incubated with post-HD serum.

CYP3A activity

CYP3A activity was decreased by 40% in hepatocytes incubated with uremic pre-HD serum compared to control serum (Fig. 3), and similar to mRNA expression, it was improved but not completely normalized by hemodialysis.

Effect of NF- κ B inhibition on CYP3A and CYP2C

As depicted in Fig. 4, the decrease in CYP3A protein (A) and gene expression (B) by pre-HD serum were prevented by the addition of andrographolide to hepatocyte culture media. Similar results were obtained with CYP2C protein (C) and gene expression (D).

DISCUSSION

This study demonstrates that incubation of primary cultures of normal rat hepatocytes with serum from ESRD patients results in altered functional expression of CYP1A, 2C, and 3A, which is obviated by conventional hemodialysis. CYP protein expression was completely normalized, and mRNA expression was significantly improved to more than 80% of control values after incubation with post-HD serum. We have previously reported similar modifications in the functional expression of CYP enzymes in experimental models of uremia (5 – 7), as well as in ESRD patients, by incubating rat hepatocytes with serum obtained immediately pre-HD (1). However, this is the first study to demonstrate the near normalization of CYP functional expression in hepatocytes when serum is obtained after a hemodialysis session. Although restoration of kidney function after transplantation leads to a sustained improvement in the uremic state and in hepatic drug metabolism (11), HD therapy only temporarily improves uremia and does not appear to generate long-term improvements in CYP expression, that is, the inhibitory effect of pre-HD serum on hepatic CYP expression persists despite undergoing chronic maintenance HD (1).

The underlying cause(s) of altered CYP functional expression observed in kidney disease is unclear, but numerous studies indicate that uremic toxins (e.g., urea, parathyroid hormone, indoxyl sulfate, cytokines) may play a role via

transcriptional or translational modifications in CYP enzymes (1, 7, 8, 13). For example, we have shown that in normal hepatocytes incubated with uremic serum from rats or patients, the total level and protein expression of several CYP isoforms decreased up to 45% compared with serum from control animals secondary to reduced mRNA expression (1, 7). Moreover, we recently reported that the uremic toxin parathyroid hormone (PTH) was a major factor in the downregulation of liver CYPs observed in experimental models of ESRD (13). In the present study, we demonstrated that NF- κ B is a key transcriptional factor in the downregulation of CYPs caused by uremic serum since NF- κ B inhibition nearly eliminated the effect of pre-HD serum on CYP expression. These results implicate potential uremic mediators such as PTH and cytokines since these proteins act via NF- κ B signaling pathways (13, 16).

Interestingly, changes in the metabolic clearance of CYP substrates that cannot be explained by transcriptional or translational modifications have also been reported. Specifically, the abilities of uremic blood and, similarly, improvement in the uremic milieu to induce acute, post-translational modifications in CYP function have been demonstrated. In a classic experiment conducted over 20 years ago, Terao and Shen used an isolated rat liver perfusion model to assess changes in the intrinsic hepatic clearance of the CYP2D6 substrate propranolol (17). Perfusion of normal liver with uremic blood obtained from uremic rats (induced by uranyl nitrate) resulted in more than a 50% decrease in the clearance of propranolol

compared to the control (normal liver perfused with normal blood); the reduced clearance was nearly identical to that observed when uremic liver (i.e., liver from uremic rats) was perfused with uremic blood. Furthermore, perfusion of uremic liver with normal blood restored the clearance of propranolol to values nearly identical to that observed in controls. This suggests that CYP2D6-mediated metabolism of propranolol is not downregulated in uremia. Similarly, the metabolism of losartan, an angiotensin II– receptor antagonist and substrate of CYP2C9 and CYP3A4, in hepatic microsomes prepared from rats in two different experimental models of uremia (ureteral ligation or uranyl nitrate) was not different than in normal microsomes (18). However, losartan metabolism in normal microsomes was reduced by nearly 50% in the presence of uremic serum obtained from uremic rats. Losartan metabolism was decreased by about 30% in the presence of the uremic toxin indoxyl sulfate alone (18). In another experiment, incubation of normal human hepatic microsomes with the CYP3A4 substrate midazolam in the presence of uremic human plasma resulted in an 80% reduction in CYP3A4 activity compared to the control (19). Lastly, hepatic intrinsic clearance of the CYP3A4 substrate erythromycin has been shown to be acutely improved by hemodialysis in patients with ESRD (i.e., pre- versus post-HD) (12). Collectively, these data suggest that modifications in CYP activity may occur independently of transcriptional or translational modification. That is, rapid fluctuations in the concentrations of uremic toxins may acutely alter CYP metabolic activity in the setting of ESRD and hemodialysis.

One explanation for these findings may be that chronic exposure to elevated concentrations of dialyzable uremic toxins may result in transcriptionally or translationally mediated alterations in CYP functional expression in vivo, despite brief reductions in the concentrations post-HD. If HD led to sustained reductions in uremic toxin concentrations similar to transplantation, it is possible that sufficient time would elapse to allow normalization of CYP functional expression via transcriptional or translational mechanisms. Moreover, conventional hemodialysis rapidly and efficiently removes low molecular weight solutes, many of which are known uremic toxins. It is plausible that isolation of post-HD serum, which has been transiently depleted of uremic toxins for hepatocyte incubation leads to an improvement in the functional expression of CYPs in vitro that does not translate to a corresponding improvement in vivo. The invasiveness and technical difficulty associated with obtaining human hepatic tissue precluded our ability to directly assess hepatic CYP expression in our patients.

Recently, Sun et al. reported decreased erythromycin uptake by hepatocytes incubated with the uremic toxin 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid (CMPF) via a decrease in organic anion-transporting polypeptide 2 (OATP2) protein expression and activity (8). Similarly, we recently demonstrated decreased OATP2 protein expression in uremic rats as well as in hepatocytes incubated with uremic serum (2). OATP uptake, the first step in the elimination of many xenobiotics, exposes compounds to detoxification enzymes (3, 20). Therefore, OATP

downregulation may explain part of the decrease in drug elimination by the liver, as suggested previously (3, 8). These findings may explain why some studies have reported decreased drug metabolism in experimental models of kidney disease without transcriptional or translational modification of CYPs.

In conclusion, this is the first study to demonstrate that conventional hemodialysis acutely improves the altered functional expression of CYP1A, 2C, and 3A observed in rat hepatocytes incubated with uremic human serum. The data presented here corroborates previous work indicating that HD results in short-term improvements in the intrinsic clearance of the CYP3A4 substrate erythromycin (i.e., pre- versus post-HD) (12); further implicates one or more rapidly acting, dialyzable uremic toxins; and provides mechanistic insight into reports of altered CYP function in humans with ESRD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Vincent Pichette is a scholar of the FRSQ, and Josée Michaud and Judith Naud are fellows of the FRSQ. This work was presented in part at the 2007 Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics (Abstract: Clin Pharmacol Ther. 2007;81 Suppl 1:S54).

REFERENCES

1. Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, et al. Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol*. 2005;144:1067–1077.
2. Naud J, Michaud J, Leblond FA, Lefrancois S, Bonnardeaux A, Pichette V. Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug Metab Dispos*. 2008;36:124–128.
3. Sun H, Frassetto L, Benet LZ. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther*. 2006;109:1–11.
4. Nolin TD, Frye RF, Matzke GR. Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003;42:906–925.
5. Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP, Pichette V. Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos*. 2000;28:1317–1320.
6. Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, Pichette V. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:326–332.

7. Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol.* 2002;137:1039–1046.
8. Sun H, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ. Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:1239–1246.
9. Dreisbach AW, Japa S, Gebrekal AB, Mowry SE, Lertora JJ, Kamath BL, et al. Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:475–477.
10. 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.
11. Kim YG, Shin JG, Shin SG, Jang IJ, Kim S, Lee JS, et al. Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther.* 1993;54:612–620.

12. Nolin TD, Appiah K, Kendrick SA, Le P, McMonagle E, Himmelfarb J. Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2363–2367.
13. Michaud J, Naud J, Chouinard J, Desy F, Leblond FA, Desbiens K. Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:3041–3048.
14. Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y. Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 2001;276:39638–39644.
15. Michaud J, Leblond FA, Naud J, Boisvert C, Desbiens K, Nicoll-Griffith DA, et al. Use of a fluorescent substrate for the selective quantification of rat CYP3A in the liver and the intestine. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2007;55:209–213.
16. Guillen C, Martinez P, de Gortazar AR, Martinez ME, Esbrit P. Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 2002;277:28109–28117.

17. Terao N, Shen DD. Reduced extraction of l-propranolol by perfused rat liver in the presence of uremic blood. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;233:277–284.
18. Yoshitani T, Yagi H, Inotsume N, Yasuhara M. Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats. *Biol Pharm Bull.* 2002;25:1077–1083.
19. Taburet AM, Vincent I, Perello L, Coret B, Baune B, Furlan V. Impairment of drug biotransformation in renal disease an in vitro model. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;59:136.
20. Yamazaki M, Akiyama S, Nishigaki R, Sugiyama Y. Uptake is the rate-limiting step in the overall hepatic elimination of pravastatin at steady-state in rats. *Pharm Res.* 1996;13:1559–1564.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.

FIGURES, TABLES AND LEGENDS

Table 1 : Demographic characteristics of ESRD patients

Subject	Etiology of ESRD	Gender	Age (years)
1	HTN	M	69
2	DM	M	74
3	I	F	69
4	DM	M	47
5	PCKD	F	54
6	DM	F	38
7	HTN	F	63
8	DM	F	75
9	DM	M	58
10	HTN	F	80
11	PCKD	M	69
12	HTN	M	65

ESRD, end-stage renal disease; HTN, hypertension; DM, diabetes mellitus; I, ischemic; PCKD, polycystic kidney disease.

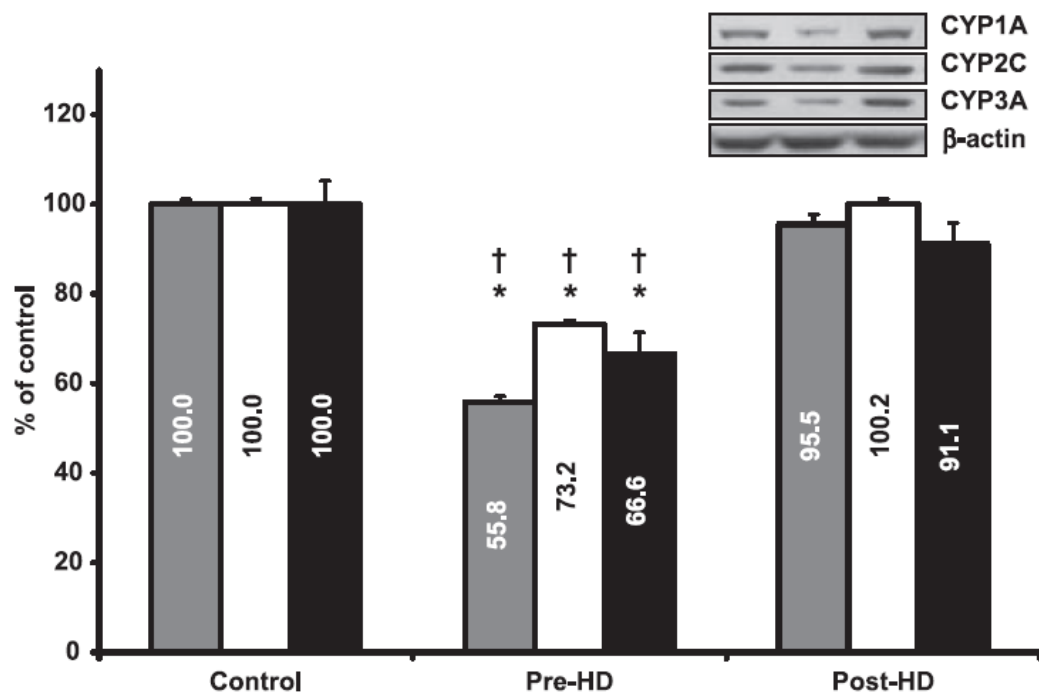


Fig. 1. Effect of hemodialysis on downregulation of protein expression of cytochrome P450 induced by uremic serum. Protein expression of CYP1A (grey bar), 2C (white bar), and 3A (black bar) in normal hepatocytes incubated for 24 h with 10% control, pre-HD, and post-HD human sera. Results of samples incubated with control sera were defined as 100%. Data are each the mean \pm S.E.M. of 12 patients' sera in each group. Sera were assayed on five hepatocyte preparations. Representative blots are shown in the insert. * $P < 0.01$, compared to the control group; † $P < 0.01$, compared to the post-HD group.

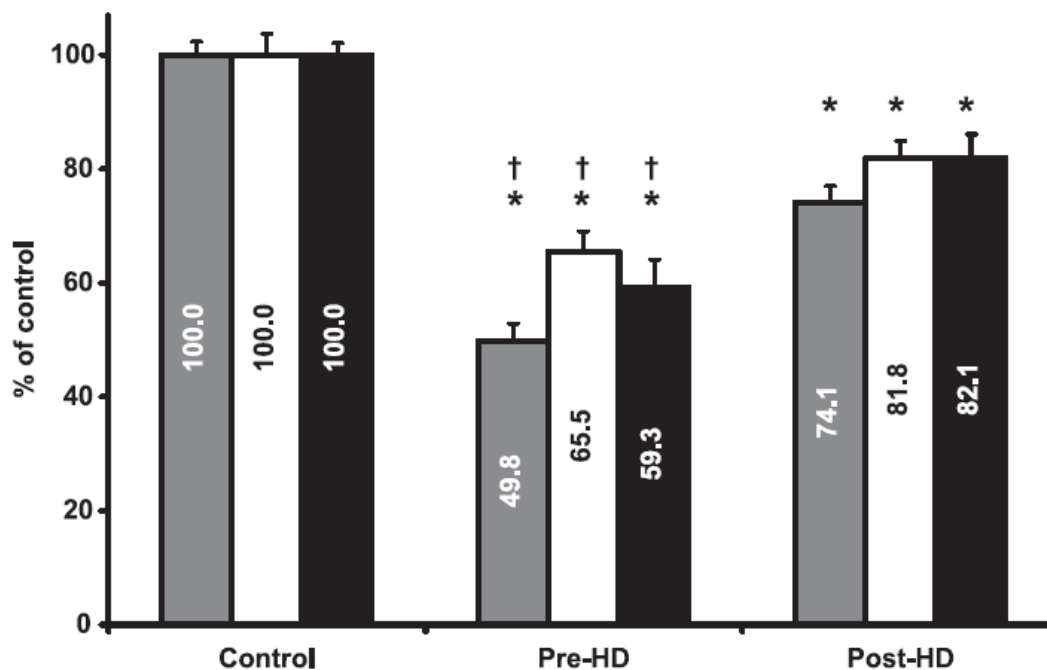


Fig. 2. Effect of hemodialysis on downregulation of mRNA of cytochrome P450 induced by uremic serum. mRNA of CYP1A2 (grey bar), 2C11 (white bar), and 3A2 (black bar) in normal hepatocytes incubated for 24 h with control, pre-HD, and post-HD human sera. Results of samples incubated with control sera were defined as 100%. Data are each the mean \pm S.E.M. of 12 patients' sera in each group. Sera were assayed on five hepatocyte preparations. * $P < 0.01$, compared to control group; † $P < 0.01$, compared to the post-HD group.

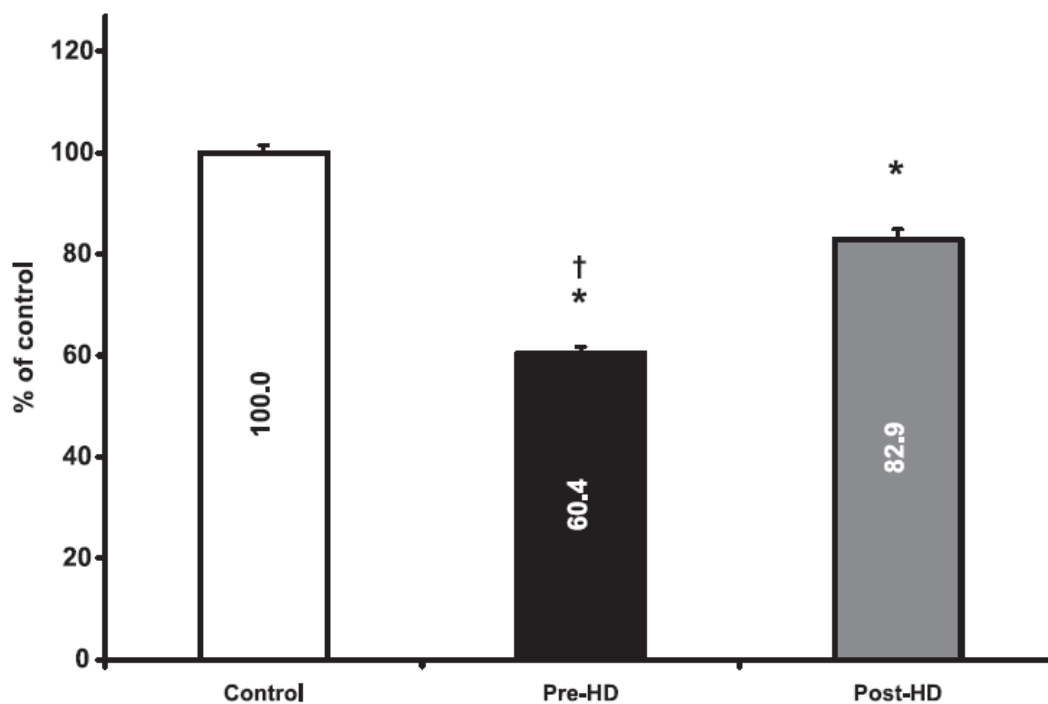


Fig. 3. Effect of hemodialysis on downregulation of CYP3A activity induced by uremic serum. CYP3A activity was measured using DFB as the specific substrate in normal rat hepatocytes incubated for 24 h with control (white bar), pre-HD (black bar), and post-HD (grey bar) human sera. Results of samples incubated with control sera were defined as 100%. Data are each the mean \pm S.E.M. of 12 patients' sera in each group. Sera were assayed on three hepatocyte preparations. * $P < 0.01$, compared to the control group; † $P < 0.01$, compared to the post-HD group.

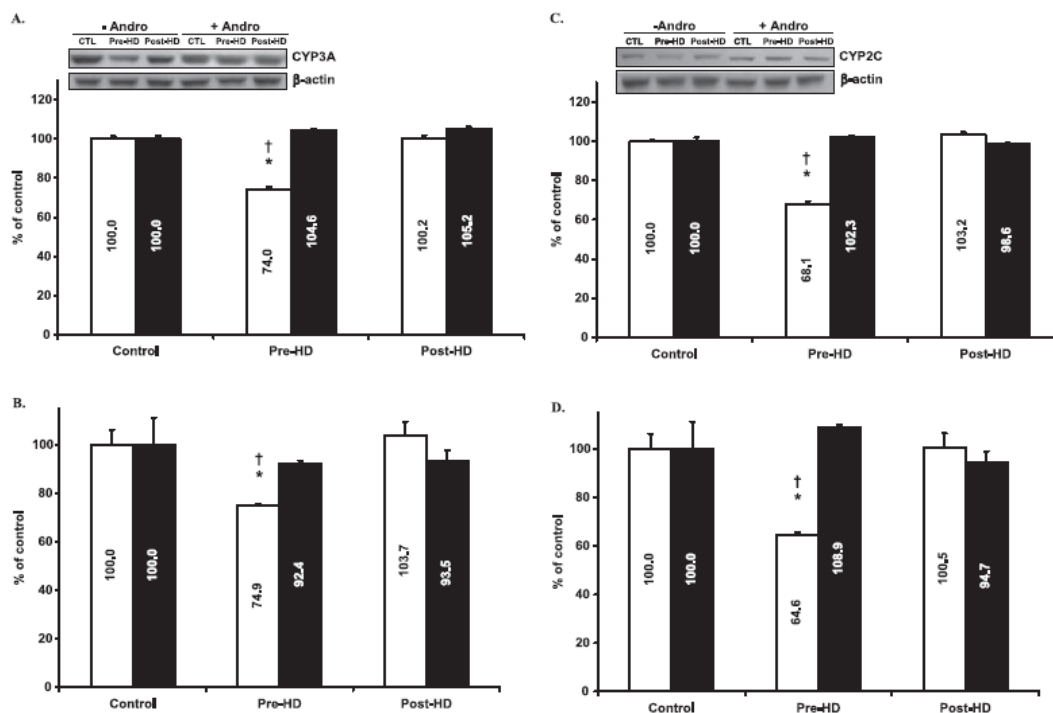


Fig. 4. Effect of NF- κ B inhibition by andrographolide on the downregulation of cytochrome P450 by uremic serum. CYP3A protein (A), CYP3A2 mRNA expression (B), CYP2C protein (C), and CYP2C11 mRNA expression (D) in normal hepatocytes incubated for 24 h with control, pre-HD, and post-HD human sera with (black bar) or without (white bar) andrographolide. For each condition, results of samples incubated with control sera were defined as 100%. Data are each the mean \pm S.E.M. of 3 patients' sera in each group. Sera were assayed on two hepatocyte preparations. Representative blots are shown in the insert. * $P < 0.01$, compared to the control group; † $P < 0.01$, compared to the post-HD group.

8. Article 3

Reduced hepatic synthesis of calcidiol in uremia.

J Am Soc Nephrol. 2010 Sep;21(9):1488-97.

Reprinted with permission from the American Society of Nephrology.

Copyright © 2010 by the American Society of Nephrology. All rights reserved.

REDUCED HEPATIC SYNTHESIS OF CALCIDIOL IN UREMIA

Josée Michaud,*† Judith Naud,*† Denis Ouimet,* Christian Demers,‡ Jean-Luc

Petit,‡ Francois A. Leblond,* Alain Bonnardeaux,* Marielle Gascon-Barré ,†‡ and

Vincent Pichette*†

*Service de Néphrologie et Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada;

†Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

‡Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital St-Luc, Montréal, Québec, Canada

Correspondence addressed to:

Vincent Pichette M.D. Ph.D.
Centre de recherche
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal,
Québec, Canada
H1T 2M4
Tel: (514) 252-3489
Fax: (514) 255-3026

ABSTRACT

Calcidiol insufficiency is highly prevalent in chronic kidney disease (CKD), but the reasons for this are incompletely understood. CKD associates with a decrease in liver cytochrome P450 (CYP450) enzymes, and specific CYP450 isoforms mediate vitamin D₃ C-25-hydroxylation, which forms calcidiol. Abnormal levels of parathyroid hormone (PTH), which also modulates liver CYP450, could also contribute to the decrease in liver CYP450 associated with CKD. Here, we evaluated the effects of PTH and uremia on liver CYP450 isoforms involved in calcidiol synthesis in rats. Uremic rats had 52% lower concentrations of serum calcidiol than control rats ($P < 0.002$). Compared with controls, uremic rats produced 71% less calcidiol and 48% less calcitriol after the administration of vitamin D₃ or 1 α -hydroxyvitamin D₃, respectively, suggesting impaired C-25-hydroxylation of vitamin D₃. Furthermore, uremia associated with a reduction of liver CYP2C11, 2J3, 3A2, and 27A1. Parathyroidectomy prevented the uremia-associated decreases in calcidiol and liver CYP450 isoforms. In conclusion, these data suggest that uremia decreases calcidiol synthesis secondary to a PTH-mediated reduction in liver CYP450 isoforms.

INTRODUCTION

It has been known for decades that chronic renal failure (CRF) is associated with low serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [calcitriol, or 1,25(OH)₂D₃], the active metabolite of vitamin D₃, because of a reduction in renal 1 α -hydroxylase (CYP27B1). More recently, 25-hydroxyvitamin D₃ [calcidiol, or 25(OH)D₃] deficiency has also been demonstrated in patients with stages 3 and 4 chronic kidney disease (CKD) and in patients who are on dialysis.¹⁻⁸ In fact, low serum 25(OH)D₃ is so intimately associated with CRF that in one study, only 29 and 17% of patients with stages 3 and 4 CKD, respectively, had sufficient levels [defined as a serum 25(OH)D₃ concentrations >75 nmol/L or 30 ng/ml].² A more recent study showed a prevalence of calcidiol insufficiency and deficiency as high as 98% in predialysis patients with a mean GFR of 18.3 ml/min.⁴ Prevalence of low serum 25(OH)D₃ was 78 and 89% in two large cohorts of hemodialysis patients^{9,10} and 87% in a large cohort of peritoneal dialysis patients.¹¹

The metabolic consequences of calcidiol deficiency are important, because low levels of 25(OH)D₃ might contribute to low levels of 1,25(OH)₂D₃ and to secondary hyperparathyroidism.¹⁻⁸ Moreover, in addition to its role in bone metabolism, there is increasing evidence that vitamin D₃ is involved in the prevention of many chronic diseases, such as type 1 diabetes, hypertension, cardiovascular diseases, and cancer.^{8,9,12-14} As a consequence, according to the 2003

Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) guidelines, calcidiol levels should be measured in patients with CKD, and deficiency should be treated with ergocalciferol (vitamin D₂) or cholecalciferol (vitamin D₃)⁵; however, a paucity of information exists concerning the effect of treatment of vitamin D₃ insufficiency in CRF on the frequency and severity of secondary hyperparathyroidism among patients with decreased 25(OH)D₃ concentrations. Furthermore, the efficacy of vitamin D₃ therapy on serum calcidiol levels of patients who experience kidney failure is variable and remains poor compared with patients without CKD.^{1-7,15-18}

More important, the mechanisms underlying calcidiol deficiency remain poorly understood. Lower diet intake and reduced sun exposure have been proposed but never demonstrated.^{1,2,4,6,7} Vitamin D₃ is normally synthesized in the skin under the influence of sunlight or taken orally as a vitamin supplement. It is hydroxylated in the liver to 25(OH)D₃, then hydroxylated in the kidney to form 1,25(OH)₂D₃, the most bioactive form of the vitamin (Figure 1). Both calcitriol and calcidiol are degraded in part by a C-24-hydroxylation achieved by a ubiquitous 24-hydroxylase.^{19,20}

The enzymes responsible for the C-25-hydroxylation of vitamin D₃ in rats are liver cytochrome P450 (CYP450) isoforms, namely CYP2C11, 2J3, 2R1, 3A2, and 27A1.²¹⁻²⁶ Several studies have shown that in rats with CRF, total hepatic CYP450 content as well as the in vitro activity and expression of several liver CYP450

isoforms (mainly CYP2C11, 3A1, and 3A2) are decreased by >50%.²⁷⁻³² More recently, we showed that this decrease in hepatic CYP450 may be explained by the presence of serum uremic factors that accumulate in CRF serum^{33,34} and that parathyroid hormone (PTH) is a major mediator implicated in the downregulation of liver CYP450 and other liver drug-metabolizing enzymes.^{35,36}

Hence, an attractive hypothesis to explain the decreased synthesis of calcidiol in CRF is that uremic toxins and, more specific, elevated PTH could downregulate liver CYP450 isoforms implicated in the C-25-hydroxylation of vitamin D₃ (Figure 1). Indirect evidence supporting such a hypothesis is that low serum levels of 25(OH)D₃ have also been reported in primary hyperparathyroidism and found to be corrected by parathyroidectomy (PTX).³⁷ The objectives of this study were to determine (1) the effect of CRF on calcidiol levels in rats, (2) the ability of CRF rats to C-25-hydroxylate vitamin D₃ after administration of vitamin D₃ or 1 α -hydroxyvitamin D₃, (3) the role of liver CYP450 downregulation in calcidiol deficiency in CRF, and (4) the potential role of secondary hyperparathyroidism in calcidiol synthesis in rats with CRF.

CONCISE METHODS

Experimental Model

All experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals and under the supervision of our local animal care committee. Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Saint-Constant, Québec, Canada) that weighed 176 to 225 g were housed in the Research Centre animal care facility and maintained on Harlan Teklad rodent diet (Harlan Teklad Global Diet, Montréal, Québec, Canada) and water. An acclimatization period of at least 7 days was instituted before any experimental work was undertaken.

CRF was induced by a two-stage 5/6 nephrectomy protocol as described previously.³² Control rats underwent two sham laparotomies (days 1 and 8) and were pair-fed with a quantity of rat food similar to that ingested by rats with CRF on the previous day. On day 41 after surgery, rats were housed in metabolic cages and urine was collected for 24 hours for determination of the clearance of creatinine. When rats were killed, tissue and blood samples were collected. Biopsies were stored at -80°C up to analysis.

On day 42, rats were either killed by decapitation or injected with vitamin D₃ (250 µg/kg) or 1α-hydroxyvitamin D₃ (1.2 nmol/kg). Vitamin D₃ (Sigma, St. Louis,

MO) was prepared in 95% ethanol and dissolved in saline:propylene glycol:ethanol (20:65:15). A maximum of 200 μ l was injected intravenously via tail veins. Blood samples were collected before the injection and 48 hours later, when rats were killed. 1α -hydroxyvitamin D₃ (Leo Pharma, Thornhill, Ontario, Canada) was diluted in sterile saline and injected intravenously via tail veins. Blood samples were collected before injection and 3 hours later (when killed).

PTX was performed as previously reported,^{35,52} 7 days before the first step of the 5/6 nephrectomy protocol. To avoid hypocalcemia, rats were supplemented in calcium by addition of calcium gluconate in drinking water (2.5% for rats with CRF and 5% for control rats). Control rats were subjected to a neck sham surgery.

Hepatocyte Isolation and Culture

Normal rat hepatocytes were isolated according to the two-step liver perfusion method as previously reported,³³ with slight modifications: Cells were incubated in HAM/F12, 10% FBS, and 10,000 U/ml Pen-Strep. After preincubation (2 hours), the medium was changed for a 24-hour conditioning period. Cells were then conditioned by serum deprivation for 24 hours by incubation in HAM/F12 and Pen-Strep, containing growth factors (EGF [20 μ g/ml], insulin:transferrin:selenium [25 mg:25 mg:25 μ g/ml], prostaglandin E₂ [100 μ g/ml], hydrocortisone [5 mg/ml], thyroxine [4 mg/ml], IFN- γ [10,000 U/ml], and nonessential amino acids). Preconditioned cells were then incubated for 24 h with 10% serum from CRF or

control rats with or without 20 nmol/ml vitamin D₃. Supernatants were recovered and were stored at -80°C until 25(OH)D₃ assay. All reagents were provided by Sigma Chemical Co.

PTH Infusion

Mini osmotic pumps (1003D; Alzet, Cupertino, CA) were implanted in the jugular vein for a period of 48 hours. Pumps were filled with 0.06 nmol/kg per h rat PTH (1-34) (Bachem, Torrance, CA) in 2% Cysteine-HCl (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA). Pumps were implanted 14 days after PTX surgery, and rats received 1% calcium gluconate in drinking water. Control rats received only 2% Cysteine-HCl in their pumps. Rats were killed, and blood was stored at -80°C up to analysis.

Biochemical and Hormonal Analyses

Serum urea, creatinine, calcium, phosphate, and albumin and urine creatinine concentrations were measured with an Architect C1600 clinical analyzer (Abbott, Saint-Laurent, Québec, Canada). Rat intact serum PTH (1-84) was determined with an ELISA kit (Alpco Diagnostics, Windham, NH). Serum and supernatant 25(OH)D₃ and serum 1,25(OH)₂D₃ were evaluated using RIA kit (IDS Inc., Medicorp, Montréal, Québec, Canada). Supernatants (1 ml) were lyophilized overnight and were resuspended in 50 µl of solution 1 of RIA kit. The assay sensitivity for PTH is 1.6 pg/ml.

Measurement of 24, 25(OH)₂D₃ in Sera and 25(OH)D₃ in Urine

Quantification of vitamin D₃ metabolites 24, 25(OH)₂D₃ and 25(OH)D₃ was performed according to a previously published method⁵³ with some modifications. In the first step, samples were extracted. Sera (500 µl) were spiked with 10,000 DPM of tritiated 24,25(OH)₂D₃ and 10,000 DPM of tritiated 25(OH)D₃ (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) then extracted with 500 µl of acetonitrile. The aqueous phase was separated by centrifugation then rinsed with 500 µl of 0.4 M K₂HPO₄ (pH 10.5). The recovered aqueous phase was passed through a preconditioned C18 column (Bond Elut C18-OH; Varian, Montréal, Québec, Canada) according to the manufacturer's instructions and eluted with 2 ml of water and 5 ml of methanol:H₂O(70:30). Samples were recovered in 5 ml of hexane:methylene chloride (90:10) and dried under nitrogen. Samples were reconstituted in 100 µl of hexane:isopropanol (92:8), then injected on an Agilent 1100 HPLC mounted with a Zorbax silica column 5 µm 4.6 x 250 mm and eluted with hexane:isopropanol (92:8) at a flow rate of 2 ml/min. Fractions were collected between 4 and 5 minutes after injection for the quantification of 25(OH)D₃ and between 7.5 and 9.0 minutes for the quantification of 24,25(OH)₂D₃. These fractions were pooled and dried under nitrogen. Quantification of both metabolites was performed with an RIA assay (IDS Inc.). Dried samples were reconstituted in 275 µl of buffer from the kit, and the assay was performed on a 50 µl aliquot.

RNA Isolation

Total RNAs were extracted from liver and kidney with guanidine isothiocyanate and lithium chloride following Chirgwin's method.^{54,55} All samples were digested by proteinase K to remove protein contaminants, then extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol and precipitated with sodium acetate and ethanol. Isolated RNAs were further purified by digestion with DNase and purification with RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). cDNA were synthesized with 1 µg of total RNA by reverse transcription (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions using random primers Pd(N)₆ (Invitrogen, Mississauga, Ontario, Canada). cDNAs were purified with ChargeSwitch PCR Clean-Up kit (Invitrogen) and resuspended in 30 µl of Tris buffer (10 mM, pH 8.5).

Quantitative PCR Analysis

Specific primers for the studied cytochrome CYP450 isoforms (CYP2C11, 2J3, 2R1, 3A2, and 27A1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Table 3) were obtained from Invitrogen. PCR mix (25 µl) was made of cDNA (2.5 µl for GAPDH or 6 µl for CYP isoforms), 20 µM of specific primers, and 12.5 µl of Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Samples were amplified in Rotor-Gene 3000 Real-Time DNA Amplification system (Corbett Research, Sydney, Australia) using the following PCR conditions: 95°C for 3 minutes, followed by 45 amplification cycles (95°C for 10 seconds, 59°C for 30 seconds, and 72°C for

30 seconds). Standard curves were realized with an arbitrary chosen sample of liver RNA obtained from a normal animal. Results were expressed as a ratio of CYP to GAPDH. The mean ratio value for the control group was arbitrarily set to 1. TaqMan gene expression assay for CYP24 was obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA). PCR was realized following the manufacturer's protocol. Results were expressed as a ratio of CYP24 to GAPDH.

Western Blot Analysis

Protein expression of CYP2C11, 2J3, 2R1, 3A2, and 27A1 was assessed in the liver of different groups of rats using Western blot analysis as described previously.³⁵ Protein expression of CYP24A1 has been measured in the kidney of control rats and rats with CRF by Western blot as previously reported.⁵⁶ Antibodies for CYP2J3, 2R1, and 27A1 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). CYP24A1 was detected with an antibody from Abnova (Jhongli City, Taiwan), CYP2C11 and 3A2 antibodies came from Gentest (Woburn, MA), β -actin came from Neo-Markers (Fremont, CA), and GAPDH came from Abcam (Cambridge, MA). All secondary antibodies were coupled to peroxidase and were from Sigma.

Statistical Analysis

All results are expressed as means \pm SD. Differences between group means were assessed using an unpaired t test or an ANOVA. All significant ANOVA was

followed by a post hoc Scheffe analysis. All statistically significant values were set at $P < 0.05$.

RESULTS

Biochemical Parameters and Vitamin D₃ Concentrations in Control Rats and Rats with CRF

Table 1 presents the physiologic characteristics of studied animals. Body weights and calcium and phosphate concentrations were similar in control rats and rats with CRF. Compared with control rats, rats with CRF had higher concentrations of serum creatinine and a highly reduced creatinine clearance ($P < 0.001$). PTH serum concentrations were increased >10-fold in rats with CRF, indicating the presence of secondary hyperparathyroidism. Serum concentrations of 25(OH)D₃ were reduced by 52% ($P < 0.01$) in rats with CRF compared with control rats. 1,25(OH)₂D₃ serum concentrations were decreased by 73% ($P < 0.01$) in rats with CRF compared with controls. There was also a significant decrease in serum 24,25(OH)₂D₃ concentration ($P < 0.01$).

Correlation of 25(OH)D₃ Concentration with Renal and Parathyroid Functions

As shown on Figure 2A, we found a highly significant negative correlation between 25(OH)D₃ and creatinine concentration in serum of rats with CRF ($r^2 = 0.78$, $P < 0.001$). We also found, as shown in Figure 2B, a significant negative correlation between PTH concentration and 25(OH)D₃ level in rats with CRF ($r^2 = 0.40$, $P < 0.05$).

Impact of CRF on the Vitamin D₃ 25-Hydroxylase Activity in Rats

The ability of rats with CRF and control rats to C-25-hydroxylate vitamin D₃ was assessed after the administration of vitamin D₃ or 1 α -hydroxyvitamin D₃. As shown in Figure 3A, rats with CRF produced 71% ($P < 0.05$) less 25(OH)D₃ compared with controls, after the injection of vitamin D₃, suggesting a decrease in C-25-hydroxylation activity. Similarly, the formation of 1,25(OH)₂D₃ after the administration of 1 α -hydroxyvitamin D₃ was reduced by 48% in rats with CRF compared with controls ($P < 0.05$), also suggesting a vitamin D₃-C-25-hydroxylation downregulation in rats with CRF (Figure 3B).

Effect of Uremic Serum on Calcidiol Synthesis in Cultured Hepatocytes

The objective of this experiment was to determine the effects of uremic serum on the synthesis of calcidiol by cultured hepatocytes incubated with its precursor, vitamin D₃, to confirm the role of uremic mediators in the downregulation of vitamin D₃-C-25-hydroxylation. Figure 4 demonstrates a reduction in the production of 25(OH)D₃ by isolated normal hepatocytes in the presence of serum obtained from animals with CRF. Production of 25(OH)D₃ was reduced by 54% ($P < 0.05$) in hepatocytes incubated with CRF serum compared with the production observed in presence of control serum. Thus, uremic serum contains factors that inhibit the C-25-hydroxylation.

Physical and Biochemical Characteristics of Parathyroidectomized Rats

To evaluate the role of PTH in the reduction of calcidiol synthesis, we surgically removed parathyroid glands 7 days before the first step of the 5/6 nephrectomy protocol or sham operation. Table 2 presents the body weight and biochemical characteristics of parathyroidectomized rats. No between-group differences were observed in body weight and serum calcium and phosphate concentrations, whereas rats with CRF had higher concentrations of serum creatinine and a highly reduced creatinine clearance ($P < 0.05$). Once again, serum PTH concentrations were increased >10-fold, and $25(\text{OH})\text{D}_3$ and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were decreased in rats with CRF. Most parathyroidectomized animals have undetectable levels of PTH; therefore, the PTH values in Table 2 are the means for those with a detectable (>1.6 pg/ ml) level of PTH ($n = 4$ in control parathyroidectomized rats and $n = 3$ in parathyroidectomized rats with CRF). In parathyroidectomized rats with CRF, the $25(\text{OH})\text{D}_3$ concentrations were found to be similar to those of control rats. Thus, PTX prevents the downregulation of $25(\text{OH})\text{D}_3$ production.

Effects of CRF on Liver CYP450 Isoforms Involved in the C-25-Hydroxylation of Vitamin D_3 and the Role of PTH in Their Downregulation

This experiment was designed to evaluate whether CRF induced a downregulation of enzymes implicated in the synthesis of calcidiol and also to confirm the implication of PTH in the decrease of liver CYP450. As shown in Figure 5A, the protein levels of CYP450 2C11, 2J3, 3A2, and 27A1, which are known to play

a role in the C-25-hydroxylation of vitamin D₃, were reduced by 66, 32, 72, and 36%, respectively ($P < 0.05$), in rats with CRF compared with control rats. Results also show that preventing secondary hyperparathyroidism by PTX partially prevents the negative effect of CRF on protein expression levels of these isoforms. No significant differences were observed in CYP2R1 expression. Similar results have been obtained for mRNA levels (Figure 5B), except for CYP27A1, for which gene expression was unaffected in rats with CRF.

Effects of CRF on Renal CYP450 Isoform Involved in the C24–25-Hydroxylation of Vitamin D₃

Although we found a decrease in 24,25(OH)₂D₃ concentration in rats with CRF (Tables 1 and 2), suggesting that increased catabolism of calcidiol was not involved in the observed low levels of 25(OH)D₃, we measured protein expression and mRNA levels of CYP24A1 in the kidney of control rats and rats with CRF. We found that CYP24A1 protein expression and mRNA were not significantly different between groups (Figure 5C).

Effect of In Vivo PTH Infusion on 25(OH)D₃ Production and on Liver CYP450 Isoforms

To determine further the involvement of PTH in the downregulation of the C-25-hydroxylation of vitamin D₃, we used an implantable osmotic minipump to infuse PTH (1-34) in control rats after PTX. Figure 6A shows a reduction in the

production of 25(OH)D₃ in rats after a 48-hour PTH infusion ($P < 0.05$). No significant changes in 25(OH)D₃ concentrations were observed in rats infused with vehicle alone or in control rats. Significant ($P < 0.05$) decreases in CYP2C11, 2J3, and 3A2 protein expression (Figure 6B) as well as mRNA (Figure 6C) expression were also observed in rats infused with PTH (1-34) for 48 hours.

DISCUSSION

This study demonstrates that calcidiol deficiency in rats with CRF is secondary to a decrease in its synthesis by the liver. Our results show that calcidiol formation, after vitamin D₃ injection or calcitriol production after 1 α -hydroxyvitamin D₃ administration, is significantly reduced in rats with CRF, demonstrating that CRF impedes the C-25-hydroxylation of vitamin D₃. The decrease in biosynthesis of calcidiol in CRF is explained by a downregulation in key liver CYP450 isoforms (namely, CYP2C11, 2J3, 3A2, and 27A1) responsible for the C-25-hydroxylation of vitamin D₃. This study also suggests that PTH is a major regulator of calcidiol biosynthesis. Indeed, PTX in rats with CRF not only prevented calcidiol deficiency but also prevented the downregulation of several liver CYP450 isoforms involved in the C-25-hydroxylation of vitamin D₃. Furthermore, injection of PTH in rats mimics the effect of CRF by inducing a decrease in calcidiol levels and also a reduction in CYP450 isozymes.

Although controversial, dietary restriction or reduced sun exposure have been proposed to explain the very high prevalence of inadequate calcidiol concentrations in the CKD population.^{2,38} In this study, to avoid the effect of CRF-induced malnutrition, we used control animals that were pair-fed, and we still can demonstrate a significant reduction in calcidiol synthesis in rats with CRF, ruling out that lower dietary intake is involved. Furthermore, all of our study animals were

submitted to strictly controlled light exposure. This also rules out a potential difference in biosynthesis of 25(OH)D₃ precursor by skin cells.

Because CRF, especially that induced by 5/6 nephrectomy,^{39,40} is frequently associated with proteinuria, another hypothesis to explain the observed calcidiol deficiency is an increase in urinary losses of calcidiol.⁴¹⁻⁴³ We thus measured the levels of 25(OH)D₃ in urine of control rats and rats with CRF. As shown in Table 1, there was only a slight difference in urinary calcidiol concentrations between the two groups, ruling out the role of urinary loss in the observed calcidiol deficiency in CRF. Furthermore, calcidiol deficiency could be secondary to an increased degradation of 25(OH)D₃ into 24,25(OH)₂D₃, which is not the case, as illustrated in Table 1.

Our results clearly demonstrate for the first time that CRF impedes the vitamin D₃ 25-hydroxylase activity. Indeed, we found that rats with CRF have a reduced capacity to C-25-hydroxylate not only vitamin D₃ but also 1 α -vitamin D₃, leading to a decrease in calcidiol and calcitriol formation, respectively. This decrease in 25-hydroxylase activity explains the calcidiol deficiency observed in CRF, but it could also explain why the efficacy of vitamin D₃ therapy on serum calcidiol levels is variable and remains poor compared with patients without CKD.^{1-7,15,44-46}

In this study, we tested the hypothesis that uremic mediators were involved in the decrease in calcidiol concentrations. The results clearly demonstrate that CRF serum contains factors that are able to downregulate hepatic vitamin D₃ 25-hydroxylase activity. The results obtained in hepatocytes incubated with uremic serum closely mimic the data obtained *in vivo* when we administered vitamin D₃ to rats with CRF.

As illustrated in Figure 1, liver CYP450 is the major enzymatic family responsible for the synthesis of calcidiol.²¹⁻²⁶ Several human and animal studies have revealed that CRF downregulates many hepatic CYP450 isoforms involved in the metabolism of drugs, and, interestingly, some of them are also involved in the C-25-hydroxylation of vitamin D₃.^{47,48} Our study demonstrates that CRF decreases several CYP450 isoforms (CYP2C11, 2J3, 3A2, and 27A1), whereas CYP2R1 was found to remain unchanged. The relative importance of the various CYP450 isoforms in the synthesis of calcidiol remains controversial; however, many studies suggested that 2C11, 2J3, and 3A2 are the most important isoforms implicated in the synthesis of calcidiol in the rodent liver.^{21,26} This could explain why our rats with CRF had reduced calcidiol synthesis.

We attempted to determine the mechanism leading to the downregulation of these enzymes. Because PTH has been shown to impair protein synthesis not only by reducing gene expression, in several organs including the liver,⁴⁹ but also by

reducing hepatic CYP450s,³⁵ we tested the hypothesis that CRF-induced secondary hyperparathyroidism could be linked to the decrease in vitamin D₃ 25-hydroxylase activity in renal failure. First, we evaluated whether PTX could prevent the decrease in calcidiol levels in rats with CRF. As shown in Table 2, rats with CRF and PTX have essentially the same calcidiol concentrations as control rats. Furthermore, CYP450s in rats with CRF were significantly improved by PTX. Moreover, our data demonstrate that PTH infusion in control rats with PTX also led to decreased calcidiol concentrations to levels similar to those observed in rats with CRF.

Fibroblast growth factor 23 (FGF23) is a novel circulating factor implicated in phosphate and vitamin D regulation.^{50,51} In the kidney, FGF23 increases phosphate excretion and inhibits 1 α -hydroxylase, thereby decreasing 1,25(OH)₂D₃ synthesis. In patients with CRF, FGF23 rises progressively, and it has been linked not only to reduced calcitriol synthesis but also to an increase in morbidity and mortality.^{50,51} Whether FGF23 could also be implicated in calcidiol deficiency remains to be tested.

Although this study has been conducted in rats, our data could be applied to humans. First, in humans, hyperparathyroidism seems to decrease 25(OH)D₃, a finding that has been reported in primary hyperparathyroidism and shown to be corrected by PTX.³⁷ Second, we found a significant correlation between the decrease in renal function and the reduction in calcidiol concentrations (Figure 2A), suggesting that as CRF worsens, calcidiol synthesis is less efficient. This observation

could explain why some human studies have reported a lower efficacy of vitamin D₃ supplementation in stages 4 and 5 compared with stage 3 CKD.^{16,17} Conversely, major differences in the CYP450 isoforms are implicated in the synthesis of calcidiol between rats and humans. Indeed, in humans, CYP2R1 is a key isoform responsible for the 25-hydroxylation of vitamin D, whereas in the rats, its role is secondary.²⁴ It remains to be demonstrated in patients with CRF whether CYP2R1 is also decreased to explain calcidiol deficiency.

In conclusion, CRF per se in an animal model of CKD causes a significant decrease in serum calcidiol concentration. CRF is associated with a decreased calcidiol synthesis from natural precursor and is associated with a downregulation of liver CYP450 isoforms involved in vitamin-D₃-C-25-hydroxylation. A uremic humoral mediator seems to be involved, and as PTX abolishes CRF-associated calcidiol deficiency and PTH infusion decreases calcidiol synthesis, parathyroid hormone could be a potential culprit.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was presented in part at the annual meeting of the American Society of Nephrology; October 31 through November 5, 2007, San Francisco, CA; and October 27 through November 1, 2009, San Diego, CA.

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research and Fonds de la recherche en Santé du Québec (FRSQ) and la Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. V.P. is a scholar of the FRSQ, and J.M. as well as J.N. are fellows of the FRSQ.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Elder GJ, Mackun K: 25-Hydroxyvitamin D deficiency and diabetes predict reduced BMD in patients with chronic kidney disease. *J Bone Miner Res* 21: 1778–1784, 2006
2. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, Graves KL, Moe SM: Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: A cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis* 45: 1026–1033, 2005
3. Bouchard J, Ouimet D, Vallee M, Leblanc M, Pichette V: Effect of vitamin D supplementation on calcidiol and parathyroid hormone levels. *Perit Dial Int* 28: 565, 2008
4. Bouchard J, Ouimet D, Vallee M, Lafrance JP, Leblanc M, Senecal L, Bonnardeaux A, Mathieu JP, Pichette V: Comparison of the prevalence of calcidiol insufficiency in predialysis and osteoporotic populations. *Int Urol Nephrol* 41: 983–988, 2009
5. National Kidney Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 42: S1–S201, 2003

6. Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ: Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease: A single center observational study. *Am J Nephrol* 24: 503–510, 2004
7. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL: Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the Study to Evaluate Early Kidney Disease. *Kidney Int* 71: 31–38, 2007
8. Johal M, Levin A: Vitamin D and parathyroid hormone in general populations: Understandings in 2009 and applications to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 1508–1514, 2009
9. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers E, Monroy M, Tamez H, Steele D, Chang Y, Camargo CA Jr, Tonelli M, Thadhani R: Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 72: 1004–1013, 2007
10. Jean G, Charra B, Chazot C: Vitamin D deficiency and associated factors in hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 18: 395–399, 2008

11. Wang AY, Lam CW, Sanderson JE, Wang M, Chan IH, Lui SF, Sea MM, Woo J: Serum 25-hydroxyvitamin D status and cardiovascular outcomes in chronic peritoneal dialysis patients: A 3-y prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 87: 1631–1638, 2008
12. Holick MF: Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80: 1678S–1688S, 2004
13. Zittermann A, Koerfer R: Vitamin D in the prevention and treatment of coronary heart disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 752–757, 2008
14. Heaney RP: Vitamin D in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1535–1541, 2008
15. Palmer SC, McGregor DO, Macaskill P, Craig JC, Elder GJ, Strippoli GF: Meta-analysis: Vitamin D compounds in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 147: 840–853, 2007
16. Zisman AL, Hristova M, Ho LT, Sprague SM: Impact of ergocalciferol treatment of vitamin D deficiency on serum parathyroid hormone concentrations in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 27: 36–43, 2007

17. Al-Aly Z, Qazi RA, Gonzalez EA, Zeringue A, Martin KJ: Changes in serum 25-hydroxyvitamin D and plasma intact PTH levels following treatment with ergocalciferol in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 50: 59–68, 2007
18. Tokmak F, Quack I, Schieren G, Sellin L, Rattensperger D, Holland- Letz T, Weiner SM, Rump LC: High-dose cholecalciferol to correct vitamin D deficiency in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 23: 4016–4020, 2008
19. Zierold C, Darwish HM, DeLuca HF: Identification of a vitamin D response element in the rat calcidiol (25-hydroxyvitamin D₃) 24-hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 900–902, 1994
20. DeLuca HF: The vitamin D story: A collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* 2: 224–236, 1988
21. Ohyama Y, Yamasaki T: Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism. *Front Biosci* 9: 3007–3018, 2004
22. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol* 277: F157–F175, 1999

23. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F8–F28, 2005
24. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW: Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7711–7715, 2004
25. Prosser DE, Jones G: Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 29: 664–673, 2004
26. Yamasaki T, Izumi S, Ide H, Ohyama Y: Identification of a novel rat microsomal vitamin D₃ 25-hydroxylase. *J Biol Chem* 279: 22848–22856, 2004
27. Van Peer AP, Belpaire FM: Hepatic oxidative drug metabolism in rats with experimental renal failure. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 228: 180–183, 1977
28. Leber HW, Schutterle G: Oxidative drug metabolism in liver microsomes from uremic rats. *Kidney Int* 2: 152–158, 1972
29. Leber HW, Gleumes L, Schutterle G: Enzyme induction in the uremic liver. *Kidney Int Suppl* S43–S48, 1978

30. Patterson SE, Cohn VH: Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure. *Biochem Pharmacol* 33: 711–716, 1984
31. Uchida N, Kurata N, Shimada K, Nishimura Y, Yasuda K, Hashimoto M, Uchida E, Yasuhara H: Changes of hepatic microsomal oxidative drug metabolizing enzymes in chronic renal failure (CRF) rats by partial nephrectomy. *Jpn J Pharmacol* 68: 431–439, 1995
32. Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, Pichette V: Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12: 326–332, 2001
33. Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V: Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* 137: 1039–1046, 2002
34. Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, Pichette V: Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol* 144: 1067–1077, 2005
35. Michaud J, Naud J, Chouinard J, Desy F, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, Pichette V: Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver

- cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17: 3041–3048, 2006
36. Simard E, Naud J, Michaud J, Leblond FA, Bonnardeaux A, Guillemette C, Sim E, Pichette V: Downregulation of hepatic acetylation of drugs in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 19: 1352–1359, 2008
37. Clements MR, Davies M, Fraser DR, Lumb GA, Mawer EB, Adams PH: Metabolic inactivation of vitamin D is enhanced in primary hyperparathyroidism. *Clin Sci (Lond)* 73: 659–664, 1987
38. Binkley N, Novotny R, Krueger D, Kawahara T, Daida YG, Lensmeyer G, Hollis BW, Drezner MK: Low vitamin D status despite abundant sun exposure. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2130–2135, 2007
39. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Omae T, Fujishima M: Rapidly progressive renal deterioration in partially nephrectomized rats with experimental membranous nephropathy. *Nephron* 41: 359–364, 1985
40. Esposito C, Villa L, Grosjean F, Mangione F, Esposito V, Castoldi F, Serpieri N, Arra M, Pertile E, Maggi N, Valentino R, Dal Canton A: Rapamycin reduces

- proteinuria and renal damage in the rat remnant kidney model. *Transplant Proc* 41: 1370–1371, 2009
41. Auwerx J, De Keyser L, Bouillon R, De Moor P: Decreased free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with the nephrotic syndrome. *Nephron* 42: 231–235, 1986
 42. Sato KA, Gray RW, Lemann J Jr: Urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in health and the nephrotic syndrome. *J Lab Clin Med* 99: 325–330, 1982
 43. Goldstein DA, Haldimann B, Sherman D, Norman AW, Massry SG: Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 116–121, 1981
 44. Houghton LA, Vieth R: The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *Am J Clin Nutr* 84: 694–697, 2006
 45. DeVille J, Thorp ML, Tobin L, Gray E, Johnson ES, Smith DH: Effect of ergocalciferol supplementation on serum parathyroid hormone and serum 25-hydroxyvitamin D in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 11: 555–559, 2006

46. Al-Aly Z: Vitamin D as a novel nontraditional risk factor for mortality in hemodialysis patients: The need for randomized trials. *Kidney Int* 72: 909–911, 2007
47. Niwa T, Murayama N, Yamazaki H: Oxidation of endobiotics mediated by xenobiotic-metabolizing forms of human cytochrome P450. *Curr Drug Metab* September 1, 2009 [epub ahead of print]
48. Miller WL, Portale AA: Vitamin D biosynthesis and vitamin D 1 α hydroxylase deficiency. *Endocr Dev* 6: 156–174, 2003
49. Massry SG, Smogorzewski M: Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver. *Kidney Int Suppl* 62: S5–S7, 1997
50. Wolf M: Fibroblast growth factor 23 and the future of phosphorus management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18: 463–468, 2009
51. Quarles LD: Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest* 118: 3820–3828, 2008

52. Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG: Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J Clin Invest* 97: 2167–2173, 1996
53. Hollis BW, Kilbo T: The assay of circulating 1,25(OH)₂D using nonend-capped C₁₈silica (C₁₈-OH): Performance and validation. In: *Vitamin D: Molecular, Cellular, and Clinical Endocrinology*, edited by Anthony W, Norman KS, Grigoleit HG, van Herrath D, Berlin, Walter de Gruyter and Co., 1988, pp 710–719
54. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294–5299, 1979
55. Lemay J, Demers C, Hendy GN, Delvin EE, Gascon-Barre M: Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃–24-hydroxylase gene in rat intestine: Response to calcium, vitamin D₃ and calcitriol administration in vivo. *J Bone Miner Res* 10: 1148–1157, 1995
56. Chow EC, Sun H, Khan AA, Groothuis GM, Pang KS: Effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on transporters and enzymes of the rat intestine and kidney in vivo. *Biopharm* 31: 91–108, 2010

57. Rahmaniyan M, Patrick K, Bell NH: Characterization of recombinant CYP2C11: A vitamin D 25-hydroxylase and 24-hydroxylase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E753–E760, 2005

58. Su P, Rennert H, Shayiq RM, Yamamoto R, Zheng YM, Addya S, Strauss JF 3rd, Avadhani NG: A cDNA encoding a rat mitochondrial cytochrome P450 catalyzing both the 26-hydroxylation of cholesterol and 25-hydroxylation of vitamin D3: Gonadotropic regulation of the cognate mRNA in ovaries. *DNA Cell Biol* 9: 657–667, 1990

59. Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R: Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: Genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13: 2485–2502, 1985

FIGURES, TABLES AND LEGENDS

Table 1 : Physical and biochemical characteristics and vitamin D₃ concentrations of the control rats and rats with CRF

Characteristic	Control	CRF
<i>n</i>	14	13
Weight (g)	372.1 ± 26.6	343.2 ± 54.2
Creatinine (μmol/L)	53.7 ± 6.2	267.6 ± 91.3 ^a
Creatinine clearance (μl/100 g per min)	396.7 ± 135.6	51.4 ± 29.0 ^a
Urea (mmol/L)	6.5 ± 3.6	55.3 ± 37.6 ^a
25(OH)D ₃ (nmol/L)	91.9 ± 26.9	53.0 ± 30.5 ^a
1,25(OH) ₂ D ₃ (pmol/L)	94.9 ± 19.7	31.0 ± 14.3 ^a
24,25(OH) ₂ D ₃ (nmol/L)	29.9 ± 9.2	10.1 ± 6.7 ^a
Urine 25(OH)D ₃ (nmol/L)	ND	1.1 ± 1.1 ^a
PTH (1-84) (pg/ml)	75.2 ± 35.9	1833.4 ± 1655.0 ^a
Total plasma calcium (mmol/L)	2.42 ± 0.03	2.46 ± 0.20
Phosphate (mmol/L)	2.95 ± 0.31	4.54 ± 2.74

ND, not detected.

^a*P* < 0.05 versus control group.

Table 2 : Physical and biochemical characteristics and vitamin D₃ levels of rats with PTX

Characteristic	Control	CRF	Control with PTX	CRF and PTX
<i>n</i>	16	16	6	6
Weight (g)	372.5 ± 25.8	323.1 ± 56.1	356.0 ± 40.9	373.3 ± 32.3
Creatinine (μmol/L)	53.4 ± 5.4	277.9 ± 94.2 ^{a,d}	53.0 ± 2.9	155.5 ± 54.9 ^{b,c}
Creatinine clearance (μl/100 g per min)	370.5 ± 111.5	48.2 ± 27.5 ^a	366.8 ± 35.7	109.6 ± 181.7
Urea (mmol/L)	5.9 ± 3.1	58.0 ± 39.0 ^{a,d}	4.5 ± 0.8	25.6 ± 8.2 ^{b,c}
25(OH)D ₃ (nmol/L)	88.2 ± 29.6	50.7 ± 30.5 ^a	92.3 ± 17.2	112.5 ± 52.2
1,25(OH) ₂ D ₃ (pmol/L)	91.6 ± 19.5	24.6 ± 17.4 ^a	81.4 ± 63.4	38.5 ± 47.1
24,25(OH) ₂ D ₃ (nmol/L)	26.8 ± 11.2	7.6 ± 6.4 ^a	35.4 ± 7.8	23.1 ± 13.9
Urine 25(OH)D ₃ (nmol/L)	81.8 ± 38.0	1791.8 ± 1597.7 ^{a,d}	11.8 ± 10.7 ^{a,e}	10.0 ± 7.0 ^{b,e}
PTH (1-84) (pg/ml)	2.49 ± 0.12	2.37 ± 0.46	2.12 ± 0.22	2.15 ± 0.27
Total plasma calcium (mmol/L)	2.77 ± 0.32	4.88 ± 2.72	2.98 ± 0.51	3.80 ± 0.69

^a*P* < 0.05 versus control group.

^b*P* < 0.05 versus CRF group.

^c*P* < 0.05 versus control with PTX.

^d*P* < 0.05 versus CRF and PTX.

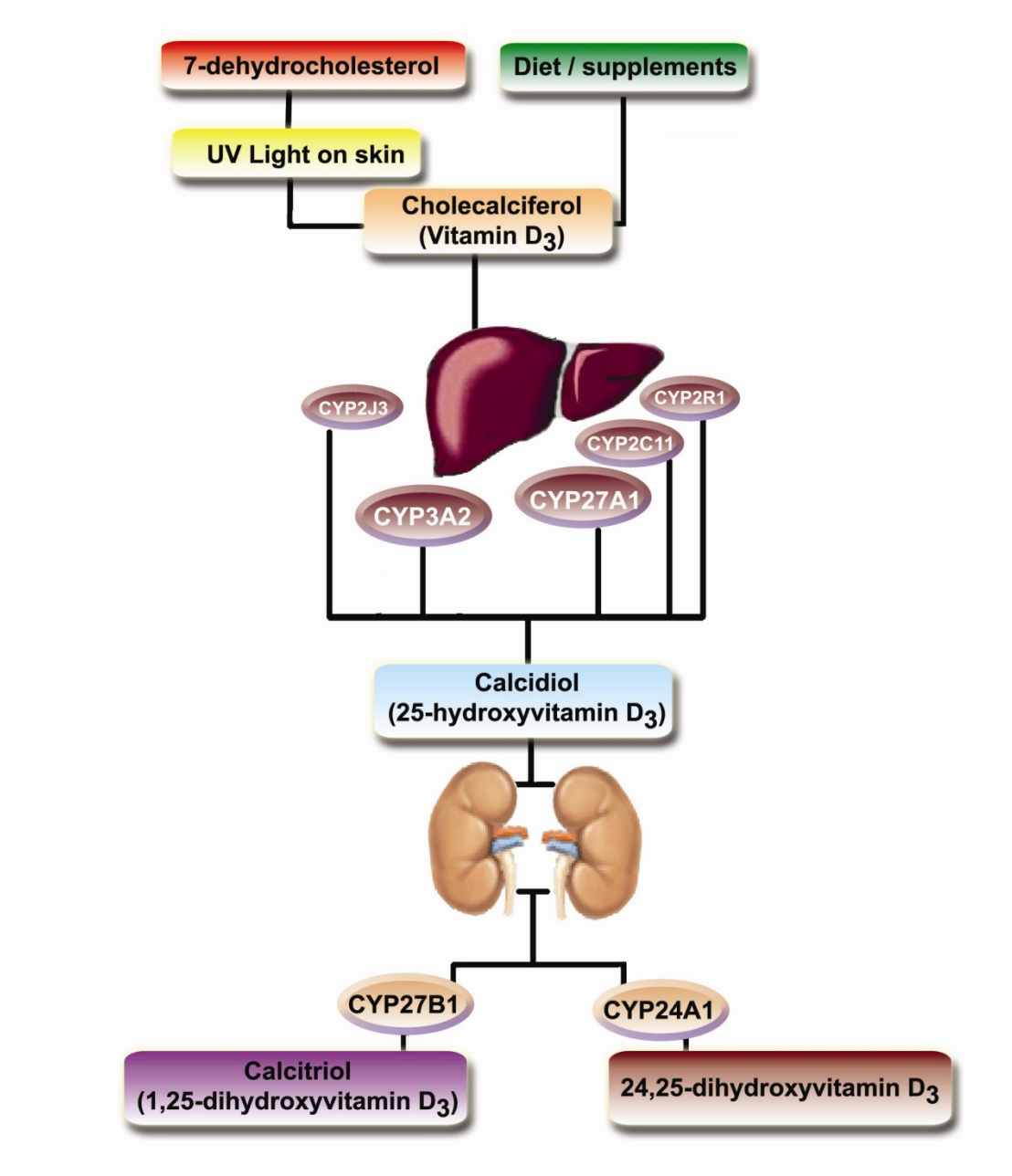
^eThe values are the mean for those with a detectable (>1.6 pg/ml) level of PTH (*n* = 4 in control with PTX and *n* = 3 in CRF and PTX).

Table 3 : Nucleotide sequences of PCR primers

mRNA	Primer Sequence (5'-3')		Reference
2C11	TGCCCCCTTTTTACGAGGCT	GGAACAGATGACTCTGAATTCT	57
2J3	CCTGGATTTTGCTAACATTC	CTAAGCTCTTCTTCCTAGT	57
2R1	CAGCGGCCAGCACCTCCCTGC	CTGTCCTTCAAGGCCTCTCC	57
3A2	GATTCTAAGCATAAGCACCGAGT	ACAGGGCTTTATGAGACACTTCGTCTT	32
27A1	TCTCTGGCTCTAAACTCTTGGC	CTCGTGAAGTGCAGCACATA	58
GAPDH	CCCTTCATTGACCTCAACTACATGGT	GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG	59

Primers for 2C11, 2J3, 2R1, 3A2, 27A1, and GAPDH were designed on the basis of published cDNA sequence.

Figure 1. Vitamin D₃ biotransformation pathway.



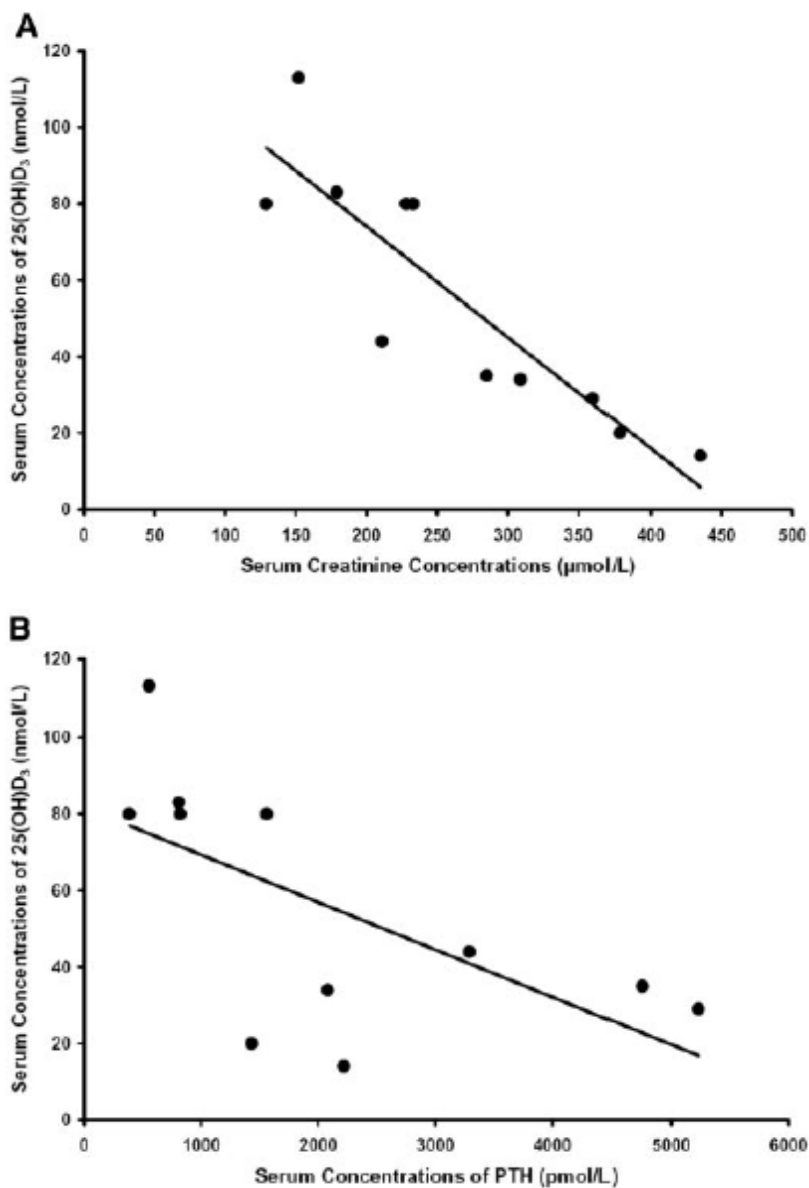


Figure 2. Increases in serum creatinine and PTH correlate with reduction in serum 25(OH)D₃ concentration. Analyses are performed to determine the correlation between the serum concentrations of creatinine and 25(OH)D₃ ($r^2 = 0.78$, $P < 0.001$; A) and the correlation between the serum concentrations of intact PTH and 25(OH)D₃ ($r^2 = 0.40$, $P < 0.05$; B) in rats with CRF.

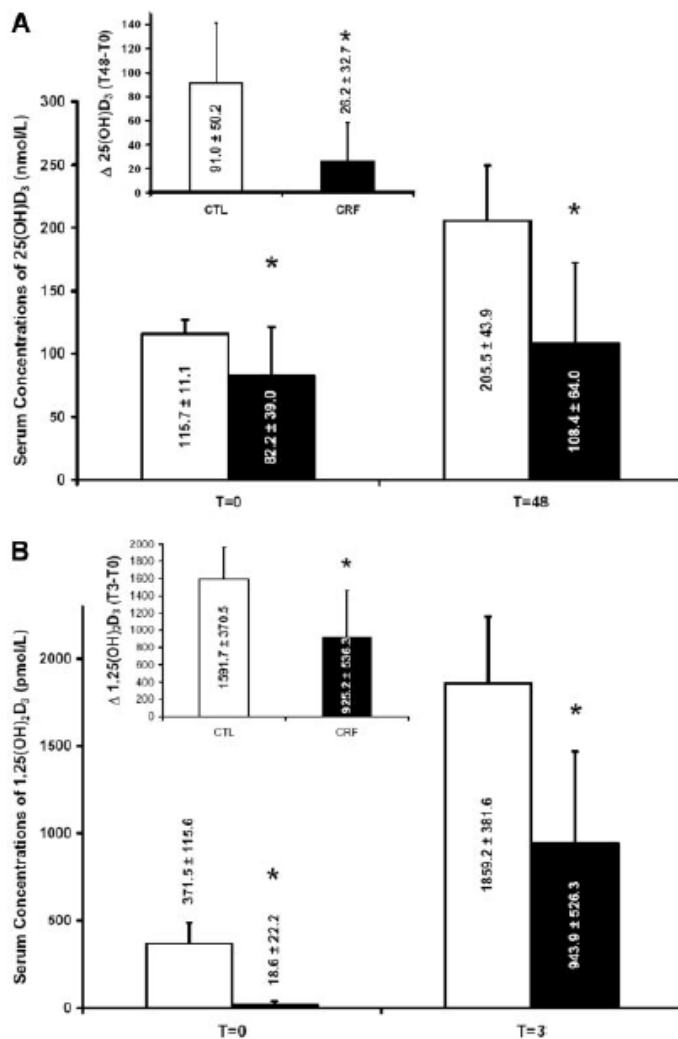


Figure 3. *In vivo* 25(OH)D₃ production decreases in rats with CRF. (A and B) The *in vivo* C-25-hydroxylation of vitamin D₃ is evaluated in control rats (white bar) and (black bar) rats with CRF after the injection of either vitamin D₃ (A) or 1 α -hydroxyvitamin D₃ (B). (A) The production of 25(OH)D₃ is measured at the time of injection (T = 0) and 48 hours later. (Insert) The amount of 25(OH)D₃ produced in 48 hours. *P < 0.05 versus control rats. (B) Serum concentrations of 1,25(OH)₂D₃ are compared at the time of injection (T = 0) and 3 hours later. *P < 0.05 when compared with control rats.

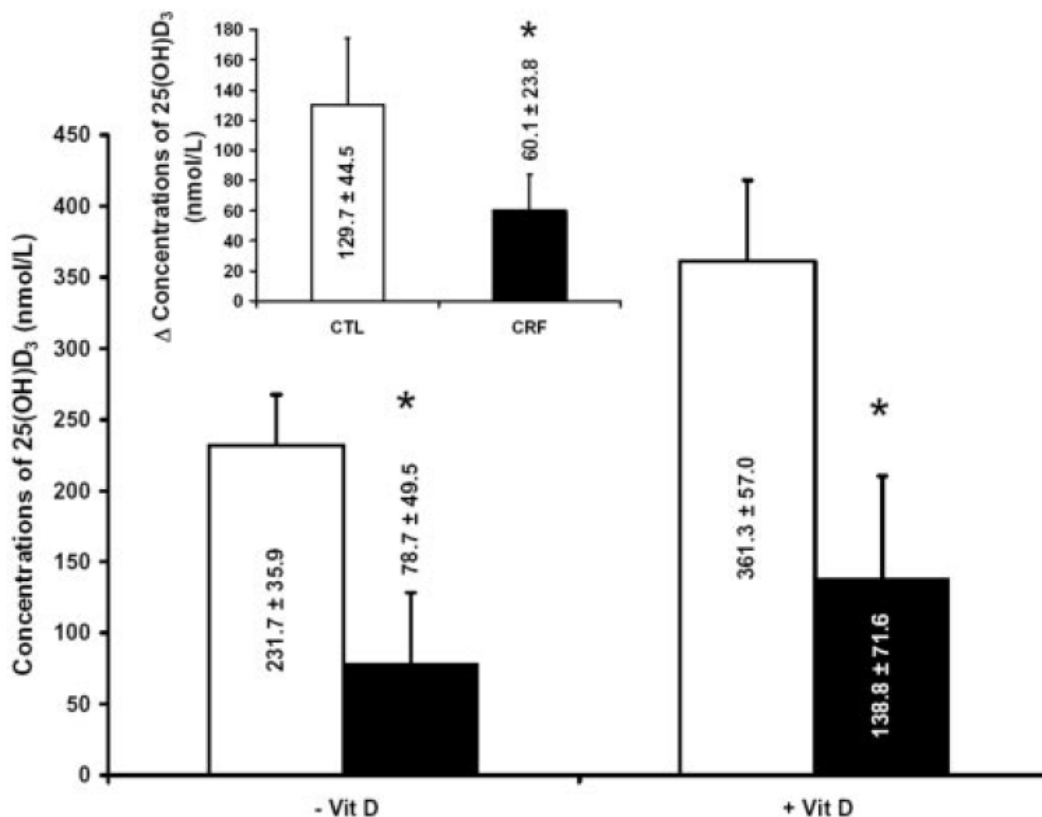


Figure 4. Uremic serum contains factors reducing 25-hydroxylation of vitamin D₃ by hepatocytes. Concentrations of 25(OH)D₃ in supernatant of cultured hepatocytes incubated with serum of control rats (white bar) or rats with CRF (black bar) in the absence or presence of vitamin D₃. (Insert) The increment in 25(OH)D₃ production when vitamin D₃ is added. *P < 0.05 versus control rats.

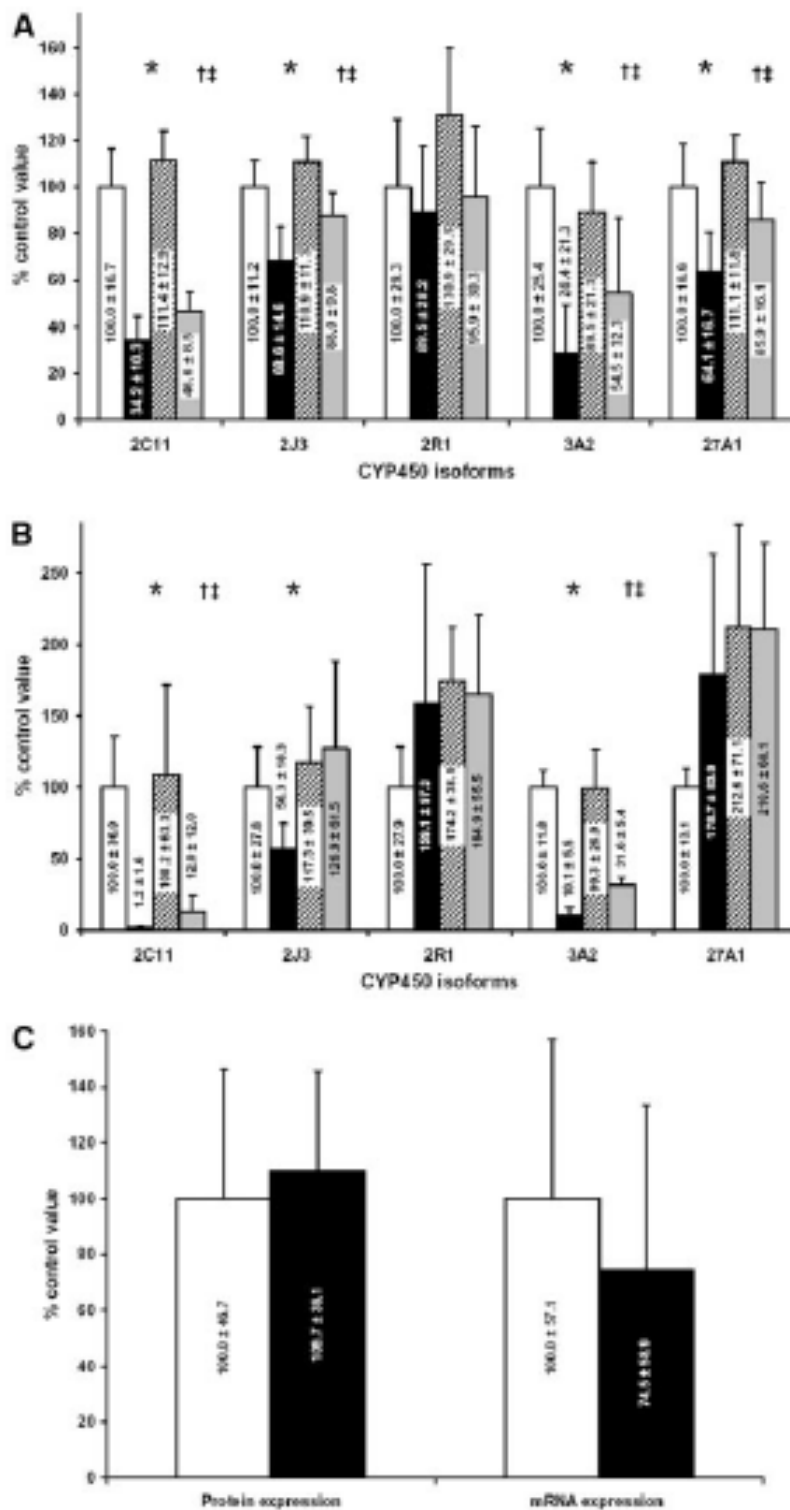


Figure 5. CRF downregulates the protein and mRNA expression of various CYP450s implicated in 25(OH)D₃ hydroxylation and this downregulation can be prevented by

PTX. (A and B) Impact of CRF on CYP450 protein expression (A) and mRNA expression (B) with or without previous PTX. Protein and mRNA encoding for various cytochrome isoforms are compared in control rats (white bar), rats with CRF (black bar), control rats with PTX (hatched bar), and rats with CRF and PTX (gray bar) after quantification by Western blot or quantitative PCR in the liver. (C) Protein and mRNA encoding for CYP24A1 are compared in control rats (white bar) and rats with CRF (black bar) after quantification by Western blot or quantitative PCR in the kidney. *P < 0.05 versus control rats; †P < 0.05 versus rats with CRF; ‡P < 0.05 versus control rats with PTX.

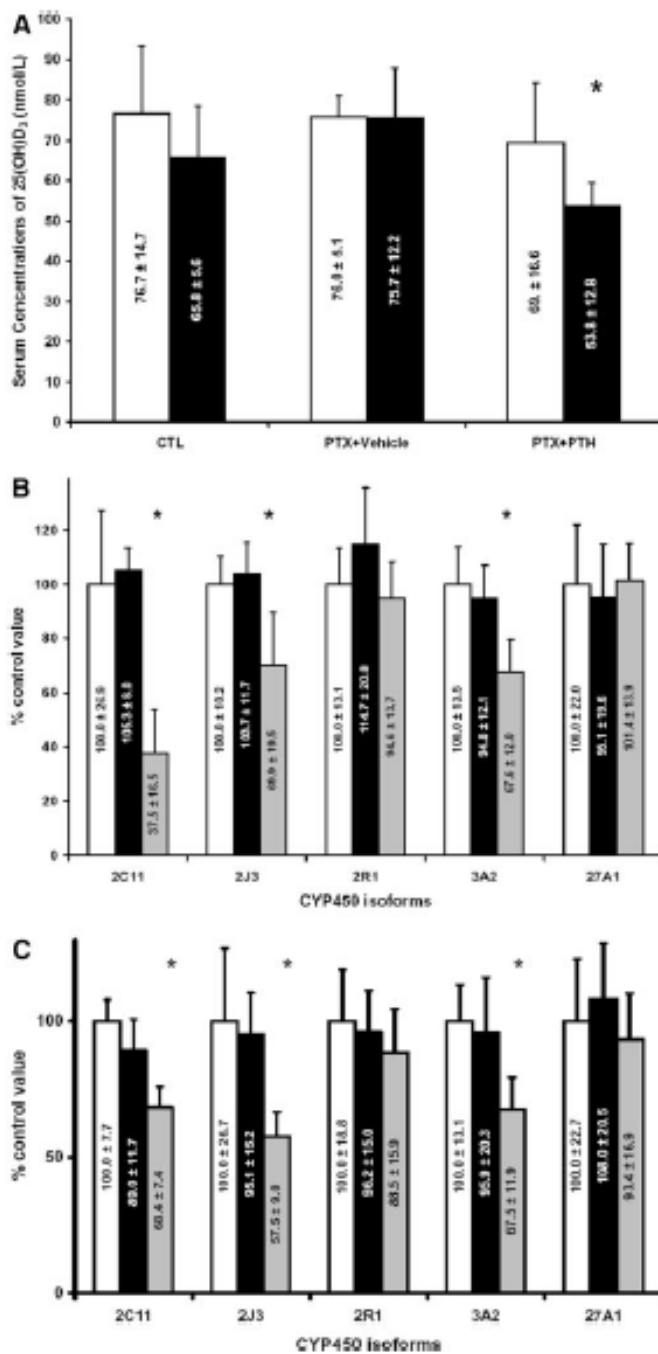


Figure 6. Serum PTH concentration regulates 25-hydroxylation of vitamin D₃. (A) Effect of PTH infusion on the *in vivo* production of 25(OH)D₃ in rats. Serum 25(OH)D₃ concentrations are measured at T = 0 (white bar) and T = 48 hours (black bar) on either control rats (CTL) or rats with PTX. Infusion pumps deliver either rat PTH

(1-34) in 2% cysteine-HCl at 0.06 nmol/kg per h or 2% cysteine-HCl (vehicle) intravenously in rats with PTX. *P < 0.05 versus T = 0. (B and C) Effect of PTH infusion on CYP450 protein (B) and mRNA expression (C) in CTL rats (white bar), rats with PTX and vehicle (black bar), or rats with PTX and PTH pumps (gray bar) after quantification by Western blot or quantitative PCR in the liver. *P < 0.05 versus CTL rats.

9. Article 4

Article en préparation à être soumis dans le J AM Soc Nephrol

**VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS
L'INHIBITION DES CYP450 PAR L'INSUFFISANCE RÉNALE
CHRONIQUE ET L'HORMONE PARATHYROÏDIENNE.**

Josée Michaud MSc^{1,2}, Judith Naud MSc^{1,2}, Francois A. Leblond PhD¹, et Vincent

Pichette MD PhD^{1,2}

¹Service de néphrologie et Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada ²Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Canada

Correspondance adressée à:

Vincent Pichette M.D. Ph.D.
Centre de recherche
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal,
Québec, Canada
H1T 2M4
Tel: (514) 252-3489
Fax: (514) 255-3026

RÉSUMÉ

L'IRC est associée à une réduction du métabolisme de nombreux médicaments, due à une diminution du P450 hépatique et intestinal. Nos études précédentes ont démontré que l'IRC et la PTH affectent *in vivo* et *in vitro* l'activité de même que l'expression protéique et génique des différents isoformes du P450. Afin de mieux comprendre cette inhibition, nous voulons étudier les voies de signalisation impliquées dans la régulation du P450 dans en présence d'IRC puisque les mécanismes d'action demeurent imprécis. La contribution des acteurs suivants sera étudiée ; le récepteur pregnane X (PXR), le récepteur constitutif androstane et le facteur nucléaire kappa B (NF-κB) puisqu'ils sont potentiellement activés par le récepteur de la PTH et ces molécules ont été précédemment impliqués dans la régulation du P450.

Quatre groupes de rats ont été utilisés, témoins (CTL), IRC, avec ou sans parathyroïdectomie (PTX). L'ARNm du PXR a été mesuré par Real-Time PCR. Des extraits nucléaires d'hépatocytes des différents groupes de rats ont été analysés. L'activation de NF-κB a été mesurée dans les extraits nucléaires à l'aide de la cytométrie en flux et par immunobuvardage de type Western. Les PXR et CAR ont été analysés dans ces extraits.

L'expression génique et protéique de PXR et CAR sont diminuées de 30% à 52% dans les foies de rats atteints d'IRC, alors qu'elle n'est pas affectée chez les rats

présentant une IRC et ayant subi une PTX (IRC-PTX). De plus, nous avons observé une activation de NF- κ B dans les foies des rats atteints d'IRC.

En conclusion, les modulations de PXR et CAR semblent être des facteurs responsables de l'inhibition du P450 hépatique en présence d'IRC, en plus de l'activation du NF- κ B.

Mots clés : Cytochrome P450, PXR, CAR, Hormone parathyroïdienne, NF- κ B, Insuffisance rénale chronique, Parathyroïdectomie.

INTRODUCTION

L'insuffisance rénale chronique (IRC) modifie la pharmacocinétique des médicaments en affectant leur clairance rénale (filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire) (Matzke and Frey 1992). De plus, l'IRC est associée à une réduction de la clairance métabolique de plusieurs médicaments due à une diminution du métabolisme hépatique et intestinal (Gibson 1986, Touchette and Slaughter 1991, Matzke and Frye 1997, Pichette and Leblond 2002, Pichette and Leblond 2003). Le cytochrome P450 (CYP450) est le principal mécanisme de biotransformation des médicaments. De nombreuses études ont démontré des modifications de l'expression des CYP450s dans un modèle animal expérimental d'urémie (Leblond, Giroux et al. 2000, Leblond, Guevin et al. 2001). Ces études ont démontré que l'IRC mène à la réduction de l'activité des CYP450s de même qu'à une diminution de l'expression protéique et génique des isoformes responsables du métabolisme de certains médicaments.

La diminution du CYP450 hépatique dans les cas d'IRC peut être expliquée par la présence de facteurs qui s'accumulent dans le sérum de rats ou de patients atteints d'IRC (Guevin, Michaud et al. 2002, Michaud, Dube et al. 2005). L'hormone parathyroïdienne (PTH), fortement accumulée en présence d'IRC, est un facteur majeur impliqué dans la réduction du CYP450 hépatique (Michaud, Naud et al. 2006). Les mécanismes d'action impliqués dans la régulation des isoformes du

CYP450 en présence d'IRC demeurent cependant imprécis. La contribution du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) a été rapportée dans certaines études portant sur l'inhibition du CYP450 (Tian, Ke et al. 1999, Ke, Rabson et al. 2001, Morgan, Li-Masters et al. 2002, Abdulla, Goralski et al. 2005, Michaud, Naud et al. 2006, Michaud, Nolin et al. 2008, Zordoky and El-Kadi 2009).

Le récepteur de la PTH (PTHr) est un récepteur couplé aux protéines G et agit via l'activation de deux sous-types de protéines G : Gs et Gq. Ces protéines G sont associées aux voies de signalisation de l'adénylate cyclase/protéine kinase A (cAMP/PKA) et de la phospholipase C/protéine kinase C (PLC/PKC). Ces voies de signalisation peuvent agir directement sur la phosphorylation de NF- κ B (Lu, Liu et al. 2009, Gerlo, Kooijman et al. 2011).

Les facteurs nucléaires tels que le récepteur pregnane X (PXR) et le récepteur constitutif androstane (CAR) sont responsables de la régulation de certains isoformes importants dans le métabolisme des médicaments. Les voies de signalisation cAMP/PKA, PLC/PKC et le NF- κ B peuvent aussi avoir un effet sur l'expression et l'activité de ces facteurs nucléaires, modifiant leur expression, ainsi que celle de leurs gènes effecteurs tels que certains isoformes du CYP450 (Jansson, Epstein et al. 1987, Pyerin, Horn et al. 1987, Jansson, Curti et al. 1990, Sidhu and

Omiecinski 1995, Galisteo, Marc et al. 1999, LeHoux, Dupuis et al. 2000, Morgan 2001, Hara, Yasunami et al. 2002, Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2002, Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2003, Ding and Staudinger 2005, Oesch-Bartlomowicz and Oesch 2005, Zordoky and El-Kadi 2009).

Nous avons émis l'hypothèse que l'activation du NF- κ B et la réduction de PXR et CAR pourraient être impliquées dans l'inhibition du CYP450 par l'IRC et la PTH.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Modèle Expérimental

Des rats mâles Sprague-Dawley (Charles River, Saint-Constant, Québec, Canada) pesant 176 à 225 g ont été hébergés à l'animalerie du centre de recherche et ont été nourris avec du Harlan Teklad (Harlan Teklad Global Diet, Montréal, Québec, Canada) et de l'eau. Une période d'acclimatation d'au moins 7 jours a été respectée avant le début des expérimentations. Toutes les expériences ont été conduites selon les lignes directrices du Conseil Canadien de protection des animaux pour l'utilisation des animaux de laboratoire et sous la supervision du comité local de protection des animaux.

Protocole expérimental

Quatre groupes de rats ont été utilisés, témoins (CTL), atteints d'IRC (IRC) et avec parathyroïdectomie (PTX) (CTL-PTX et IRC-PTX). L'expression protéique et génique (mRNA) de PXR et CAR a été mesurée chez les rats de chaque groupe.

L'IRC a été induite par une néphrectomie cinq-sixième en deux étapes, selon le protocole préalablement décrit (Leblond, Guevin et al. 2001). Les rats témoins ont été soumis à deux laparotomies blanches (jours 1 et 8) et ont été nourris *pair-feed* avec une quantité de nourriture similaire à celle que les rats atteints d'IRC ont ingérée le jour précédant. Au jour 41 post-chirurgie, les rats ont été placés en cage

métabolique et l'urine a été collectée pendant une période de 24 heures, afin de déterminer la clairance de créatinine. Au jour 42, les rats ont été sacrifiés par décapitation et les tissus et le sang ont été collectés. Les biopsies ont été rangées à -80°C jusqu'à l'analyse.

Les PTX ont été effectuées selon le protocole préalablement rapporté (Klin, Smogorzewski et al. 1996, Michaud, Naud et al. 2006) sept jours avant la première étape du protocole de néphrectomie. Afin d'éviter l'hypocalcémie, ces rats ont été supplémentés en calcium par l'addition de gluconate de calcium dans l'eau de boisson (2,5% pour les rats atteints d'IRC et 5% pour les rats CTL). Les rats CTL ont été soumis à une chirurgie blanche au niveau du cou.

Accumulation nucléaire de NF- κ B et analyse par cytométrie en flux

Les pièces de foie de 0,5 cm x 0,5 cm ont été décongelés et ont été homogénéisées par friction à l'aide de deux lames de microscope (semi-poncées) dans la solution A de la trousse d'extraction CycleTEST PLUS BD Biosciences (BD Mississauga, Ontario, Canada), pendant 10 min. Ensuite, les noyaux ont été extraits suivant la méthode décrite dans la trousse d'extraction. Brièvement, nous avons ajouté de la solution B, pendant 10 min et ensuite procédé au marquage des noyaux. Ceux-ci ont été marqués avec un anticorps anti-p65 (Santa Cruz), pendant 10 min et avec l'anticorps secondaire anti-rabbit couplé au FITC (US Biologicals) pendant 10 min. La solution C contenant de l'iodure de propidium a été ajoutée

pendant 10 min à 4°C. Les noyaux marqués ont été filtrés sur un filtre de nylon 41 µm et ont été évalués à l'aide du FACScan (BD) en PI (far red) et en FITC (green light). Les résultats ont été analysés avec le programme DIVA (BD) et les graphiques ont été dessinés en FITC, PI.

Isolation d'ARNm

Les ARNm totaux ont été extraits à partir du foie selon la méthode de la trousse d'extraction RNeasy Midi kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Un µg d'ARNm a été utilisé pour préparer du ADNc par transcription inverse à l'aide de la trousse Omniscript RT (Qiagen) et des amorces aléatoires (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Une analyse quantitative par PCR a été effectuée sur un appareil iCycler real-time detection system (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) en utilisant la Taq iQ Multiplex Powermix (Bio-Rad Laboratories). Des amorces spécifiques à chaque ARNm ont été utilisées (TaqMan gene expression assay, Applied Biosystems, Foster City, CA) (voir tableau 2). Les conditions de PCR recommandées par le fabricant ont été utilisées : 95°C pendant 15 s, 60°C pendant 60 s. Les résultats ont été exprimés selon le ratio gène/GAPDH et ont été analysés selon la méthode Delta/Delta Ct (Livak and Schmittgen 2001).

Préparation des homogénats de foie

Un ml d'une solution de 0,9% NaCl, 0,1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride a été utilisé avec 200 mg de foie qui a été homogénéisé à l'aide d'un broyeur à tissus

Potter-Elvehjem (Wheaton Science Products, Millville, NJ). Ensuite, les homogénats ont été soniqués sur glace pendant 10 s et entreposés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Analyse par immunobuvardage de type Western

L'expression protéique de PXR et CAR a été évaluée dans les foies des différents groupes de rats à l'aide d'une analyse d'immunobuvardage de type Western préalablement décrite (Michaud, Naud et al. 2006) Les anticorps utilisés pour anti-PXR, anti-CAR, anti-p65 et anti-p-I κ B- α (ser32) ont été obtenus de Santa Cruz (Santa Cruz, California, USA), celui de la β -actine provient de Neo-Markers (Fremont, California, USA) et la GAPDH de Abcam (Cambridge, Massachusetts, USA). Tous les anticorps secondaires couplés à la peroxidase ont été obtenus de Sigma (St-Louis, Missouri, USA). La révélation des bandes a été effectuée à l'aide d'un dérivé du luminol (Lumi-Light Western blotting substrate, Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). L'intensité de la réaction immunologique a été déterminée à l'aide d'un densitomètre numérique Fuji (Stamford, CT), d'une caméra LAS-4000 LCD et du programme d'analyse MultiGauge (Fuji). Les résultats ont été exprimés selon un ratio protéine/ β -actine.

Biochimie

Les concentrations sériques d'urée, de créatinine, de calcium, de phosphate et d'albumine ont été mesurées à l'aide d'un analyseur clinique Architect C1600 (Abbott, Saint-Laurent, Québec, Canada). Les concentrations de PTH intacte (1-84)

de rat ont été déterminées avec une trousse de détection ELISA (Alpco Diagnostics, Windham, New Hampshire, USA). La sensibilité minimum pour l'essai ELISA est de 1,6 pg/ml.

Analyses statistiques

Tous les résultats ont été exprimés en moyenne \pm déviation standard. Les différences des moyennes entre les groupes ont été comparées à l'aide du t-test de Student non-pairé ou par ANOVA. Tous les tests d'ANOVA significatifs ont été suivis par une analyse post-hoc de Scheffe. Toutes les valeurs statistiquement significatives ont été déterminées à $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Paramètres biochimiques et poids corporel des rats

Le tableau 1 présente les paramètres biochimiques et le poids corporel des rats étudiés. Les rats atteints d'IRC présentent des concentrations de créatinine plasmatique plus élevées, ainsi qu'une clairance de créatinine réduite de près de 80% ($p < 0,001$), comparées aux rats du groupe témoin. Les poids sont similaires. La concentration sérique de PTH est augmentée d'au moins 10 fois chez les rats atteints d'IRC, démontrant ainsi la sévérité de l'hyperparathyroïdie secondaire. Les concentrations sériques de PTH sont indétectables chez les rats PTX (Tableau 1).

Expression protéique et génique de CAR et PXR

Nous avons mesuré l'expression de PXR dans les foies de rats atteints d'IRC. Les résultats démontrent que l'expression protéique du PXR est significativement diminuée de 38% ($p < 0,0005$) dans les foies de rats atteints d'IRC (Figure 1A). Afin de confirmer le rôle de la PTH dans cette diminution, nous avons évalué l'effet de la PTX. Lorsque les rats atteints d'IRC ont subi une PTX, la réduction de l'expression protéique de PXR est moindre que dans les foies de rats souffrants d'IRC ($p < 0,05$).

Nos résultats montrent que l'expression de l'ARNm de PXR est diminuée de 31% ($p < 0,02$) chez les rats présentant une IRC, alors que cette déficience disparaît chez les rats IRC-PTX (Figure 1B).

Nous avons aussi évalué l'expression protéique et génique de CAR et nous avons obtenu des résultats similaires à ceux de PXR, c'est-à-dire une diminution de l'expression de CAR (52% $p < 0,005$) dans les foies de rats atteints d'IRC et un renversement partiel de la déplétion de la PTH par une PTX (Figure 2A).

De plus, les résultats obtenus pour l'expression de l'ARNm de CAR sont similaires à ceux obtenus pour PXR. L'expression génique est diminuée de 45% ($p < 0,005$) chez les rats atteints d'IRC, alors que chez les rats IRC-PTX, la diminution n'est plus présente et le niveau d'expression de l'ARNm est équivalent aux rats témoins (Figure 2B).

Accumulation nucléaire de NF- κ B

Nous avons évalué l'activation de NF- κ B à l'aide de l'accumulation nucléaire de p65, une sous-unité du NF- κ B. La méthode de la cytométrie en flux nous a permis de mesurer les différences de fluorescence dans les noyaux des foies des rats témoins et des rats atteints d'IRC. Les résultats nous démontrent une augmentation de 52% ($p < 0,01$) de la quantité de p65 chez les rats atteints d'IRC versus les rats témoins (Figure 3A, 3B).

De plus, nous avons évalué par immunobuvardage de type Western la quantité de p65 présente dans les noyaux des foies des rats présentant une IRC. Nos

résultats montrent une accumulation de p65 de 55% ($p < 0,005$) dans les noyaux des foies des rats atteints d'IRC (Figure 3C).

Nous avons aussi évalué le degré de corrélation entre l'expression protéique du CYP3A et l'accumulation nucléaire de NF- κ B. Nous avons obtenus une corrélation inversement proportionnelle significative ($r^2 = 0,7181$, $p < 0,05$).

DISCUSSION

Nos résultats montrent une diminution significative de l'expression protéique et génique de PXR dans les foies des rats atteints d'IRC. De plus, lorsque les rats ont subi une PTX, l'expression de PXR est annulée (Fig 1). Des résultats similaires ont été obtenus pour les expressions génique et protéique de CAR (Fig 2). La diminution de l'expression de PXR et de CAR chez les rats atteints d'IRC et sa correction par une PTX, reproduisent exactement les résultats obtenus pour l'expression du CYP450 chez rats atteints d'IRC et des rats présentant une IRC et ayant subi une PTX (IRC-PTX) (Michaud, Naud et al. 2006). Ces données nous suggèrent que les expressions de PXR et CAR sont corrélées avec l'expression du CYP3A chez les rats atteints d'IRC, tout comme la correction chez les rats souffrants d'IRC ayant subi une PTX. Puisque le PXR et le CAR sont des facteurs nucléaires responsables de la transcription du CYP3A, il est possible que leurs diminutions soient impliquées dans celle du CYP450.

Tout comme l'IRC, la PTH semble impliquée dans l'expression protéique et génique de PXR et de CAR, puisque l'induction d'une PTX, qui a pour but de diminuer les concentrations sériques de PTH, mène à une correction des expressions de PXR et CAR chez les rats atteints d'IRC.

Puisque le NF- κ B est impliqué dans la régulation de PXR et CAR, nous avons voulu évaluer son implication dans la diminution du PXR, du CAR et du CYP3A chez les rats atteints d'IRC. Nous avons donc analysé l'accumulation de p65 (sous-unité du NF- κ B) dans les noyaux des foies de rats atteints d'IRC. Nos résultats obtenus en cytométrie démontrent que les rats souffrants d'IRC possèdent une plus grande quantité de p65 dans les noyaux de leur cellule comparativement aux rats témoins (Fig 3). Nous avons confirmé les résultats obtenus en cytométrie par un immunobuvardage de type Western. De plus, une corrélation effectuée entre l'expression protéique du CYP3A et l'accumulation nucléaire démontre une corrélation inversement proportionnelle puisque que plus l'expression protéique est réduite, plus il y a accumulation du NF- κ B. Ces résultats nous suggèrent que le NF- κ B est activé chez les rats atteints d'IRC.

En conclusion, notre étude, bien qu'incomplète, suggère que les facteurs nucléaires PXR et CAR sont impliqués dans la diminution du CYP450 observé chez les rats atteints d'IRC. De plus, PXR et CAR semblent aussi affectés par la PTH. L'activation du NF- κ B semble aussi être une voie impliquée dans cette diminution. Par contre, de nombreuses études supplémentaires doivent être effectuées afin de mieux comprendre la réduction du CYP450 chez les rats souffrants d'IRC. Premièrement, l'inclusion d'études *in vitro*, à l'aide d'un modèle de cellules en culture, pourrait nous permettre de mieux comprendre l'expression de PXR, de CAR et l'activation de NF- κ B. Ce modèle *in vitro* pourrait nous permettre l'utilisation

d'inhibiteurs des voies PKA, PKC ou de NF- κ B, pour mieux comprendre les relations entre ces voies et l'inhibition du CYP450, de PXR et de CAR. Finalement, l'utilisation de souris transgéniques PXR ou PXR/CAR pourrait nous aider à mieux comprendre l'implication des facteurs nucléaires dans l'inhibition des CYP450s en présence d'IRC.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par les Instituts de Recherche en Santé du Canada, le Fond de Recherche en Santé du Québec et la Fondation de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont.

Une partie de cette étude a été présentée à la 9^e conférence internationale de l'ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) à Istanbul (Turquie) du 4 au 8 septembre, 2010.

RÉFÉRENCES

1. Matzke, G.E. and R.F. Frey, *Drug dosing in patients with impaired renal function*, in *Pharmacotherapy: A pathophysiologic basis*, T.R. Pipiro JT, Hayes PE, Yee GC, Matzke GR, Posey ML, Editor 1992, Elsevier Science Publishing Inc: New York. p. 750-763.
2. Gibson, T.P., *Renal disease and drug metabolism: an overview*. Am J Kidney Dis, 1986. **8**(1): p. 7-17.
3. Matzke, G.R. and R.F. Frye, *Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity*. Drug Saf, 1997. **16**(3): p. 205-31.
4. Pichette, V. and F. Leblond, *Metabolism of drugs in chronic renal failure*. Recent Res Devel Drug Metabol Disposition, 2002. **1**: p. 43-56.
5. Pichette, V. and F.A. Leblond, *Drug metabolism in chronic renal failure*. Curr Drug Metab, 2003. **4**(2): p. 91-103.
6. Touchette, M.A. and R.L. Slaughter, *The effect of renal failure on hepatic drug clearance*. DICP, 1991. **25**(11): p. 1214-24.
7. Leblond, F., et al., *Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(2): p. 326-32.
8. Leblond, F.A., et al., *Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(11): p. 1317-20.

9. Guevin, C., et al., *Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(7): p. 1039-46.
10. Michaud, J., et al., *Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(8): p. 1067-77.
11. Michaud, J., et al., *Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 3041-8. Epub 2006 Oct 4.
12. Michaud, J., et al., *Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression*. J Pharmacol Sci, 2008. **108**(2): p. 157-63. Epub 2008 Oct 9.
13. Zordoky, B.N. and A.O. El-Kadi, *Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(2): p. 164-78.
14. Abdulla, D., et al., *The signal transduction pathways involved in hepatic cytochrome P450 regulation in the rat during a lipopolysaccharide-induced model of central nervous system inflammation*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(10): p. 1521-31.
15. Ke, S., et al., *Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39638-44.
16. Tian, Y., et al., *Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 510-5.

17. Morgan, E.T., T. Li-Masters, and P.Y. Cheng, *Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 207-10.
18. Lu, Z.G., et al., *Protein kinase Cdelta activates RelA/p65 and nuclear factor-kappaB signaling in response to tumor necrosis factor-alpha*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5927-35.
19. Gerlo, S., et al., *Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(23): p. 3823-41.
20. Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch, *Fast regulation of cytochrome P450 activities by phosphorylation and consequences for drug metabolism and toxicity*. Biol Chem, 2002. **383**(10): p. 1587-92.
21. Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch, *Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch*. Arch Biochem Biophys, 2003. **409**(1): p. 228-34.
22. Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch, *Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 446-9. Epub 2005 Aug 22.
23. Jansson, I., et al., *Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction*. Arch Biochem Biophys, 1990. **283**(2): p. 285-92.
24. Jansson, I., et al., *Inverse relationship between cytochrome P-450 phosphorylation and complexation with cytochrome b5*. Arch Biochem Biophys, 1987. **259**(2): p. 441-8.

25. Pyerin, W., F. Horn, and H. Taniguchi, *Posttranslational modifications of the cytochrome P-450 monooxygenase system*. J Cancer Res Clin Oncol, 1987. **113**(2): p. 155-9.
26. Galisteo, M., et al., *Involvement of cyclic nucleotide- and calcium-regulated pathways in phenobarbital-induced cytochrome P-450 3A expression in mouse primary hepatocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(3): p. 1270-7.
27. Sidhu, J.S. and C.J. Omiecinski, *cAmp-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12762-73.
28. Morgan, E.T., *Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?* Drug Metab Dispos, 2001. **29**(3): p. 207-12.
29. Ding, X. and J.L. Staudinger, *Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C*. Biochem Pharmacol, 2005. **69**(5): p. 867-73. Epub 2005 Jan 21.
30. LeHoux, J.G., G. Dupuis, and A. Lefebvre, *Regulation of CYP11B2 gene expression by protein kinase C*. Endocr Res, 2000. **26**(4): p. 1027-31.
31. Hara, H., Y. Yasunami, and T. Adachi, *Alteration of cellular phosphorylation state affects vitamin D receptor-mediated CYP3A4 mRNA induction in Caco-2 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(1): p. 182-8.
32. Klin, M., et al., *Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone*. J Clin Invest, 1996. **97**(10): p. 2167-73.

33. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.

FIGURES

Figure 1A

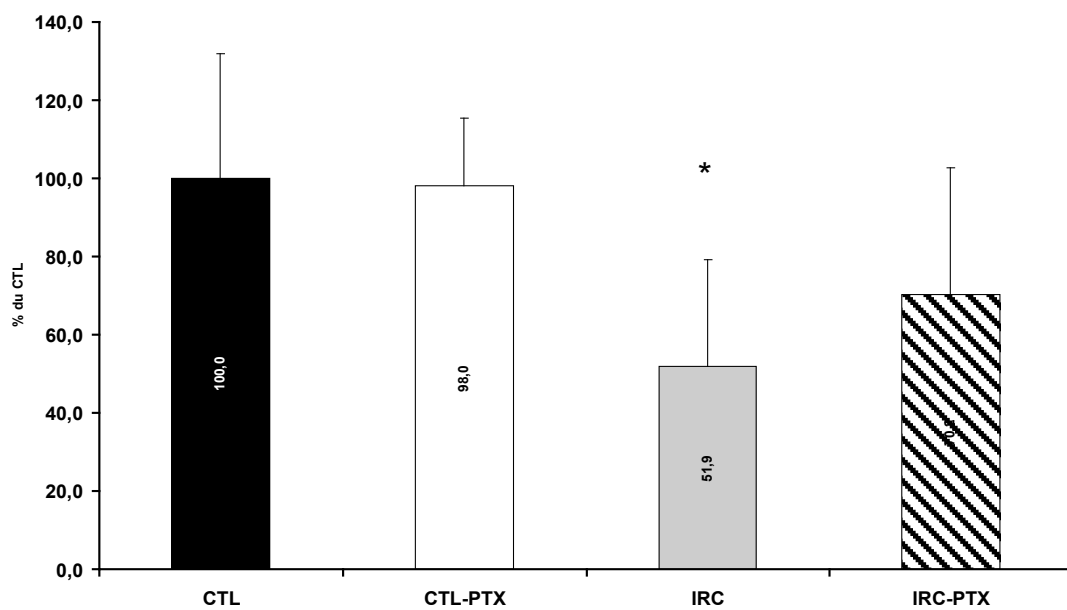


Figure 1B

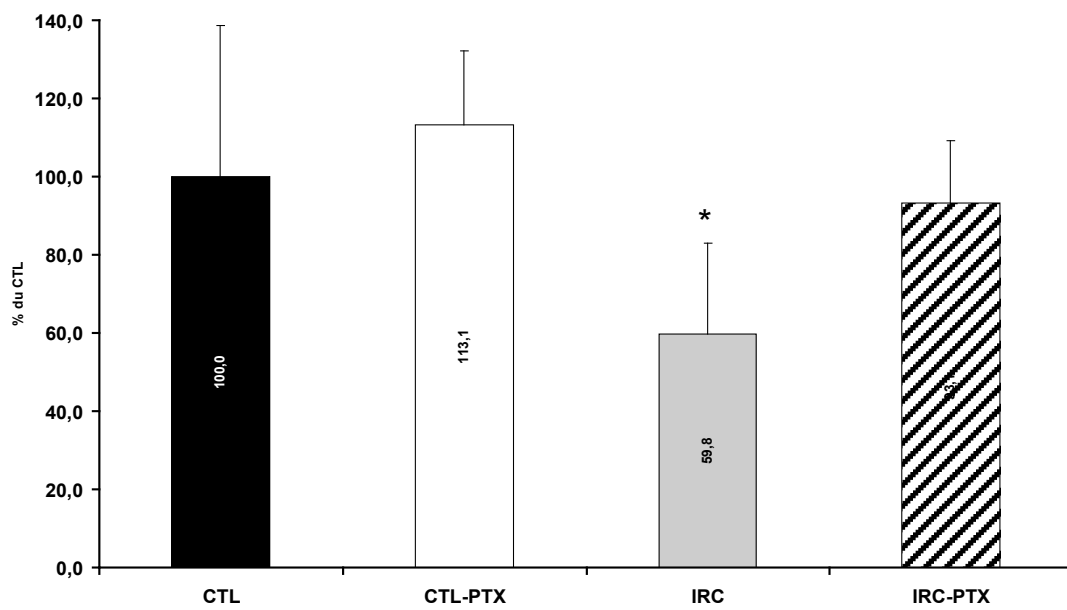


Figure 1 : Effet de l'IRC sur la diminution de l'expression protéique et génique de PXR. A- L'expression protéique de PXR a été mesurée à l'aide de l'immunobuvardage de type Western dans un homogénat de foie de rats témoins (noire), témoins ayant subi une PTX (blanche), atteints d'IRC (grise) et souffrants d'IRC ayant subi une PTX (hachurée). B- L'expression génique de PXR (ARNm) a été évaluée en real-time PCR suite à l'extraction de l'ARNm des foies des rats témoins (noire), témoins ayant subi une PTX (blanche), atteints d'IRC (grise) et souffrants d'IRC ayant subi une PTX (hachurée). Les résultats obtenus avec les rats témoins ont été définis à 100%. Les résultats sont présentés selon la moyenne \pm SD. * $p < 0,05$ comparé au groupe témoin et † $p < 0,05$ comparé au groupe IRC.

Figure 2A

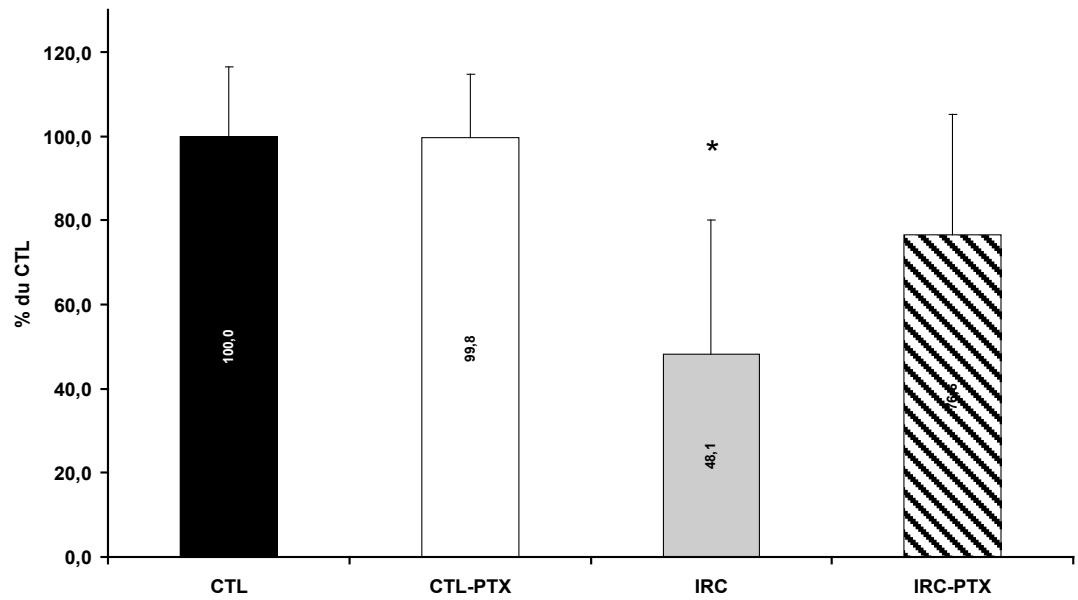


Figure 2B

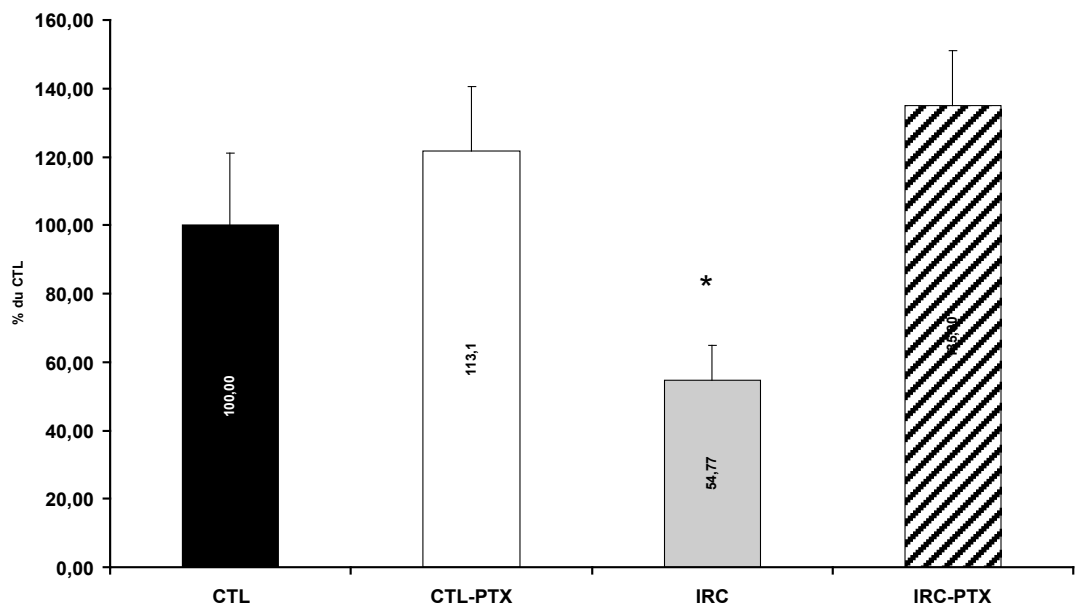


Figure 2 : Effet de l'IRC sur la diminution de l'expression protéique et génique de CAR. A- L'expression protéique de CAR a été mesurée à l'aide de l'immunobuvardage de type Western dans un homogénat de foie de rats témoins (noire), témoins ayant subi une PTX (blanche), atteints d'IRC (grise) et souffrants d'IRC ayant subi une PTX (hachurée). B- L'expression génique (ARNm) de CAR a été évaluée avec une real-time PCR suite à l'extraction de l'ARNm des foies des rats témoins (noire), témoins ayant subi une PTX (blanche), atteints d'IRC (grise) et souffrants d'IRC ayant subi une PTX (hachurée). Les résultats obtenus avec les rats témoins ont été définis à 100%. Les résultats sont présentés selon la moyenne \pm SD.

* $p < 0,05$ comparé au groupe témoin et † $p < 0,05$ comparé au groupe IRC.

Figure 3A

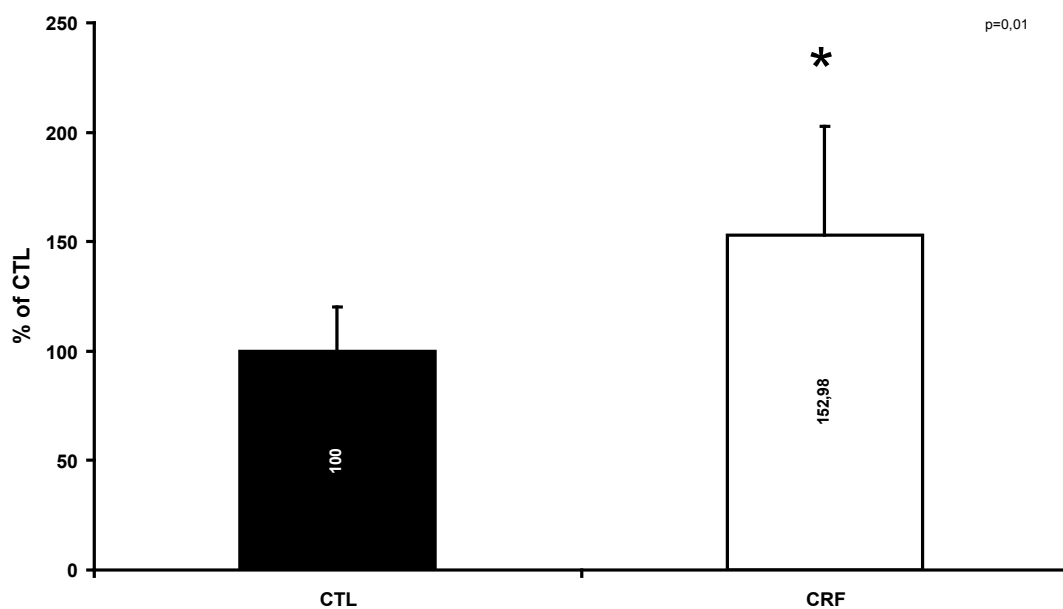


Figure 3B

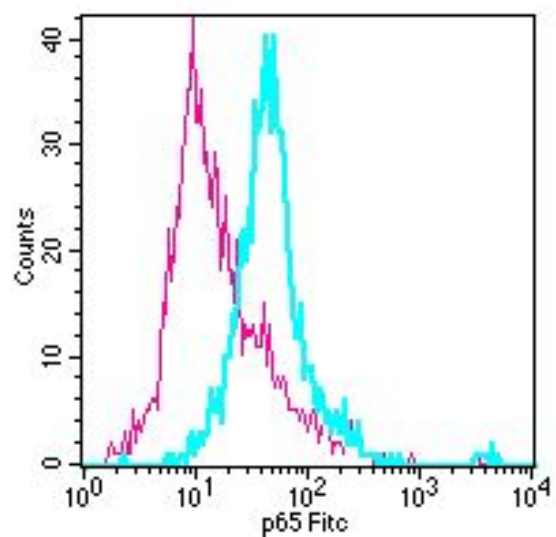


Figure 3C

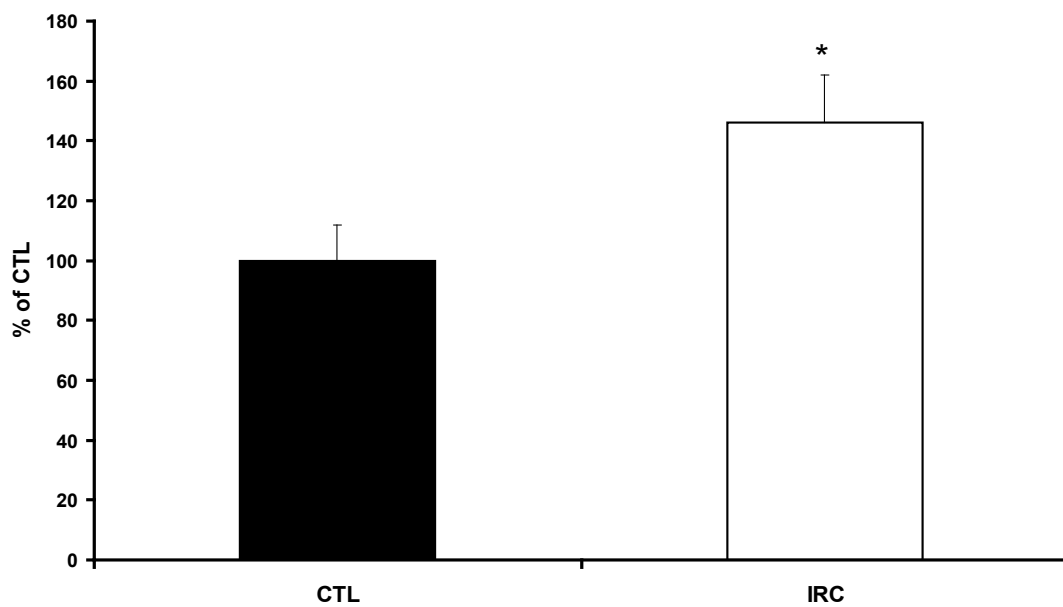


Figure 3D

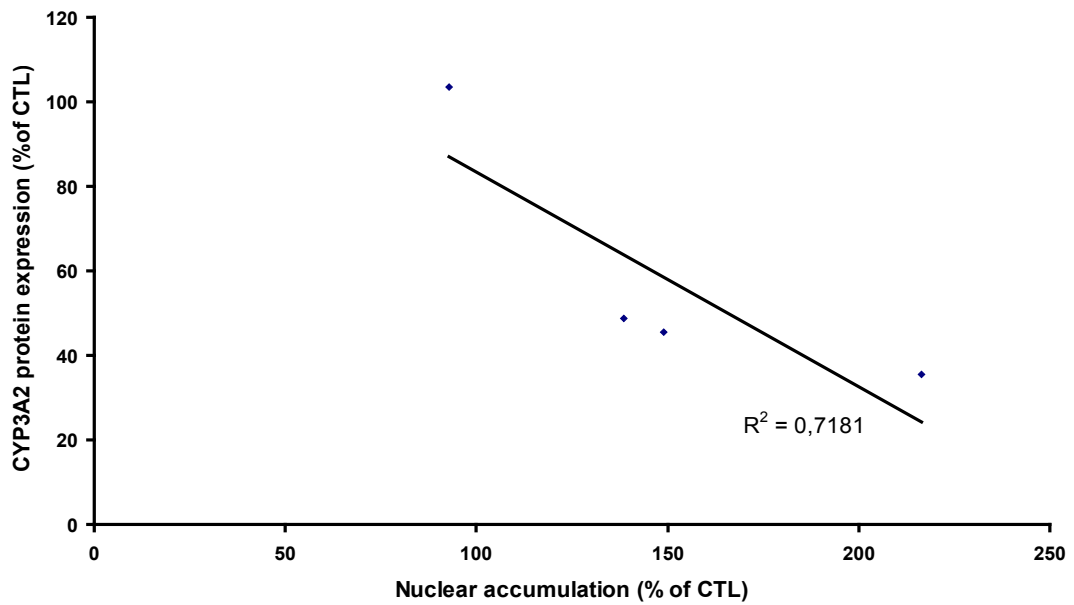


Figure 3 : Effet de l'IRC sur l'accumulation nucléaire de NF- κ B dans les foies de rats.

A- L'accumulation nucléaire de p65 a été évaluée par cytométrie en flux dans les foies des rats témoins (noire) et des rats atteints d'IRC (blanche). B- Représentation graphique de la fluorescence générée par la présence de p65 en cytométrie en flux dans les noyaux des foies des rats témoins (rose) et des rats souffrants d'IRC (bleu). C- L'accumulation nucléaire de p65 a été évaluée par immunobuvardage de type Western dans les extraits nucléaires des foies des rats témoins (noire) et les rats présentant une IRC (blanche). D- Corrélation entre l'expression protéique du CYP3A et l'accumulation nucléaire de p65. Les résultats obtenus avec les rats témoins ont été définis à 100%. Les résultats sont présentés selon la moyenne \pm SD. * $p < 0,05$ comparé au groupe témoin.

TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques biochimiques des rats (moyenne \pm SD)

n		CTL		IRC		CTL-PTX		IRC-PTX	
		9	\pm	14	\pm	6	\pm	5	\pm
	Poids g	370,2	6,6	295,0	14,0	355,2	20,4	367,0	14,1
	Créatinine μ mol/L	45,0	3,0	245,1 ^{a,d}	27,2	52,4	1,2	164,8 ^{b,c}	25,0
	Clairance μ L/100g par min	379,7	30,4	59,5 ^a	9,9	376,1	13,7	92,1	90,8
	Urée mmol/L	4,1	0,3	50,8 ^{a,d}	10,0	4,2	0,2	27,3 ^{b,c}	3,6
	25(OH)D mmol/L	95,3	5,1	40,2 ^a	7,6	84,8	2,0	102,7	23,1
	1,25(OH)2D pmol/L	100,5	14,6	26,7 ^a	11,9	90,1	29,9	40,1	23,5
	PTH pg/mL	90,2	6,4	1739,9 ^{a,d}	493,0	9,7 ^a	7,0	10,0 ^b	4,0

^a p < 0,05 versus groupe CTL

^b p < 0,05 versus groupe IRC

^c p < 0,05 versus groupe CTL-PTX

^d p < 0,05 versus groupe IRC-PTX

Tableau 2 : Numéro de référence des amorces PCR

Nom de l'amorce	Numéro de référence
CAR (Nr1i3)	Rn00576085_m1
PXR (Nr1i2)	Rn00583887_m1
CYP3A2	Rn00756461_m1
GAPDH	Rn99999916_s1

10. Discussion

Cette thèse de doctorat porte sur l'inhibition des CYP450s en présence d'insuffisance rénale chronique ainsi que sur le rôle que joue la PTH dans cette inhibition. Les résultats obtenus démontrent que non seulement les fonctions de détoxification du CYP450 sont diminuées en IRC, mais que certaines fonctions endogènes du CYP450 le sont aussi. De plus, nous avons mis en évidence *in vitro* qu'une séance de dialyse permet de diminuer le ou les facteurs sériques qui participent à l'inhibition des CYP450s dans les cas d'IRC. Finalement, nous avons aussi exploré les voies de signalisation impliquées dans l'inhibition des CYP450 dans les cas d'IRC.

10.1 Mise au point d'une méthode d'analyse de l'activité du CYP450.

Cette étude a été effectuée afin de valider une nouvelle méthode d'analyse du CYP3A chez le rat. Cette méthode a dû être adaptée à nos besoins puisqu'aucune autre méthode ne convenait pour le type de matériel avec lequel nous travaillions et les instruments mis à notre disposition. Nous avons ainsi mis sur pied un essai plus spécifique et plus sensible pour la détection de l'activité du CYP3A chez le rat (voir section 6. [Article 1](#)). Cet essai a été basé sur celui de Chauret (Chauret, Tremblay et al. 1999) et comprend l'utilisation d'un substrat le *benzyloxy-substituted lactone cyclooxygenase-2 inhibitor* (3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-

methysulfonyl phenyl] furan-2(5H)-one) (DFB) qui est métabolisé en 3-hydroxy-5,5-diméthyl-4-[4-(méthylsulfonyl)phényl] furan-2(5H)-one (DFH), un métabolite fluorescent, par une débenzénylation effectuée par le CYP3A.

Les autres essais alors disponibles étaient peu spécifiques, peu sensibles et demandaient un grand nombre de manipulations. Par exemple, la méthode classique de l'hydroxylation de la testostérone, la plus utilisée, comprend l'utilisation d'un HPLC pour la mesure de tous les métabolites formés. L'application de cette méthode à grande échelle est donc peu pratique. Bien que l'hydroxylation de la testostérone est un essai qui est très spécifique chez l'humain, chez le rat le métabolisme de la testostérone est effectué par plusieurs isoformes qui possèdent tous une sélectivité différente pour le produit (Waxman, Attisano et al. 1988, Chovan, Ring et al. 2007). À l'instar de la testostérone, de nombreux substrats sont utilisés chez l'humain afin d'évaluer l'activité des isoformes du CYP450. Par exemple, l'isoforme CYP3A4 chez l'humain métabolise le dextrométhorphan en 3-méthoxymorphinane, la nifédipine en nifédipine oxydée, le midazolam en 1'-hydroxymidazolam et en 4-hydroxymidazolam et finalement le triazolam en 1'-hydroxytriazolam (Liu, Hao et al. 2007). Par contre, chez le rat, ces substrats ne sont pas spécifiques à l'isoforme CYP3A, sauf pour la production de 4-hydroxymidazolam qui est majoritairement transformé (99%) par le CYP3A (Chovan, Ring et al. 2007). En résumé, les substrats spécifiques au CYP3A4 chez l'humain, tels que la testostérone, la nifédipine et le triazolam (Liu, Hao et al. 2007)

sont biotransformés par une variété d'isoformes chez le rat (CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13) (Chovan, Ring et al. 2007). En plus d'un manque de spécificité, les métabolites produits doivent être évalués par HPLC ou par LC/MS/MS, ce qui rend l'utilisation plus coûteux pour un petit laboratoire. Finalement, au Canada, l'utilisation de la testostérone est contrôlée par Santé Canada, des permis spéciaux doivent être accordés aux laboratoires qui en font la demande. Le temps de réponse et la complexité des formulaires de demandes pour ces permis est très longue et expire rapidement, ce qui n'était pas adapté pour l'utilisation que nous voulions en faire.

La N-déméthylation de l'érythromycine est une autre méthode utilisée et elle est très spécifique pour le CYP3A de rat. La biotransformation de l'érythromycine par le CYP3A induit la production de formaldéhyde. Le formaldéhyde produit est alors détecté avec un essai de NASH (Nash 1953). Cette méthode de détection du formaldéhyde est très sélective mais par contre, très peu sensible. Son manque de sensibilité rend difficile l'interprétation des résultats, puisque les quantités présentes sont trop faibles pour être détectées par cette méthode. Nous avons donc tenté de modifier la méthode et de changer soient les paramètres de temps d'incubation, la quantité de matériel de départ ou la quantité de réactif. Malheureusement, lorsqu'un de ces paramètres est changé, la réaction atteint alors un plateau et devient limitante, ce qui ne nous permet pas de faire des analyses quantitatives et comparatives. De plus, la quantité de microsomes requise pour

effectuer cet essai est très grande. Les microsomes sont isolés à partir de tissus ou de cellules en culture. Pour mes expérimentations, les cellules en culture étaient le plus souvent utilisées. Il était alors souvent impossible d'obtenir la quantité minimale de microsomes requise pour chacune des conditions testées. En conclusion, puisque cet essai était une méthode limitante, peu sensible et demandant une grande quantité de matériel de départ, nous avons préféré de ne pas utiliser cette méthode.

Au cours des années, de nombreuses compagnies ont développé des substrats du CYP3A fluorescents (Liu, Hao et al. 2007). Ils sont faciles à utiliser, rapides et spécifiques chez l'humain. Malheureusement, lorsqu'ils sont utilisés chez le rat, la grande majorité de ces substrats sont métabolisés par plusieurs CYP450s. Ce manque de spécificité, chez le rat, les rend difficiles à utiliser (Chovan, Ring et al. 2007).

La très grande demande de l'industrie et les besoins grandissants dans la compréhension du métabolisme des médicaments avant leur soumission aux organismes gouvernementaux ont fait avancer le développement de nouvelles techniques d'analyse. Plusieurs compagnies ont développé le service de *High-throughput screening* afin de déterminer le métabolisme d'une nouvelle molécule avant les premiers tests *in vivo*. Cette technique n'est malheureusement pas accessible à des laboratoires de recherche fondamentale. La nature des

échantillons ainsi que les coûts d'analyse sont des facteurs limitants. Aussi, de nombreuses compagnies telles que Promega, Applied Biosystem et Ab Sciex ont développé des substrats pour l'analyse de l'activité des CYP450s. Ces substrats sont luminescents, fluorescents ou radioactifs. Certains sont faciles à utiliser, rapides et spécifiques chez l'humain, pour d'autres les métabolites sont analysés par HPLC ou LC/MS/MS. Malheureusement, chez le rat, la grande majorité de ces substrats n'est pas spécifique au CYP3A et sont métabolisés par plusieurs isoformes du CYP450, ou tout simplement, la compagnie n'a jamais testé la spécificité de ces substrats chez d'autres espèces que l'humain.

La famille des CYP450s, est la plus grande et la plus importante famille d'enzymes de métabolisme des médicaments. Elle est aussi l'une des mieux préservée entre les espèces. En effet, tous les membres de cette superfamille enzymatique possèdent des régions d'acides aminés hautement conservées et présentent de très faibles disparités dans les séquences d'acides aminés entre les espèces (Lin 1995). Par contre, ces légères différences dans les séquences d'acides aminés provoquent une très grande variété dans la spécificité des substrats ainsi que dans leur activité catalytique. Par exemple, la substitution d'un seul acide aminé provoque des changements dans le site catalytique de l'enzyme (Guengerich 1997). C'est pourquoi les différents isoformes du CYP450 présentent des distinctions interspèces majeures dans le métabolisme des médicaments. Par exemple, il a été démontré que le rat n'est pas un bon modèle pour les études d'induction du

CYP3A4, puisque le CYP3A1/2 n'est pas induit par la rifampicine, un inducteur typique du CYP3A4 chez l'humain (Lu and Li 2001). Ceci explique pourquoi la spécificité d'un substrat pour le CYP3A4 chez l'humain n'est pas nécessairement transposable pour le CYP3A2 chez le rat (Martignoni, Groothuis et al. 2006).

La méthode du DFB/DFH a été développée par la compagnie Merck Frosst. En 2004, la compagnie avait démontré que le substrat DFB était très spécifique pour le CYP3A4 humain (Nicoll-Griffith, Chauret et al. 2004). Par contre, la spécificité du DFB chez le rat restait à démontrer. Nous avons donc entrepris de tester la spécificité du substrat DFB chez le rat, ainsi que la validation de l'essai dans les tissus extra-hépatiques.

Le premier objectif de ce projet était de déterminer la spécificité du DFB pour le CYP3A lors de son métabolisme. Pour ce faire, nous avons débuté par des tests de spécificité des anticorps commerciaux avec un immunobuvardage de type Western et des Supersomes™, une préparation commerciale de microsomes faite dans des cellules d'insecte exprimant une forme recombinante des différents isoformes. Nos résultats démontrent que les anticorps anti-CYP1A1 et anti-CYP3A1/2 sont spécifiques, alors que l'anticorps anti-CYP2D6 reconnaît les CYP2D1, 2D2 et 2C13 et que l'anticorps anti-CYP2C11 reconnaît les CYP2C6 et 2C13. Puisque les anticorps testés n'avaient pas de réaction croisée avec le CYP3A1/2, nous avons testé la spécificité de l'essai DFB par deux différentes méthodes. La

première consistait à évaluer l'effet de l'immuno-inhibition par les différents anticorps sur la production de DFH, un métabolite fluorescent, lors de l'incubation de Supersomes™ CYP3A1, de Supersomes™ CYP3A2, de microsomes de foie de rat et des microsomes d'intestin de rat. Tel qu'attendu, les résultats obtenus montrent que les anticorps inhibiteurs ont presque entièrement supprimé l'activité du CYP3A2, dans les Supersomes™ et dans les microsomes de foie et d'intestin. Aussi, ces résultats nous montrent que les préparations de microsomes d'intestin métabolisent aussi le DFB en DFH avec une activité inférieure aux microsomes de foie.

Par la suite, la spécificité du DFB a été évaluée à l'aide d'une variété de plusieurs Supersomes™. Nous avons incubé les différents Supersomes™ CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13, 2E1, 3A1 et 3A2 avec le DFB et nous avons mesuré la production de DFH par fluorescence. Nos résultats montrent que seul les Supersomes™ CYP3A1 et 3A2 possèdent la capacité de métaboliser le DFB en DFH, alors que les Supersomes™ CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13 et 2E1 possèdent une activité négligeable puisque la production de DFH est inférieure au contrôle négatif (cellules d'insecte sans expression d'isoforme). Tous ces résultats nous démontrent que le substrat DFB est uniquement métabolisé par le CYP3A1/2 chez le rat. Ces résultats obtenus confirment notre hypothèse selon laquelle l'utilisation du DFB/DFH constitue une méthode spécifique et rapide pour l'analyse de l'activité du CYP3A2 chez le rat.

Le substrat DFB développé par Merck Frosst avait été étudié principalement chez l'humain. En effet, en 1999, l'équipe de Chauret (Chauret, Tremblay et al. 1999) avait fait la démonstration que le substrat DFB était spécifique et débenzénylé uniquement par le CYP3A4 chez l'humain. La même équipe a aussi démontré (Nicoll-Griffith, Chauret et al. 2004), en 2004, que le substrat DFB était spécifique et métabolisé dans le foie de rat. Des études d'immuno-inhibition avaient été effectuées chez le rat mais la spécificité des anticorps n'avait pas été vérifiée. Comme il existe une très grande homologie entre les différentes familles et sous-familles d'isoformes du CYP450 de rat, ceci rend plus difficile le développement d'un anticorps reconnaissant un seul isoforme (Shou and Lu 2009). Nous avons pu mettre en évidence avec cet article que l'anticorps utilisé anti-CYP3A2 est spécifique et que la réaction d'immuno-inhibition observée n'est pas due à une dégradation protéique ou à une inhibition non-spécifique par des protéines sériques. En effet, notre étude démontre une production de DFH non-affectée dans les essais effectués avec des anticorps contre d'autres isoformes et aussi avec un anticorps anti-CYP3A2 qui ne bloque pas le site actif de l'enzyme. Nos résultats confirment les résultats obtenus par l'équipe de Merck Frosst (Chauret, Tremblay et al. 1999, Nicoll-Griffith, Chauret et al. 2004), à savoir que le substrat DFB est métabolisé par le CYP3A de rat. De plus, nous avons démontré que ce substrat est uniquement débenzénylé par le CYP3A chez le rat et qu'aucun autre isoforme testé (CYP1A1, 2B1, 2C6, 2C11, 2C13 ou 2E1) ne participe à sa transformation.

La précision de notre méthode a été évaluée à l'aide d'une répétition des mesures. Les mêmes préparations de microsomes ont été soumises à trois mesures de leur activité lors de différentes expérimentations séparées dans le temps. Les résultats obtenus variaient à l'intérieur d'une échelle de 5% (résultats non montrés), ce qui nous suggère que notre méthode est précise. L'exactitude de la méthode n'a pas été démontrée, puisqu'aucun étalon valable n'était disponible.

En plus d'être un substrat spécifique et efficace dans la mesure de l'activité hépatique du CYP3A chez le rat, notre étude a mis en évidence que l'essai DFB pouvait être utilisé dans un tissu extra-hépatique, c'est-à-dire l'intestin. De plus, nous avons testé l'utilisation du DFB dans l'analyse de l'activité du CYP3A dans le cerveau de rat (résultats non publiés). Nos résultats confirment que le DFB peut être utilisé dans d'autres tissus extra-hépatiques, comme l'intestin et le cerveau.

L'essai DFB développé et modifié est un essai facile à utiliser, spécifique et rapide. Malheureusement, les résultats de notre article sont maintenant difficiles à appliquer pour d'autres laboratoires, puisque le substrat auparavant synthétisé chez Merck Frosst n'est plus disponible. En tout premier lieu, le DFB avait été développé par la compagnie comme un inhibiteur potentiel des COX2, mais les tests plus poussés ont révélé que cet inhibiteur de COX2 et ses analogues étaient métabolisés très rapidement par le CYP3A. Son métabolisme très rapide et sa très courte

demi-vie *in vivo* le rendait non admissible pour le criblage de médicaments candidats. À ce moment, peu de substrats sélectifs fluorescents étaient connus. Donc, lors de son court développement, la compagnie a plutôt misé sur la capacité du DFB à être un substrat sélectif pour le CYP3A et a aussi synthétisé son métabolite fluorescent, le DFH, pour les essais *in vitro* du CYP3A. Avec la globalisation des activités du département du métabolisme des médicaments, Merck Frosst a décidé d'utiliser l'essai d'hydroxylation de la testostérone avec détection LC/MS/MS comme méthode standard pour toute la compagnie. L'essai a donc été centralisé et à ce moment Merck Frosst a arrêté l'utilisation et la production de DFB et de DFH.

En conclusion, l'essai DFB est une méthode efficace, hautement spécifique, fiable, rapide et peu coûteuse pour l'évaluation de l'activité du CYP3A chez le rat, non seulement dans le foie mais aussi dans l'intestin et le cerveau. L'adaptation et le développement de cet essai, nous a donc permis d'avoir un outil supplémentaire afin d'étudier les modulations de l'activité et de l'expression du CYP3A dans nos études subséquentes. Cette méthode a donc été utilisée pour les projets suivants. Par contre la disponibilité actuelle des substrats le rend difficile à reproduire dans d'autres laboratoires.

10.2 Effet de l'hémodialyse sur l'expression du CYP450.

L'objectif de ce projet de recherche était d'évaluer l'impact de la dialyse sur l'effet inhibiteur du sérum de patients atteints d'IRC sur le CYP450 de rat (voir section 7. [Article 2](#)). Pour ce faire, nous avons utilisé du sérum de patients atteints d'IRC soumis à des séances d'hémodialyse depuis au moins un mois. Les prélèvements ont été effectués juste avant (pré-HD) et 5 minutes après la séance (post-HD). Nos résultats montrent que l'incubation d'une culture primaire d'hépatocytes de rats avec du sérum provenant de patients atteints d'IRC post-HD prévient la diminution de l'expression habituellement observée du CYP1A, 2C et 3A par le sérum provenant de patients atteints d'IRC. En effet, l'expression protéique a été inchangée alors que l'expression génique a été significativement augmentée de plus de 80% de la valeur du contrôle suite à l'incubation des hépatocytes avec du sérum provenant de patients atteints d'IRC suite à une séance d'HD (post-HD). De plus, nous avons montré que l'activité du CYP3A, évaluée par le DFB, a été diminuée de 40% dans les hépatocytes incubés avec du sérum de patients atteints d'IRC avant une séance d'HD (pre-HD) alors que le sérum de patients présentant une IRC soumis à une séance d'HD (post-HD) a prévenu partiellement cette inhibition.

Précédemment, notre équipe a rapporté des inhibitions similaires de l'expression et de l'activité des CYP450s dans un modèle d'IRC chez le rat (Leblond, Giroux et al. 2000, Leblond, Guevin et al. 2001, Guevin, Michaud et al. 2002). Aussi, des effets similaires ont été rapportés dans un modèle d'hépatocytes incubés avec

du sérum humain obtenu avant une séance de dialyse chez des patients atteints d'IRC (Michaud, Dube et al. 2005).

La présente étude démontre pour la première fois qu'il n'y a pas d'effet sur l'expression et l'activité des CYP450s dans des hépatocytes lorsque le sérum est obtenu après une séance d'hémodialyse. Seule une transplantation rénale mène à une amélioration soutenue de l'état urémique et du métabolisme hépatique des médicaments (Kim, Shin et al. 1993). Les séances d'hémodialyse améliorent temporairement l'urémie mais ne produisent pas d'amélioration d'expression de CYP450 à long terme, puisque nous avons déjà montré que l'inhibition du sérum de patients atteints d'IRC avant une séance d'HD (pré-HD) persiste malgré des traitements chroniques d'hémodialyse (Michaud, Dube et al. 2005).

Les causes de la diminution de l'expression et de l'activité des CYP450s observées dans les cas de maladies rénales chroniques restent à préciser. De nombreuses études indiquent que les toxines urémiques telles que l'urée, la PTH, l'indoxyl sulfate et les cytokines pro-inflammatoires peuvent jouer un rôle via des modifications transcriptionnelles ou traductionnelles des enzymes du CYP450 (Guevin, Michaud et al. 2002, Sun, Huang et al. 2004, Michaud, Dube et al. 2005, Michaud, Naud et al. 2006). Par exemple, notre équipe a déjà démontré que l'incubation des hépatocytes de rats normaux avec du sérum de rats ou de patients atteints d'IRC provoque une diminution de plus de 45% de l'expression protéique de

plusieurs isoformes du CYP450 secondairement à la réduction de l'expression génique (Guevin, Michaud et al. 2002, Michaud, Dube et al. 2005). De plus, nous avons aussi rapporté que la PTH est un facteur majeur dans la réduction de l'expression des isoformes hépatiques du CYP450 observée dans les modèles expérimentaux d'IRC (Michaud, Naud et al. 2006).

Les résultats obtenus lors de la présente étude semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle la dialyse élimine l'effet inhibiteur du sérum de patients présentant une IRC sur le CYP450. Afin de mieux comprendre le phénomène, nous voulions évaluer quel mécanisme intracellulaire était impliqué dans la diminution du CYP450 dans les hépatocytes en culture en présence de sérum pré-HD. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur général de la voie de signalisation du NF- κ B, l'andrographolide. Nos résultats ont montré que l'ajout de l'andrographolide dans le milieu de culture des hépatocytes mis en présence du sérum de patients atteints d'IRC avant une séance d'HD (pré-HD) prévenait la diminution de l'expression protéique et génique du CYP2C et 3A.

Nous avons ainsi montré que le NF- κ B est un facteur transcriptionnel impliqué dans la diminution du CYP450 causée par le sérum de patients atteints d'IRC, puisque l'inhibition de la voie du NF- κ B annihile presque entièrement l'effet du sérum de patients présentant une IRC avant une séance d'HD (pré-HD) sur l'expression des CYP450s. Ces résultats suggèrent que des médiateurs présents en

IRC agissent via la voie de signalisation du NF- κ B. De façon intéressante, la voie de signalisation du NF- κ B est celle empruntée entre autres par les cytokines et la PTH (Guillen, Martinez et al. 2002, Michaud, Naud et al. 2006). Une séance d'hémodialyse pourrait diminuer de façon aiguë la concentration des cytokines et de la PTH. Nous savons que la PTH est une molécule de trop grand poids moléculaire pour être filtrée via la membrane du filtre de dialyse. Cependant, une étude suggère que la PTH peut se lier, par adsorption, sur certains types de filtres dont le type utilisé chez nos patients (soit le polysulfone). Ce phénomène expliquerait la diminution de la concentration plasmatique de PTH après une séance de dialyse (Balducci, Coen et al. 2004). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré une réduction de la concentration de certaines cytokines après une hémodialyse (Haase, Bellomo et al. 2007, Hirasawa, Oda et al. 2007). Par contre, ces résultats sont controversés puisque certaines études ont aussi démontré que la concentration des cytokines pro-inflammatoires peut être plus élevée après une séance d'hémodialyse. L'activation des monocytes suite à leur liaison sur certains filtres causerait l'augmentation de la concentration de certaines cytokines (Muniz-Junqueira, Braga Lopes et al. 2005). De plus, l'inflammation au site de l'accès vasculaire de l'hémodialyse provoquerait une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoire telles que l'IL-6 et le TNF- α (Coli, Donati et al. 2011). Par ailleurs, les atteintes endothéliales, ainsi que l'état inflammatoire des patients atteints d'IRC contribueraient à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoire circulantes (Galli

2007, Carrero and Stenvinkel 2010, Santoro, Bellinghieri et al. 2010, Libetta, Sepe et al. 2011).

Nous avons évalué les caractéristiques biochimiques des sérums de patients atteints d'IRC avant une séance d'HD (pré-HD) et après une séance d'HD (post-HD) (données non publiées). Comme attendu, les concentrations d'urée et de créatinine ont été fortement diminuées après une séance de dialyse. De plus, la concentration de PTH a été réduite de près de 30% après la séance d'hémodialyse. Par contre, lors notre étude, nous n'avons pas eu la chance d'évaluer l'effet de la dialyse sur les concentrations de cytokines pro-inflammatoires. De plus, une équipe a démontré récemment une corrélation indirectement proportionnelle entre l'augmentation des concentrations des cytokines pro-inflammatoires et la diminution de la sécrétion de PTH chez les individus en dialyse (Feroze, Molnar et al. 2011). L'ajout d'une expérience, où les cytokines seraient mesurées, pourrait nous permettre de mieux comprendre l'effet de la dialyse sur les changements de concentrations des cytokines pro-inflammatoires et son lien avec la PTH.

Plus récemment, l'équipe de Molanaei a démontré une corrélation entre le degré d'inflammation (mesuré à l'aide de la protéine CRP) et l'activité du CYP3A4 (mesuré à l'aide de l'alprazolam) chez des patients atteints d'IRC suite à une séance d'hémodialyse (Molanaei, Stenvinkel et al. 2012). Cette étude suggère que l'inflammation joue un rôle dans la diminution de l'activité du CYP3A4 chez ces

patients. Malheureusement, cette étude n'a pas mesuré les changements de concentrations des cytokines, ni les modifications de l'activité du CYP3A4 induites par la séance d'hémodialyse.

Les changements dans la clairance métabolique des substrats du CYP450 ne peuvent être expliqués uniquement par des modifications transcriptionnelles et traductionnelles. Par exemple, une équipe a démontré la capacité du sérum d'individus atteints d'IRC à produire des modifications post-traductionnelles du CYP450. En effet, il y a plus de 20 ans, l'équipe de Terao a démontré, à l'aide d'un modèle de perfusion de foie de rat isolé, un changement dans la clairance hépatique intrinsèque du propranolol, un substrat du CYP2D6 (Terao and Shen 1985). La perfusion d'un foie de rat normal avec du sérum de rats atteints d'IRC a provoqué une diminution de 50% de la clairance du propranolol comparée à une expérience témoin (foie normal perfusé avec du sérum de rats témoins). Une réduction similaire a été observée lors de la perfusion d'un foie de rat souffrant d'IRC avec du sérum de rats urémiques. De plus, la perfusion d'un foie de rat présentant une IRC avec du sérum de rat normal n'a pas changé la clairance de propranolol à des valeurs similaires observées dans l'expérience témoin. Cette étude montre que la diminution de la clairance de propranolol est causée par la présence de facteurs sériques contenus dans le sérum de rats atteints d'IRC.

L'étude de Yoshitani a démontré des résultats similaires à l'équipe de Terao. Ils ont démontré que le métabolisme du losartan, un substrat du CYP2C9 et du 3A4, était identiques dans les microsomes provenant de rats urémiques comparé à des hépatocytes incubés avec du sérum provenant de rats atteint d'IRC (Yoshitani, Yagi et al. 2002). Par contre, le métabolisme du losartan a été réduit de près de 50% lorsque les microsomes de rats témoins ont été incubés en présence de sérum de rats atteints d'IRC. De plus, l'incubation des microsomes avec la toxine indoxyl sulfate a provoqué la réduction du métabolisme du losartan de 30% (Yoshitani, Yagi et al. 2002).

L'équipe de Taburet a démontré que la présence de sérum de patients atteints d'IRC lors de l'incubation de microsomes de foie humain avec le midazolam, un substrat du CYP3A4, a induit une diminution de l'activité du CYP3A4 de 80%, comparée à une expérience témoin (Taburet, Vincent et al. 1996). Finalement, en 2006, l'équipe de notre collaborateur Dr Nolin avait mis en évidence que la clairance hépatique intrinsèque de l'érythromycine, un substrat du CYP3A4, était significativement améliorée par une séance d'hémodialyse chez les patients souffrants d'IRC (Nolin, Appiah et al. 2006). La faiblesse de cette étude est qu'aucun groupe témoin (volontaires sains) n'a été inclus. De façon intéressante, cette étude nous démontre que la concentration de TNF- α , une cytokine, est significativement diminuée suite à une séance d'hémodialyse. De plus, contrairement à nos observations, les concentrations de PTH sont inchangées dans l'étude de Nolin. Le

type de membrane de l'hémodialyseur, la méthode d'analyse de la PTH ainsi que la nature de la PTH mesurée (PTH 1-34 versus PTH 1-84) pourraient expliquer les différences observées entre nos résultats et ceux de l'équipe de Nolin. Finalement, la sonde utilisée, l'érythromycine, est un substrat du CYP3A4 mais ce médicament est importé dans l'hépatocyte via les transporteurs membranaires d'influx tel que l'OATP2. Il a déjà été démontré que le transport de l'érythromycine est modifié en présence de toxines urémiques (ce sujet sera discuté plus bas) (Sun, Huang et al. 2004) et donc la contribution d'une modification du transport hépatique ne peut être exclue (Nolin, Appiah et al. 2006).

Puisque les résultats lors de notre étude sont obtenus rapidement (quatre heures de dialyse), ceci nous suggère que les modulations de l'activité des isoformes du CYP450 peuvent être indépendante d'une modification transcriptionnelle ou traductionnelle. Les changements dans les concentrations des différentes toxines urémiques pourraient donc induire des modifications dans l'activité des CYP450s chez les patients atteints d'IRC. Dans la présente étude, nous avons montré une modification *in vitro* de l'expression des CYP450s, dans un modèle d'hépatocytes en culture lorsqu'ils ont été incubés, pendant 24 heures, avec du sérum de patients atteints d'IRC après une séance de dialyse. Par contre, il est difficile d'évaluer l'effet réel d'une séance d'hémodialyse *in vivo* chez ces patients. Nous pourrions prédire que l'exposition à de grandes concentrations de toxines urémiques pourrait induire des altérations de l'expression des CYP450s *in vivo*, malgré la réduction de leurs

concentrations après une séance d'hémodialyse. Par ailleurs, si les séances de dialyse menaient une réduction significative et continue des concentrations de toxines urémiques, nous pourrions alors observer une normalisation de l'expression des CYP450s via des modifications transcriptionnelles et traductionnelles. De plus, il est connu que l'hémodialyse conventionnelle est rapide et efficace pour retirer les molécules de faibles poids moléculaires, dont certaines sont des toxines urémiques. Il est donc possible que l'incubation du sérum post-HD, transitoirement vidé de ses toxines urémiques avec les hépatocytes n'a pas d'effet sur l'expression des CYP450s *in vitro*, mais ne concorde pas avec le phénomène réel *in vivo*. Malheureusement, l'obtention de biopsies de foie humain est très invasive et est techniquement et éthiquement difficile à obtenir. Ces foies pourraient cependant nous aider à mieux comprendre les modulations de l'expression des CYP450s *in vivo* chez nos patients lors d'un traitement d'hémodialyse.

Outre la diminution du métabolisme, une diminution du transport des médicaments pourrait expliquer les changements pharmacocinétiques chez les individus atteints d'IRC. En effet, l'équipe de Sun a démontré une diminution du transport hépatique de l'érythromycine par les hépatocytes incubés avec la toxine urémique l'acide 3-carboxy-4-méthyl-5-propyl-2-furan-propanoic (CMPF) via la diminution de l'expression protéique et de l'activité du OATP2 (Sun, Huang et al. 2004). Des études similaires dans notre laboratoire ont démontré une diminution de l'expression protéique de l'OATP2 dans un modèle expérimental de rats atteints

d'IRC (*in vivo*), ainsi que dans des hépatocytes incubés avec du sérum de rats souffrants d'IRC (*in vitro*) (Naud, Michaud et al. 2008). Le transport hépatique est la première étape de l'élimination de nombreux médicaments, puisqu'il permet l'exposition de ces composés aux enzymes de détoxification (Yamazaki, Akiyama et al. 1996, Sun, Frassetto et al. 2006, Reyes and Benet 2011). Par conséquent, une diminution de l'expression de l'OATP pourrait expliquer la réduction de l'élimination de certains médicaments par le foie, dans les études précédentes (Sun, Huang et al. 2004, Sun, Frassetto et al. 2006). Plus récemment, l'équipe de Reyes a démontré que les toxines urémiques, ainsi que le sérum de patients atteints d'IRC causaient une modification du transport hépatique du losartan et de l'eprosartan (Reyes and Benet 2011). La modification du transport de certains médicaments pourrait expliquer pourquoi des études démontrent une diminution de leur métabolisme dans des modèles expérimentaux d'IRC sans modification transcriptionnelle ou traductionnelle des CYP450s.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'hémodialyse n'affecte pas l'expression protéique et génique (CYP1A1, 2C11 et 3A2) ainsi que l'activité de l'isoforme CYP3A2. Ces enzymes sont diminuées dans les hépatocytes en culture incubés avec du sérum de patients atteints d'IRC. Les données obtenues corroborent donc celles de l'étude du Dr Nolin qui indiquent que *in vivo* l'hémodialyse améliore à court terme la clairance intrinsèque de l'érythromycine (Nolin, Appiah et al. 2006). Nos résultats suggèrent l'implication d'une ou plusieurs toxines urémiques

dialysables et que *in vivo* le mécanisme est post-transcriptionnel puisque son action est rapide (environ 4 heures) tandis que *in vitro* le mécanisme est transcriptionnel.

10.3 Effet de l'IRC sur l'hydroxylation de la vitamine D.

Depuis plusieurs années, notre laboratoire a exploré l'effet de l'IRC sur plusieurs isoformes hépatiques du CYP450 importants dans le métabolisme des médicaments. Cependant, les fonctions endogènes du CYP450 sont très nombreuses et variées telles que la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, des prostaglandines et des acides gras, l'oxydation des lipides et l'hydroxylation de la vitamine D (Lewis 2001). Le troisième objectif de mon projet de doctorat était de connaître l'effet de l'IRC sur une des fonctions endogènes du CYP450 : la synthèse de la vitamine D (voir section 8. [Article 3](#)).

Les patients atteints d'IRC présentent une déficience importante en calcidiol [25(OH)D₃], ce qui pourrait expliquer en partie la carence en calcitriol [1,25(OH)₂D₃]. Les causes de cette déficience en 25(OH)D₃ demeurent inconnues mais certains spécialistes suggèrent qu'une carence alimentaire ou une diminution de l'exposition au soleil en seraient responsables (Gonzalez, Sachdeva et al. 2004, LaClair, Hellman et al. 2005, Elder and Mackun 2006, Bouchard, Ouimet et al. 2009). Puisque la synthèse de 25(OH)D₃ est effectuée par des CYP450 au niveau hépatique, nous avons émis l'hypothèse que la déficience en 25(OH)D₃ en présence d'IRC pourrait

s'expliquer par un défaut de synthèse secondaire à une diminution de l'activité des CYP450s dans le foie.

Tout d'abord, la vitamine D doit être hydroxylée en position 25 ($25(\text{OH})\text{D}_3$) et ensuite en position 1 pour être active ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). L'hydroxylation en position 25 s'effectue dans le foie par les CYP450s (CYP2C11, 2J3, 2R1, 3A4 et 27A1) (Ohyama and Yamasaki 2004), alors que l'hydroxylation en position 1 est réalisée au niveau du rein par la 1α -hydroxylase (CYP27B1) (voir figure 10). Il est connu que la 1α -hydroxylase est réduite chez les patients souffrant d'IRC, causant une diminution de la vitamine D active ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (Levi and Silver 2005, Silver and Levi 2005, Silver and Levi 2005).

Dans la présente étude, nous avons montré une diminution significative de la concentration de $25(\text{OH})\text{D}_3$ chez les rats atteints d'IRC. Nous avons aussi mis en évidence une corrélation entre la clairance de créatinine (un indice de sévérité de l'IRC) et les concentrations de $25(\text{OH})\text{D}_3$ chez les rats souffrants d'IRC. De plus, notre étude a montré une corrélation négative entre les niveaux de PTH et les concentrations de $25(\text{OH})\text{D}_3$ chez les rats atteints d'IRC. Ensuite, nous avons évalué l'impact de l'IRC sur l'activité 25-hydroxylase hépatique *in vivo* et *in vitro*. L'injection de vitamine D_3 et de 1α -hydroxyvitamine D_3 a permis de montrer la diminution de la production de $25(\text{OH})\text{D}_3$ et de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vivo*, suggérant une diminution de l'activité C25-hydroxylase chez les rats atteints d'IRC. De plus, la culture

d'hépatocytes en présence de sérum de rats atteints d'IRC et de vitamine D₃, a mis en évidence la réduction de l'activité C25-hydroxylase dans un modèle *in vitro*. Les résultats obtenus nous suggéraient l'implication de facteurs sériques présents en présence d'IRC dans la réduction de la 25-hydroxylation de la vitamine D₃.

Nous avons donc voulu mieux comprendre l'implication de la PTH, un médiateur sérique fortement augmenté en présence d'IRC, dans la réduction de l'activité de la 25-hydroxylase. Nous avons utilisé quatre groupes de rats : témoins, IRC, témoins ayant subi une parathyroïdectomie (témoins-PTH) et IRC-PTH. Nos résultats ont montré que la PTH chez les rats atteints d'IRC (IRC-PTH) a permis d'obtenir des concentrations de 25(OH)D₃ similaires à celles des rats témoins.

Ensuite, nous avons évalué l'expression des isoformes hépatiques responsables de l'hydroxylation de la vitamine D₃, chez les rats atteints d'IRC. Nos résultats ont montré une diminution significative de l'expression protéique des CYP2C11, 2J3, 3A2 et 27A1 et une expression génétique similaire sauf pour le CYP27A1. De plus, la PTH a prévenu partiellement l'inhibition des CYP450s hépatiques.

Nous avons aussi évalué l'expression du CYP24 rénal, responsable du catabolisme de la 25(OH)D₃, chez les rats atteints d'IRC et les rats témoins. Nos résultats ont montré que les expressions protéique et génique du CYP24 rénal n'ont

pas été modifiées chez les rats présentant une IRC. De plus, afin d'exclure une augmentation de dégradation de la 25(OH)D₃ chez les rats IRC, nous avons dosé la 24,25(OH)₂D₃, le métabolite inactif produit suite au catabolisme par le CYP24. Nos résultats ont montré une réduction significative de la concentration de 24,25(OH)₂D₃ chez les rats présentant une IRC par rapport aux rats témoins. Une hausse de la dégradation ne peut donc pas expliquer la diminution de la 25(OH)D₃ observée dans notre étude et renforce l'hypothèse d'une diminution de la synthèse.

L'étude de Takemoto démontre une diminution significative de l'expression du CYP24 chez les rats atteints d'IRC, par contre, aucune déficience en 25(OH)D₃ n'a été observée (Takemoto, Shinki et al. 2003). Contrairement à cette étude, l'étude de Helvig présente une forte augmentation de l'expression génique du CYP24 chez les rats atteints d'IRC avec une faible réduction de la 25(OH)D₃ (Helvig, Cuerrier et al. 2010). Ces résultats discordants pourraient être expliqués par le modèle d'IRC. Dans l'étude de Takemoto, il s'agit d'un modèle de néphrectomie 5/6^e mais les rats possèdent de faibles concentrations de créatinine, alors que dans l'étude de Helvig, les auteurs utilisent un modèle induction de l'IRC à l'adénine. Ceci pourrait expliquer pourquoi notre étude et les deux autres présentent trois résultats différents dans l'expression du CYP24 chez les rats atteints d'IRC.

Finalement, nous avons évalué l'effet *in vivo* de la PTH chez des rats témoins sur la synthèse de 25(OH)D₃ et l'expression des CYP450s hépatiques. Les résultats

obtenus ont montré une diminution de la synthèse de 25(OH)D₃ chez les rats infusés avec de la PTH et la réduction des expressions protéique et génique des CYP2C11, 2J3 et 3A2.

Nos travaux montrent que la déficience en 25(OH)D₃ observée chez les rats souffrants d'IRC est secondaire à une diminution de la synthèse hépatique. Plusieurs études ont suggéré une carence alimentaire ou une réduction de l'exposition solaire pour expliquer la forte prévalence de la carence en 25(OH)D₃ chez les patients atteints d'IRC (LaClair, Hellman et al. 2005, Binkley, Novotny et al. 2007). Dans la présente étude, afin d'éliminer l'effet d'une malnutrition, les rats témoins ont été soumis à la même diète que les rats atteints d'IRC (*pair-fed*). De plus, tous les rats ont été soumis aux mêmes conditions environnementales (exposition à la lumière dans un environnement contrôlé). Les rats atteints d'IRC ont montré une diminution significative de la concentration sérique de 25(OH)D₃. Ces résultats nous permettent d'exclure la participation de la malnutrition ainsi que les différences de biosynthèse du précurseur de vitamine D₃ par les cellules de la peau pour expliquer la diminution de la concentration de 25(OH)D₃ chez nos rats atteints d'IRC.

L'IRC induit par la néphrectomie 5/6^e est fréquemment associée à de la protéinurie (Okuda, Oh et al. 1985, Esposito, Villa et al. 2009). L'augmentation de la perte urinaire de 25(OH)D₃ est une autre hypothèse souvent avancée pour expliquer la déficience en 25(OH)D₃ observée en présence d'IRC (Goldstein, Haldimann et al.

1981, Sato, Gray et al. 1982, Auwerx, De Keyser et al. 1986). Nous avons évalué les niveaux de 25(OH)D₃ dans l'urine des rats atteints d'IRC et des rats témoins. Nous avons observé une différence non-significative dans les concentrations urinaire de 25(OH)D₃ entre les deux groupes. Cependant, cette différence dans les concentrations urinaires n'est pas assez importante pour expliquer la déficience en 25(OH)D₃ observée chez les rats atteints d'IRC et n'est pas expliquée par une augmentation de la perte urinaire.

Notre étude montre pour la première fois, que l'IRC provoque un changement dans l'activité de la vitamine D₃ 25-hydroxylase. Les implications cliniques de ces découvertes sont très importantes. Les résultats pourraient expliquer les variations observées dans les concentrations de 25(OH)D₃ lors du traitement à la vitamine D₃ chez les patients atteints d'IRC, comparé à des patients ne présentant pas de maladies rénales (Gonzalez, Sachdeva et al. 2004, LaClair, Hellman et al. 2005, Elder and Mackun 2006, Levin, Bakris et al. 2007, Bouchard, Ouimet et al. 2008, Bouchard, Ouimet et al. 2009). De plus, nos résultats pourraient nous permettre d'expliquer la moindre efficacité du médicament One-Alpha® (alfacalcidol ou 1 α -hydroxyvitamine D₃) versus le médicament Rocaltrol® (calcitriol ou 1,25-dihydroxyvitamine D₃) chez les patients souffrants d'IRC.

Notre laboratoire a déjà montré que l'IRC provoque la diminution de l'expression de plusieurs isoformes du CYP450 responsables du métabolisme des

médicaments, chez l'humain et chez le rat (Leblond, Giroux et al. 2000, Leblond, Guevin et al. 2001, Michaud, Dube et al. 2005). De façon intéressante, certains isoformes hépatiques diminués dans les cas d'IRC sont aussi ceux impliqués dans la 25-hydroxylation de la vitamine D₃ (Miller and Portale 2003, Niwa, Murayama et al. 2009). Notre étude montre que l'IRC diminue l'expression de nombreux isoformes du CYP450 tels que le CYP2C11, 2J3, 3A2 et 27A1, alors que le CYP2R1 demeure inchangé. L'abondance relative des différents isoformes du CYP450 impliqués dans la synthèse du 25(OH)D₃ demeure controversée, mais de nombreuses études suggèrent que le CYP2C11, 2J3 et 3A2 sont les isoformes les plus importants dans la synthèse hépatique du 25(OH)D₃ chez le rat (Ohyama and Yamasaki 2004, Yamasaki, Izumi et al. 2004). La diminution de l'expression des CYP450s pourrait donc expliquer la réduction de la synthèse de 25(OH)D₃ chez nos rats atteints d'IRC.

L'utilisation d'inhibiteur spécifique du CYP450 provoque des modifications dans la production de la 25(OH)D₃. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs du CYP3A tel que l'isoniazide cause une diminution significative des concentrations de 25(OH)D₃, suggérant ainsi que l'inhibition du CYP3A provoque la diminution de l'hydroxylation de la 25(OH)D₃ (Brodie, Boobis et al. 1981, Bengoa, Bolt et al. 1984, Desta, Soukhova et al. 2001). La cimetidine, un autre inhibiteur connu du CYP3A, cause aussi une réduction de la concentration de 25(OH)D₃ (Bengoa, Bolt et al. 1984). En plus des xénobiotiques et de l'IRC, l'expression et l'activité du CYP450 peuvent être réduites par certaines conditions telles que l'inflammation et l'insuffisance hépatique. De

façon intéressante, la présence de ces conditions provoque une réduction significative des concentrations de 25(OH)D₃ (Abbott-Johnson, Kerlin et al. 2011, Bang, Novovic et al. 2011, Reid, Toole et al. 2011). La diminution des concentrations de la 25(OH)D₃ pourrait donc être reliée à l'inhibition des CYP450s dans les cas d'inflammation et d'insuffisance hépatique via une réduction de la 25-hydroxylase. Il s'agit d'un lien supplémentaire qui renforce notre hypothèse selon laquelle la diminution de la synthèse de la 25(OH)D₃ est reliée à l'inhibition des CYP450s dans les cas d'IRC.

Les études précédentes dans notre laboratoire ont montré la présence d'un ou des facteurs sériques causant la diminution de l'expression des CYP450s chez les rats ou les humains atteints d'IRC (Guevin, Michaud et al. 2002, Michaud, Dubé et al. 2005). Nous avons donc voulu tester l'hypothèse qu'un ou des facteurs sériques étaient aussi impliqués dans la diminution de la concentration de 25(OH)D₃ dans les cas d'IRC. Notre étude montre que le sérum contient un ou des facteurs possédant la capacité de réduire l'activité de la 25-hydroxylase hépatique *in vitro*.

Afin de déterminer quels mécanismes mènent à la réduction de la 25-hydroxylase, nous avons étudié l'implication de la PTH dans ce phénomène. En effet, il a déjà été démontré que la PTH cause la réduction de la synthèse protéique de certaines protéines telles que la lipase hépatique, le récepteur de la vasopressine, l'angiotensine II dans les hépatocytes et l'IGF-1 dans les

cardiomyocytes (Klin, Smogorzewski et al. 1995, Massry, Klin et al. 1995, Klin, Smogorzewski et al. 1996, Massry and Smogorzewski 1997, Qing, Ding et al. 1999). De plus, notre laboratoire a déjà montré que la PTH était un des facteurs sériques impliqués dans la réduction de l'expression des CYP450s (Michaud, Naud et al. 2006). Premièrement, nous avons évalué si l'ablation des glandes parathyroïdiennes (PTX) prévenait la diminution de la concentration de 25(OH)D₃ chez les rats présentant une IRC. Nos résultats ont montré que les rats atteints d'IRC ayant subi une PTX présentaient les concentrations similaires de 25(OH)D₃ comparativement aux rats témoins. De plus, l'expression des CYP450s n'a pas subi de changement chez les rats atteints d'IRC ayant subi une PTX. Ensuite, nos résultats ont montré que l'infusion de la PTH chez des rats témoins ayant subi une PTX a mené à une diminution des concentrations de 25(OH)D₃ à des concentrations similaires à celles observées chez les rats atteints d'IRC. Tous ces résultats nous suggèrent que la PTH est aussi impliquée dans la réduction de l'activité de la 25-hydroxylase et dans la carence en 25(OH)D₃.

Des études récentes ont démontré que le facteur de croissance des fibroblastes 23 (*fibroblast growth factor 23* (FGF23)) est un nouveau facteur impliqué dans la régulation du phosphate et de la vitamine D (Quarles 2008, Wolf 2009). Dans le rein, le FGF23 augmente l'excrétion du phosphate et inhibe la 1 α -hydroxylase, ce qui réduit la synthèse de 1,25(OH)₂D₃. Chez les patients atteints d'IRC, les concentrations de FGF23 augmentent progressivement. Cette

augmentation significative est reliée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité (Quarles 2008, Wolf 2009, Quarles 2012). Plusieurs études ont tenté de déterminer les liens entre les concentrations de PTH et de FGF23 (Isakova and Wolf 2010, Lavi-Moshayoff, Wasserman et al. 2010, Sliem, Tawfik et al. 2011, Gutierrez, Smith et al. 2012, Silver and Naveh-Manly 2012). Certaines études suggèrent une corrélation positive entre la PTH et le FGF23 (Lavi-Moshayoff, Wasserman et al. 2010, Sliem, Tawfik et al. 2011, Silver and Naveh-Manly 2012). En effet, l'augmentation des concentrations de PTH dans les cas d'IRC cause une augmentation des concentrations de FGF23 et cette augmentation est annulée lors d'une PTX (Lavi-Moshayoff, Wasserman et al. 2010). Par contre, une autre étude démontre que l'infusion de PTH cause une diminution des concentrations de FGF23 dans la première heure de l'injection (Gutierrez, Smith et al. 2012). Dans notre étude, l'infusion de PTH ou la présence de PTX, pourrait avoir causé des changements dans les concentrations de FGF23. De plus, la présence du FGF23 pourrait aussi expliquer la déficience en 25(OH)D₃ observée dans les cas d'IRC mais son implication reste à être déterminée. Malheureusement, notre devis expérimental n'a pas inclus l'évaluation des concentrations de FGF23 dans le sérum des rats atteints d'IRC, ni l'effet du FGF23 exogène dans une culture d'hépatocytes.

Bien que notre étude ait été conduite chez des rats, nos résultats peuvent être transposés chez l'humain. Premièrement, des études effectuées chez l'humain ont démontré que l'hyperparathyroïdie primaire est associée à une diminution de

25(OH)D₃ et les concentrations de 25(OH)D₃ ont été normalisées suite à une PTX (Clements, Davies et al. 1987). Nos résultats montrent une corrélation significative entre la fonction rénale des rats atteints d'IRC et les concentrations de 25(OH)D₃. Les résultats obtenus pourrait nous permettre de mieux comprendre pourquoi certaines études ont rapporté une plus faible efficacité dans la supplémentation en vitamine D₃ chez des patients avec un stade 4 et 5 comparé au stade 3 (Al-Aly, Qazi et al. 2007, Zisman, Hristova et al. 2007). Cependant, il existe des différences majeures dans l'implication des différents isoformes responsables de la synthèse de 25(OH)D₃ entre le rat et l'humain. Par exemple, chez l'humain le CYP2R1 semble être l'isoforme principal impliqué dans la 25-hydroxylation de la vitamine D₃, par contre son rôle semble moins important chez le rat (Cheng, Levine et al. 2004). Notre étude a montré que l'IRC n'affectait pas l'expression du CYP2R1 chez le rat. Chez l'humain, il serait intéressant d'évaluer l'expression du CYP2R1 afin de mieux comprendre la déficience en 25(OH)D₃.

La suite logique de mon projet serait de valider notre hypothèse de diminution de l'hydroxylation hépatique de la vitamine D₃ chez les patients atteints d'IRC. Pour ce faire, nous pourrions effectuer une étude chez l'humain de l'hydroxylation de la 25(OH)D₃ suite à l'administration de vitamine D₃. La vitamine D peut être administrée via trois voies différentes, c'est-à-dire, *per os*, intramusculaire et intraveineuse. Elles ont toutes des avantages et des inconvénients. La voie *per os* (comprimés ou gouttes) est la plus facile, par contre il peut y avoir des problèmes de

compliance ou des différences interpersonnelles dans les paramètres d'absorption. La sécurité de la voie intraveineuse est peu connue. Donc, nous pourrions privilégier la voie intramusculaire pour l'injection de la vitamine D₃. L'effet de l'administration intramusculaire d'une méga dose de vitamine D₃ sur la production de 25(OH)D₃ a été très bien décrit dans la littérature chez différents groupes de patients mais sans IRC (Soliman, Adel et al. 2008, Einarsdottir, Preen et al. 2010, Nugent, Roche et al. 2010, Seki, Yamamoto et al. 2010, Soliman, El-Dabbagh et al. 2010). Nous pourrions donc évaluer la production de 25(OH)D₃ chez différents groupes de patients atteints d'IRC des stades 2 à 5, ainsi qu'un groupe de témoins pairés pour l'âge et le poids, suite à l'administration d'une méga dose de vitamine D₃. Cette expérience supplémentaire pourrait nous permettre de mieux comprendre l'hydroxylation de la vitamine D₃ en 25(OH)D₃ selon le degré d'insuffisance rénale. Aussi, il pourrait être intéressant d'inclure un groupe de patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire (sans atteinte rénale) afin de mieux comprendre l'implication de la PTH dans la synthèse de 25(OH)D₃.

Notre laboratoire a ouvert une nouvelle voie pour l'étude de l'effet de l'IRC sur les CYP450 endogène. En plus de l'hydroxylation de la vitamine D, les rôles endogènes des CYP450s incluent la biosynthèse et la dégradation des hormones stéroïdiennes, des éicosanoïdes, des acides biliaires, des acides gras, des amines biogènes et des rétinoïdes. Est-ce qu'en présence d'IRC des changements dans l'expression des différents CYP450s pourraient affecter ces processus ?

Plusieurs études nous permettent de croire que certaines anomalies observées chez les patients atteints d'IRC pourraient être causées par un changement dans l'expression et l'activité des CYP450s possédant des rôles endogènes.

La synthèse de la testostérone ainsi que des oestrogènes est effectuée par certains CYP450s. Il a été démontré que l'IRC est associée à une diminution des fonctions sexuelles chez les hommes et les femmes qui en sont atteints (Bagcivan, Kilicarlan et al. 2003, Bellinghieri, Santoro et al. 2008, Song, Yang et al. 2008). Ces études mettent en évidence que l'IRC est associée à une réduction des concentrations de testostérone chez l'homme (Bellinghieri, Santoro et al. 2008) et des oestrogènes chez la femme (Song, Yang et al. 2008). Ces modifications pourraient être causées par une diminution de leurs synthèses par les CYP450s dans les cas d'IRC.

La synthèse ainsi que le catabolisme du cholestérol implique aussi la participation des CYP450s. En présence d'IRC, de nombreuses études ont rapporté des désordres lipidiques (Tsimihodimos, Mitrogianni et al. 2011, Vaziri and Norris 2011, Samouilidou, Karpouza et al. 2012). L'étude de Rogacev propose que l'IRC cause une diminution de la synthèse du cholestérol chez des patients hémodialysés (Rogacev, Pinsdorf et al. 2012). Ces modifications lipidiques observées chez les

patients atteints d'IRC pourraient être provoquées par des modifications des CYP450s impliqués dans la synthèse et le catabolisme du cholestérol, principale voie d'élimination du cholestérol.

L'hydroxylation de la vitamine A est aussi assurée par différents CYP450s (CYP26A1, 26B1 et 26C1). De nombreuses études ont mis en évidence que les concentrations de vitamine A (rétinol) sont significativement augmentées chez les patients souffrants d'IRC (Abahusain and Al-Nahedh 2002, Lucchi, Banni et al. 2005). La régulation des niveaux cellulaires de rétinol est effectuée par son hydroxylation par le CYP26. Une diminution significative de l'activité et de l'expression du CYP26 pourrait donc provoquer une diminution de l'hydroxylation du rétinol et être responsable de son accumulation chez les patients atteints d'IRC.

Le métabolisme de l'acide arachidonique est effectué par au moins quatorze isoformes du CYP450. Les métabolites produits sont impliqués dans une grande variété de processus inflammatoires, la vasoconstriction, la vasodilatation, l'œdème, l'agrégation plaquettaire et la réponse à la douleur. L'IRC est associée à de nombreux désordres inflammatoires, au stress oxydatif, aux atteintes endothéliales, ainsi qu'à l'œdème (Vaziri 2004, Galli 2007, Carrero and Stenvinkel 2010, Cheung, Paik et al. 2010, Libetta, Sepe et al. 2011). Les résultats de certaines études nous laissent croire que le métabolisme de l'acide arachidonique est modifié par l'IRC. Premièrement, l'étude de Gordge démontre que le temps de saignement est

augmenté et que la production de tromboxane est réduite dans les cas sévères d'IRC (Gordge, Faint et al. 1988). Ensuite, l'étude de Lucchi propose que l'IRC réduit le catabolisme de l'acide linoléique conjugué (Lucchi, Banni et al. 2000). Finalement, l'étude de Girelli démontre que la composition en acide gras des membranes érythrocytaires est plus riche en acide arachidonique chez les patients hémodialysés (Girelli, Azzini et al. 1992). Ces études démontrent des changements dans le métabolisme de l'acide arachidonique dans les cas d'IRC, donc indirectement, l'accumulation de l'acide arachidonique et la réduction de la synthèse de tromboxane pourraient être provoquées par une réduction de l'activité des CYP450s par l'IRC.

Les fonctions endogènes effectuées par la grande famille des CYP450s pourraient donc être affectées en présence d'IRC. Bien qu'aucune étude ne relie directement ces modifications à une réduction de l'activité et de l'expression des CYP450s en présence d'IRC, il est possible de proposer l'hypothèse selon laquelle l'IRC induit des changements dans l'activité des CYP450s responsables des fonctions endogènes telles que l'hydroxylation de la vitamine A, la synthèse des hormones stéroïdiennes et de l'acide arachidonique, ainsi que la synthèse et le catabolisme du cholestérol.

Les carences en 25(OH)D₃ sont très fréquentes dans la population nord-américaine (Langlois, Greene-Finestone et al. 2010, Looker, Johnson et al. 2011). Les

bienfaits de la vitamine D seraient très nombreux et variés, puisqu'une déficience en vitamine D contribueraient à de nombreux processus biologiques tels que le vieillissement (Pilz, Dobnig et al. 2012), le cancer (Churilla, Brereton et al. 2012), les fractures (Bischoff-Ferrari, Stahelin et al. 2011), à la mortalité cardiovasculaire (Motiwala and Wang 2012), le psoriasis (Orgaz-Molina, Buendia-Eisman et al. 2012), la démence (Dickens, Lang et al. 2011), le diabète (Stivelman and Retnakaran 2012), le syndrome métabolique (Gagnon, Lu et al. 2012), l'inflammation (Guillot, Semerano et al. 2010), les maladies auto-immunes (Guillot, Semerano et al. 2010) et la sclérose en plaque (Handel and Ramagopalan 2012). Quelles sont les conséquences de cette déficience en 25(OH)D₃ chez les personnes atteintes d'IRC?

Il a été démontré que l'incidence de cancer est plus élevée chez les patients atteints d'IRC (Mandayam and Shahinian 2008, Wong, Hayen et al. 2009, Lin, Li et al. 2012). Les causes de cette augmentation ne sont pas bien connues, mais la déficience en vitamine D pourrait peut-être expliquer en partie ce phénomène. De façon intéressante, des modulations des enzymes de phase I ou II sont observées dans certains types de cancer. Par exemple, la modification d'un acide aminé ou la présence d'un polymorphisme pour les CYP1A1, 2C9, 2D6, 2E1 et 3A4 ainsi que les NATs et GSTs sont associées à une augmentation de l'incidence de cancer (Dally, Edler et al. 2003, Chiyomaru, Nagano et al. 2011, Mrozkiewicz, Grzeskowiak et al. 2011, Rouissi, Ouerhani et al. 2011, Sameer, Nissar et al. 2011, Schmelzle, Dizdar et al. 2011, de Lima Junior, Reis et al. 2012, Kalvik and Arnesen 2013). Bien qu'aucun

lien causal n'ait été établi entre une diminution de l'activité des CYP450s et le cancer, les évidences indirectes nous permettent de poser l'hypothèse selon laquelle l'IRC induit des changements dans l'activité des CYP450s et ces modifications pourraient être responsables d'une incidence accrue de cancer.

En conclusion, notre étude permet de mieux comprendre le phénomène de carence en vitamine D chez les patients souffrants d'IRC ainsi que l'implication des CYP450s dans celle-ci. Ceci nous permettra de mieux cibler les traitements disponibles et de développer de nouvelles thérapies. Par exemple, l'utilisation d'inducteurs des CYP450s pourrait augmenter l'hydroxylation de la vitamine D chez les patients atteints d'IRC. Aussi, l'utilisation à plus grande échelle du Rocaltrol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), malgré un coût plus élevé, pourrait prévenir les conséquences des carences en vitamine D observées chez les patients atteints d'IRC. Le développement d'un analogue de la vitamine D plus résistant au métabolisme par le CYP24 pourrait permettre d'en diminuer le catabolisme et d'en augmenter la demi-vie.

10.4 Voies de signalisation cellulaires activées lors de la diminution du CYP450.

Notre laboratoire a déjà montré une diminution de l'expression des CYP450s en présence d'IRC et avec la PTH. Par contre, les mécanismes intracellulaires responsables de ces diminutions demeurent inconnus. Le quatrième objectif de

cette thèse de doctorat était d'explorer les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'inhibition du CYP450 par l'IRC et la PTH (section 9. [Article 4](#)). Nous avons donc évalué l'expression de PXR, de CAR ainsi que l'activation de NF- κ B.

Dans la présente étude, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression génique et protéique de PXR chez les rats atteints d'IRC. De plus, nos résultats montrent que la PTX corrige cette diminution de façon partielle pour l'expression protéique et complète pour l'expression génique. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'expression de CAR chez les rats souffrants d'IRC et les rats présentant une IRC ayant subi une PTX (IRC-PTX). Les inhibitions et les corrections observées lors de la présente étude sont directement corrélées avec l'expression du CYP3A chez les rats atteints d'IRC (Michaud, Naud et al. 2006). Ces observations nous suggèrent que la diminution des facteurs nucléaires, le PXR et le CAR, pourraient être responsables de l'inhibition des CYP450s en présence d'IRC. De plus, le PXR et le CAR semblent être aussi régulés par la présence de PTH.

Le PXR et le CAR sont des facteurs nucléaires responsables de l'expression du CYP450. Un changement de leur expression, leur conformation ou leur phosphorylation peut entraîner une diminution de leur activité de régulation de la transcription. Les voies de signalisation PKA et PKC, activées via le récepteur à PTH, peuvent directement agir sur la phosphorylation et les co-facteurs de PXR, augmentant ainsi sa dégradation et diminuant son activité (Ding and Staudinger

2005, Ding and Staudinger 2005). L'activation des voies PKC ou PKA, via le récepteur PTH, pourrait donc être responsable de l'inhibition de l'activité de PXR et CAR et ultimement être responsable de la diminution des CYP450s dans les cas d'IRC.

La mise au point d'un modèle cellulaire *in vitro* pourrait nous permettre de mieux comprendre l'implication de la PTH ainsi que des voies de signalisation PKA et PKC dans l'inhibition de l'expression de PXR et CAR. En effet, l'utilisation d'une culture de cellules hépatiques humaines HepG2, pourrait nous permettre d'évaluer l'effet du sérum de rats et d'humain d'atteints d'IRC ainsi que de la PTH en présence d'inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation PKA et PKC sur l'expression du CYP450. Les résultats obtenus aideraient à une meilleure compréhension de l'implication de chacune de ces voies de signalisation dans l'inhibition du CYP450 en présence d'IRC et avec la PTH.

L'IRC est une pathologie souvent associée à de l'inflammation (Stenvinkel and Alvestrand 2002, Carrero and Stenvinkel 2010). Il a déjà été montré que certaines cytokines peuvent diminuer l'ARNm et l'expression protéique de PXR (Teng and Piquette-Miller 2005). Le CAR est aussi inhibé par l'IL-1 β et le LPS (Assenat, Gerbal-Chaloin et al. 2004). En plus de la présence de PTH, l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires pourrait être une explication supplémentaire à l'inhibition des CYP450s, de PXR et de CAR en présence d'IRC. Il serait intéressant d'évaluer l'état inflammatoire de notre modèle expérimental d'IRC

chez le rat. Ceci nous permettrait de mieux comprendre l'implication de l'inflammation dans le processus d'inhibition du CYP450, du PXR et du CAR en présence d'IRC.

L'utilisation de souris transgéniques *PXR null* et *PXR/CAR null* a permis de mieux comprendre l'effet de l'inflammation sur l'inhibition des CYP450s, de PXR et de CAR (Assenat, Gerbal-Chaloin et al. 2004, Teng and Piquette-Miller 2005, Xie 2009). Ces études ont montré que l'inhibition des CYP450s en présence de l'inflammation était médiée par les facteurs PXR et CAR. Nous pourrions utiliser ces souris et induire l'IRC par modèle de néphrectomie 5/6^e, afin de mieux comprendre le processus d'inhibition des CYP450s, via l'inhibition de PXR et de CAR en IRC.

L'activation de la voie de signalisation du NF- κ B, via la voie du PKA ou du PKC, peut aussi avoir un effet inhibiteur sur le PXR et le CAR. En effet, le NF- κ B peut agir de plusieurs façons pour inhiber le PXR, le CAR, le RXR et ultimement le CYP450. Le NF- κ B peut prendre la place de PXR sur le promoteur (PXRE) du CYP450 et ainsi en inhiber sa transcription. Le NF- κ B peut se lier au récepteur glucocorticoïde et diminuer l'expression des gènes de CAR, de PXR et de RXR. De plus, la sous-unité p65 du NF- κ B peut lier directement RXR et entraîner une diminution de son activité (Zhou, Tabb et al. 2006). Finalement, l'activation du NF- κ B peut directement agir sur l'inhibition des CYP450s, via la liaison du NF- κ B sur l'élément de réponse du promoteur du CYP450 et ainsi diminuer sa transcription, comme il a déjà été

démontré dans les cas d'inflammation, (Tian, Ke et al. 1999, Ke, Rabson et al. 2001, Abdulla, Goralski et al. 2005).

Afin de mieux comprendre l'implication de NF- κ B, nous avons évalué son activation, via sa translocation nucléaire, chez nos rats atteints d'IRC. L'accumulation nucléaire des sous-unités p50 ou p65 est une indication d'activation du NF- κ B. Nous avons donc quantifié la translocation nucléaire de p65, par cytométrie en flux, dans les foies de rats présentant une IRC. Nos résultats montrent une forte accumulation de la sous-unité p65 dans les noyaux des cellules des foies des rats souffrants d'IRC. De plus, nous avons confirmé les résultats obtenus en cytométrie par un immunobuvardage de type Western. Nos résultats montrent donc une augmentation de l'activation du NF- κ B chez les rats atteints d'IRC.

Le modèle expérimental de néphrectomie chez le rat *in vivo* n'est pas un modèle idéal pour évaluer l'activation du NF- κ B, puisque l'effet du NF- κ B est rapide (quelques minutes) mais notre modèle est chronique (six semaines). La mise au point d'une culture cellulaire *in vitro* incubée avec différents inhibiteurs généraux des voies de signalisation du NF- κ B et/ou du I κ B et d'inhibiteurs plus spécifiques aux différentes sous-voies d'activation (MAPK, ERK1/2) pourrait nous permettre de mieux comprendre la contribution de l'activation du NF- κ B dans la diminution du CYP450. De plus, les relations entre le NF- κ B et les facteurs nucléaires tels que le PXR et le CAR, ainsi que l'implication des voies de signalisation telles que le PKA et le

PKC pourraient être mieux comprises dans l'inhibition du CYP450 en IRC et par la PTH.

En conclusion, l'ajout d'expérimentations pourrait permettre de définir les liens qui unissent les voies de signalisation afin de diminuer l'expression du CYP450 dans les cas d'IRC et par la PTH. La présente étude n'est pas complète mais elle permet néanmoins de montrer l'implication des facteurs nucléaires PXR et CAR dans la diminution du CYP450 en présence d'IRC et par la PTH. De plus, nos résultats montrent une activation du NF- κ B dans les cas d'IRC.

11. Conclusion

Les patients atteints d'IRC présentent une forte incidence d'effets indésirables reliés à la prise de médicaments. Il a déjà été démontré qu'en plus d'une diminution de l'élimination rénale des médicaments, il existe une diminution de l'élimination métabolique des médicaments. Ces modifications du métabolisme sont responsables d'une augmentation de la biodisponibilité de certains médicaments. En effet, il a été démontré que des altérations de l'expression et de l'activité des CYP450s impliqués dans le métabolisme des médicaments étaient responsables de ces modifications. Les études effectuées dans le cadre de cette thèse nous permettent de confirmer que l'insuffisance rénale chronique affecte l'expression et l'activité des enzymes du CYP450 responsables du métabolisme des médicaments.

En premier lieu, nous avons mis au point une méthode d'analyse du CYP450 qui nous a permis de mieux évaluer l'activité du CYP3A chez le rat. Cette étape nous a permis de poursuivre notre compréhension du métabolisme des médicaments dans les cas d'IRC.

Nous avons donc évalué les impacts de la dialyse sur l'expression des CYP450s. Nous avons montré que la dialyse provoque une amélioration transitoire de la composition du sérum provenant de patients atteints d'IRC, puisque

l'inhibition du CYP450 causée par l'IRC n'est plus présente chez les patients ayant subi une dialyse. Nous avons aussi montré que la concentration de PTH est réduite suite à une séance de dialyse. Ces résultats nous suggèrent que l'inhibition est réversible et qu'elle est causée par un facteur présent dans le sang des patients atteints d'IRC.

Il a été montré que l'IRC altère la pharmacocinétique des médicaments, en causant une diminution des CYP450 impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. Notre étude a montré que les fonctions endogènes du CYP450 sont aussi altérées par l'IRC telle que l'hydroxylation de la vitamine D₃. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse ont permis d'élucider la présence d'une déficience en 25(OH)D₃ dans les cas d'IRC. En effet, nous avons démontré que la 25-hydroxylation de la vitamine D est diminuée chez les rats atteints d'IRC, suggérant que les fonctions endogènes des CYP450s étaient aussi affectées par l'IRC.

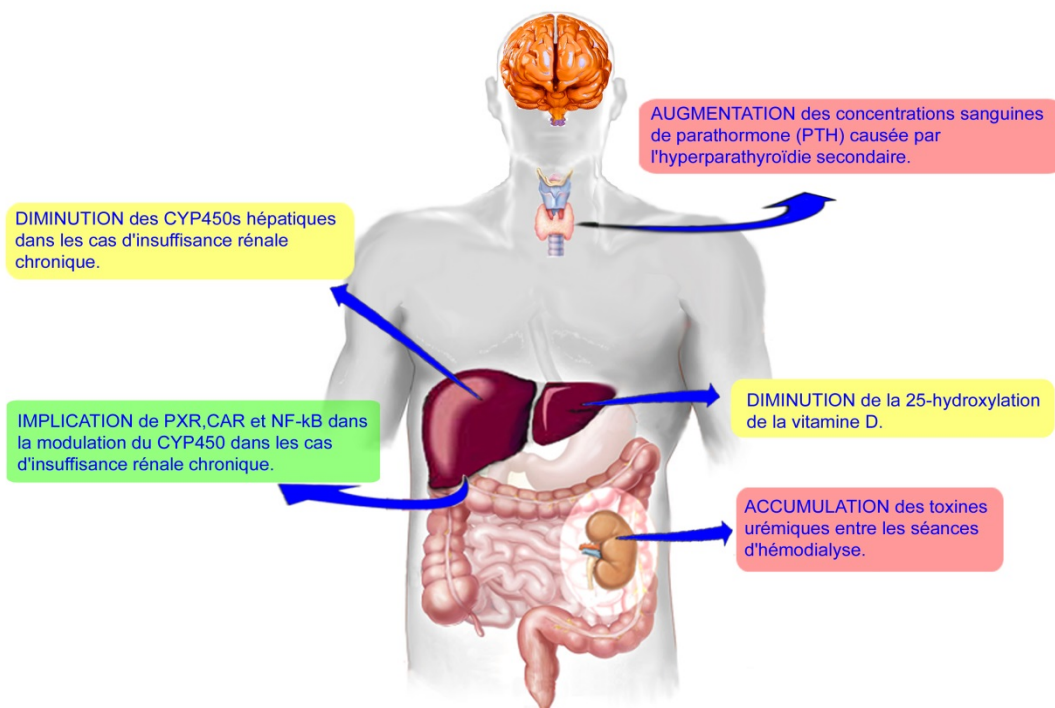
Les mécanismes impliqués dans la diminution de l'expression et de l'activité du CYP450 dans les cas d'IRC n'étaient pas connus. Nous avons donc exploré brièvement les voies de signalisation connues du CYP450 et celles empruntées par les récepteurs de la PTH. Nos résultats suggèrent que les facteurs nucléaires PXR, CAR, ainsi que la voie de signalisation impliquant le NF-κB sont impliqués dans les modifications du CYP450s dans les cas d'IRC. Cependant, d'autres expérimentations

seront nécessaires afin de mieux évaluer l'implication de chaque voie, ainsi que la contribution des voies de signalisation de la PKA et la PKC.

Il serait intéressant de déterminer les mécanismes exacts responsables des modulations de l'expression et de l'activité des CYP450s chez les patients atteints d'IRC. De mieux comprendre les effets de la dialyse sur l'expression et l'activité des CYP450s. Est-ce que le mécanisme est traductionnel ou post-traductionnel ? De plus, l'amélioration des connaissances dans le domaine des carences en vitamine D₃ pourrait être très intéressante pour le développement de thérapie plus adaptée.

En conclusion, les études de l'effet de l'IRC sur le métabolisme des médicaments ainsi que les fonctions endogènes effectués par le CYP450, nous permettent une meilleure compréhension des modifications qui ont lieu dans les cas d'IRC. Ultiment, ces études nous permettront un meilleur ajustement des doses de médicament et une meilleure thérapie pour l'HPTS, ce qui permettra une diminution de l'incidence des effets secondaires et optimiser les traitements thérapeutiques existants (voir [Figure 16](#)).

Figure 16 : Résumé des résultats



12. Bibliographie

Abahusain, M. A. and N. N. Al-Nahedh (2002). "The Biochemical Status of Vitamin A and Alpha-tocopherol during Different Stages of Renal Disease and its Relationship to Diabetes." Saudi J Kidney Dis Transpl **13**(1): 18-23.

Abbasi, M. A., G. M. Chertow and Y. N. Hall (2010). "End-stage renal disease." Clin Evid (Online) **2010** (Jul 19;2010).

Abbott-Johnson, W., P. Kerlin, A. Clague, H. Johnson and R. Cuneo (2011). "Relationships between blood levels of fat soluble vitamins and disease etiology and severity in adults awaiting liver transplantation." J Gastroenterol Hepatol **26**(9): 1402-1410.

Abdulla, D., K. B. Goralski, E. G. Del Busto Cano and K. W. Renton (2005). "The signal transduction pathways involved in hepatic cytochrome P450 regulation in the rat during a lipopolysaccharide-induced model of central nervous system inflammation." Drug Metab Dispos **33**(10): 1521-1531.

Abou-Samra, A. B., H. Juppner, X. F. Kong, E. Schipani, A. Iida-Klein, H. Karga, P. Urena, T. F. Gardella, J. T. Potts, Jr., H. M. Kronenberg and et al. (1994). "Structure,

function, and expression of the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide." Adv Nephrol Necker Hosp **23**: 247-264.

Aiba, I., T. Yamasaki, T. Shinki, S. Izumi, K. Yamamoto, S. Yamada, H. Terato, H. Ide and Y. Ohyama (2006). "Characterization of rat and human CYP2J enzymes as Vitamin D 25-hydroxylases." Steroids **71**(10): 849-856.

Akahoshi, T., N. Kobayashi, S. Hosaka, N. Sekiyama, C. Wada and H. Kondo (1995). "In-vivo induction of monocyte chemotactic and activating factor in patients with chronic renal failure." Nephrol Dial Transplant **10**(12): 2244-2249.

Al-Aly, Z., R. A. Qazi, E. A. Gonzalez, A. Zeringue and K. J. Martin (2007). "Changes in serum 25-hydroxyvitamin D and plasma intact PTH levels following treatment with ergocalciferol in patients with CKD." Am J Kidney Dis **50**(1): 59-68.

Ali, N. N., V. Gilston and P. G. Winyard (1999). "Activation of NF-kappaB in human osteoblasts by stimulators of bone resorption." FEBS Lett **460**(2): 315-320.

Assenat, E., S. Gerbal-Chaloin, D. Larrey, J. Saric, J. M. Fabre, P. Maurel, M. J. Vilarem and J. M. Pascussi (2004). "Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance." Hepatology **40**(4): 951-960.

Auwerx, J., L. De Keyser, R. Bouillon and P. De Moor (1986). "Decreased free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with the nephrotic syndrome." Nephron **42**(3): 231-235.

Bagcivan, I., H. Kilicarlan, B. Sarac, G. Gokce, S. Yildirim, S. Ayan and Y. Sarioglu (2003). "The evaluation of the effects of renal failure on erectile dysfunction in a rabbit model of chronic renal failure." BJU Int **91**(7): 697-701.

Balducci, A., G. Coen, M. Manni, I. Perruzza, V. Fassino, D. Sardella and F. Grandi (2004). "In vivo assessment of intact parathyroid hormone adsorption by different dialysis membranes during hemodialysis." Artif Organs **28**(12): 1067-1075.

Bang, U. C., S. Novovic, A. M. Andersen, M. Fenger, M. B. Hansen and J. E. Jensen (2011). "Variations in serum 25-hydroxyvitamin D during acute pancreatitis: an exploratory longitudinal study." Endocr Res **36**(4): 135-141.

Beaulieu P and L. C., Eds. (2010). Précis de pharmacologie : Du fondamental à la clinique., Les Presses de l'Université de Montréal.

Bellinghieri, G., D. Santoro, A. Mallamace and V. Savica (2008). "Sexual dysfunction in chronic renal failure." J Nephrol **21 Suppl 13**: S113-117.

Bengoa, J. M., M. J. Bolt and I. H. Rosenberg (1984). "Hepatic vitamin D 25-hydroxylase inhibition by cimetidine and isoniazid." J Lab Clin Med **104**(4): 546-552.

Bernhardt, R. (1995). "Cytochrome P450: Structure, function and generation of reactive oxygen species." Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology **127**: 137-221.

Binkley, N., R. Novotny, D. Krueger, T. Kawahara, Y. G. Daida, G. Lensmeyer, B. W. Hollis and M. K. Drezner (2007). "Low vitamin D status despite abundant sun exposure." J Clin Endocrinol Metab **92**(6): 2130-2135.

Bischoff-Ferrari, H., H. B. Stahelin and P. Walter (2011). "Vitamin D effects on bone and muscle." Int J Vitam Nutr Res **81**(4): 264-272.

Bistran, B. R. (1998). "Role of the systemic inflammatory response syndrome in the development of protein-calorie malnutrition in ESRD." Am J Kidney Dis **32**(6 Suppl 4): S113-117.

Bouchard, J., D. Ouimet, M. Vallee, J. P. Lafrance, M. Leblanc, L. Senecal, A. Bonnardeaux, J. P. Mathieu and V. Pichette (2009). "Comparison of the prevalence of calcidiol insufficiency in predialysis and osteoporotic populations." Int Urol Nephrol **41**: 983-988.

Bouchard, J., D. Ouimet, M. Vallee, M. Leblanc and V. Pichette (2008). "Effect of vitamin d supplementation on calcidiol and parathyroid hormone levels." Perit Dial Int **28**(5): 565.

Bowmer, C. J. and W. E. Lindup (1982). "Decreased drug binding in uraemia: effect of indoxyl sulphate and other endogenous substances on the binding of drugs and dyes to human albumin." Biochem Pharmacol **31**(3): 319-323.

Brodie, M. J., A. R. Boobis, C. J. Hillyard, G. Abeyasekera, I. MacIntyre and B. K. Park (1981). "Effect of isoniazid on vitamin D metabolism and hepatic monooxygenase activity." Clin Pharmacol Ther **30**(3): 363-367.

Campoy, S. and R. Elwell (2005). "Pharmacology & CKD: how chronic kidney disease and its complications alter drug response." Am J Nurs **105**(9): 60-71; quiz 72.

Cantu, T. G., E. F. Ellerbeck, S. W. Yun, S. D. Castine and D. M. Kornhauser (1992). "Drug prescribing for patients with changing renal function." Am J Hosp Pharm **49**(12): 2944-2948.

Carrero, J. J. and P. Stenvinkel (2010). "Inflammation in end-stage renal disease-- what have we learned in 10 years?" Semin Dial **23**(5): 498-509.

Chan, L. M., S. Lowes and B. H. Hirst (2004). "The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability." Eur J Pharm Sci **21**(1): 25-51.

Chang, G. W. and P. C. Kam (1999). "The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes." Anaesthesia **54**(1): 42-50.

Chauret, N., N. Tremblay, R. L. Lackman, J. Y. Gauthier, J. M. Silva, J. Marois, J. A. Yergey and D. A. Nicoll-Griffith (1999). "Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe." Anal Biochem **276**(2): 215-226.

Cheng, J. B., M. A. Levine, N. H. Bell, D. J. Mangelsdorf and D. W. Russell (2004). "Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7711-7715.

Cheung, W. W., K. H. Paik and R. H. Mak (2010). "Inflammation and cachexia in chronic kidney disease." Pediatr Nephrol **25**(4): 711-724.

Chiyomaru, K., T. Nagano and C. Nishigori (2011). "Polymorphisms of glutathione S-transferase in skin cancers in a Japanese population." Kobe J Med Sci **57**(1): E11-16.

Chmielewski, M., J. J. Carrero, L. Nordfors, B. Lindholm and P. Stenvinkel (2008). "Lipid disorders in chronic kidney disease: reverse epidemiology and therapeutic approach." J Nephrol **21**(5): 635-644.

Chovan, J. P., S. C. Ring, E. Yu and J. P. Baldino (2007). "Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats." Xenobiotica **37**(5): 459-473.

Churilla, T. M., H. D. Brereton, M. Klem and C. A. Peters (2012). "Vitamin D Deficiency Is Widespread in Cancer Patients and Correlates With Advanced Stage Disease: A Community Oncology Experience." Nutr Cancer **64**(4): 521-525.

Clase, C. (2011). "Renal failure (chronic)." Clin Evid (Online) **2011** (May 25;2011).

Clements, M. R., M. Davies, D. R. Fraser, G. A. Lumb, E. B. Mawer and P. H. Adams (1987). "Metabolic inactivation of vitamin D is enhanced in primary hyperparathyroidism." Clin Sci (Lond) **73**(6): 659-664.

Coleman, M. (2010). Human Drug Metabolism: An Introduction. West sussex, UK, John Wiley and Sons.

Coli, L., G. Donati, M. L. Cappuccilli, G. Cianciolo, G. Comai, V. Cuna, E. Carretta, G. La Manna and S. Stefoni (2011). "Role of the hemodialysis vascular access type in inflammation status and monocyte activation." Int J Artif Organs **34**(6): 481-488.

Dally, H., L. Edler, B. Jager, P. Schmezer, B. Spiegelhalder, H. Dienemann, P. Drings, V. Schulz, K. Kayser, H. Bartsch and A. Risch (2003). "The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose." Pharmacogenetics **13**(10): 607-618.

de Lima Junior, M. M., L. O. Reis, A. C. Guilhen, F. Granja, M. N. de Lima Oliveira, U. Ferreira, L. L. Cunha and L. S. Ward (2012). "N-acetyltransferase-2 gene polymorphisms and prostate cancer susceptibility in Latin American patients." Med Oncol **29**(4): 2889-2894.

Desta, Z., N. V. Soukhova and D. A. Flockhart (2001). "Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A." Antimicrob Agents Chemother **45**(2): 382-392.

Dickens, A. P., I. A. Lang, K. M. Langa, K. Kos and D. J. Llewellyn (2011). "Vitamin D, cognitive dysfunction and dementia in older adults." CNS Drugs **25**(8): 629-639.

Ding, X. and J. L. Staudinger (2005). "Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway." J Pharmacol Exp Ther **312**(2): 849-856.

Ding, X. and J. L. Staudinger (2005). "Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C." Biochem Pharmacol **69**(5): 867-873.

Ding, X. and J. L. Staudinger (2005). "Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C." Biochem Pharmacol **69**(5): 867-873.

Dowling, T. C., A. E. Briglia, J. C. Fink, D. S. Hanes, P. D. Light, L. Stackiewicz, C. S. Karyekar, N. D. Eddington, M. R. Weir and W. L. Henrich (2003). "Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease." Clin Pharmacol Ther **73**(5): 427-434.

Eddington, H., S. Sinha and P. A. Kalra (2009). "Vascular calcification in chronic kidney disease: a clinical review." J Ren Care **35 Suppl 1**: 45-50.

Einarsdottir, K., D. B. Preen, T. D. Clay, L. Kiely, C. D. Holman and L. D. Cohen (2010). "Effect of a single 'megadose' intramuscular vitamin D (600,000 IU) injection on

vitamin D concentrations and bone mineral density following biliopancreatic diversion surgery." Obes Surg **20**(6): 732-737.

Elder, G. J. and K. Mackun (2006). "25-Hydroxyvitamin D deficiency and diabetes predict reduced BMD in patients with chronic kidney disease." J Bone Miner Res **21**(11): 1778-1784.

Elston, A. C., M. K. Bayliss and G. R. Park (1993). "Effect of renal failure on drug metabolism by the liver." Br J Anaesth **71**(2): 282-290.

Erill, S., R. Calvo and R. Carlos (1980). "Plasma protein carbamylation and decreased acidic drug protein binding in uremia." Clin Pharmacol Ther **27**(5): 612-618.

Esposito, C., L. Villa, F. Grosjean, F. Mangione, V. Esposito, F. Castoldi, N. Serpieri, M. Arra, E. Pertile, N. Maggi, R. Valentino and A. Dal Canton (2009). "Rapamycin reduces proteinuria and renal damage in the rat remnant kidney model." Transplant Proc **41**(4): 1370-1371.

Etemad, B. (1998). "Gastrointestinal complications of renal failure." Gastroenterol Clin North Am **27**(4): 875-892.

Feroze, U., M. Z. Molnar, R. Dukkipati, C. P. Kovesdy and K. Kalantar-Zadeh (2011). "Insights into nutritional and inflammatory aspects of low parathyroid hormone in dialysis patients." J Ren Nutr **21**(1): 100-104.

Friedman, P. A. and W. G. Goodman (2006). "PTH(1-84)/PTH(7-84): a balance of power." Am J Physiol Renal Physiol **290**(5): F975-984.

Gabardi, S. and S. Abramson (2005). "Drug dosing in chronic kidney disease." Med Clin North Am **89**(3): 649-687.

Gagnon, C., Z. X. Lu, D. J. Magliano, D. W. Dunstan, J. E. Shaw, P. Z. Zimmet, K. Sikaris, P. R. Ebeling and R. M. Daly (2012). "Low Serum 25-Hydroxyvitamin D Is Associated with Increased Risk of the Development of the Metabolic Syndrome at Five Years: Results from a National, Population-Based Prospective Study (The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study: AusDiab)." J Clin Endocrinol Metab **97**(6): 1953-1961.

Galisteo, M., N. Marc, A. Fautrel, A. Guillouzo, L. Corcos and D. Lagadic-Gossmann (1999). "Involvement of cyclic nucleotide- and calcium-regulated pathways in phenobarbital-induced cytochrome P-450 3A expression in mouse primary hepatocytes." J Pharmacol Exp Ther **290**(3): 1270-1277.

Galli, F. (2007). "Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients." Nephrol Dial Transplant **22 Suppl 5**: v20-36.

Gaweda, A. E., L. J. Goldsmith, M. E. Brier and G. R. Aronoff (2010). "Iron, inflammation, dialysis adequacy, nutritional status, and hyperparathyroidism modify erythropoietic response." Clin J Am Soc Nephrol **5(4)**: 576-581.

Gensure, R. C., T. J. Gardella and H. Juppner (2005). "Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide, and their receptors." Biochem Biophys Res Commun **328(3)**: 666-678.

Gerlo, S., R. Kooijman, I. M. Beck, K. Kolmus, A. Spooren and G. Haegeman (2011). "Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action." Cell Mol Life Sci **68(23)**: 3823-3841.

Gibson, T. P. (1986). "Renal disease and drug metabolism: an overview." Am J Kidney Dis **8(1)**: 7-17.

Girelli, D., M. Azzini, O. Olivieri, P. Guarini, M. T. Trevisan, A. Lupo, P. Bernich, G. Panzetta and R. Corrocher (1992). "Red blood cells and platelet membrane fatty acids in non-dialyzed and dialyzed uremics." Clin Chim Acta **211(3)**: 155-166.

Goldstein, D. A., B. Haldimann, D. Sherman, A. W. Norman and S. G. Massry (1981). "Vitamin D metabolites and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal renal function." J Clin Endocrinol Metab **52**(1): 116-121.

Gonzalez, E. A., A. Sachdeva, D. A. Oliver and K. J. Martin (2004). "Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study." Am J Nephrol **24**(5): 503-510.

Gordge, M. P., R. W. Faint, P. B. Rylance and G. H. Neild (1988). "Platelet function and the bleeding time in progressive renal failure." Thromb Haemost **60**(1): 83-87.

Grabe, D. W., C. L. Low, G. R. Bailie and G. Eisele (1997). "Evaluation of drug-related problems in an outpatient hemodialysis unit and the impact of a clinical pharmacist." Clin Nephrol **47**(2): 117-121.

Gueguen, Y., K. Mouzat, L. Ferrari, E. Tissandie, J. M. Lobaccaro, A. M. Batt, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon and M. Souidi (2006). "[Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]." Ann Biol Clin (Paris) **64**(6): 535-548.

Guengerich, F. P. (1997). "Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species." Chem Biol Interact **106**(3): 161-182.

Guengerich, F. P. (2003). "Cytochromes P450, drugs, and diseases." Mol Interv **3**(4): 194-204.

Guevin, C., J. Michaud, J. Naud, F. A. Leblond and V. Pichette (2002). "Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators." Br J Pharmacol **137**(7): 1039-1046.

Guillen, C., P. Martinez, A. R. de Gortazar, M. E. Martinez and P. Esbrit (2002). "Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells." J Biol Chem **277**(31): 28109-28117.

Guillot, X., L. Semerano, N. Saidenberg-Kermanac'h, G. Falgarone and M. C. Boissier (2010). "Vitamin D and inflammation." Joint Bone Spine **77**(6): 552-557.

Gutierrez, O. M., K. T. Smith, A. Barchi-Chung, N. M. Patel, T. Isakova and M. Wolf (2012). "(1-34) Parathyroid hormone infusion acutely lowers fibroblast growth factor 23 concentrations in adult volunteers." Clin J Am Soc Nephrol **7**(1): 139-145.

Guyton, A. C. and J. E. Hall (2000). Textbook of medical physiology. Philadelphia, Saunder.

Haase, M., R. Bellomo, I. Baldwin, A. Haase-Fielitz, N. Fealy, P. Davenport, S. Morgera, H. Goehl, M. Storr, N. Boyce and H. H. Neumayer (2007). "Hemodialysis membrane with a high-molecular-weight cutoff and cytokine levels in sepsis complicated by acute renal failure: a phase 1 randomized trial." Am J Kidney Dis **50**(2): 296-304.

Handel, A. E. and S. V. Ramagopalan (2012). "Vitamin D and multiple sclerosis: an interaction between genes and environment." Mult Scler **18**(1): 2-4.

Hara, H., Y. Yasunami and T. Adachi (2002). "Alteration of cellular phosphorylation state affects vitamin D receptor-mediated CYP3A4 mRNA induction in Caco-2 cells." Biochem Biophys Res Commun **296**(1): 182-188.

Hassan, Y., R. Al-Ramahi, N. Abd Aziz and R. Ghazali (2009). "Drug use and dosing in chronic kidney disease." Ann Acad Med Singapore **38**(12): 1095-1103.

Helvig, C. F., D. Cuerrier, C. M. Hosfield, B. Ireland, A. Z. Kharebov, J. W. Kim, N. J. Ramjit, K. Ryder, S. P. Tabash, A. M. Herzenberg, T. M. Epps and M. Petkovich (2010). "Dysregulation of renal vitamin D metabolism in the uremic rat." Kidney Int **78**(5): 463-472.

Henderson, S. J. and W. E. Lindup (1990). "Interaction of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, an inhibitor of plasma protein binding in uraemia, with human albumin." Biochem Pharmacol **40**(11): 2543-2548.

Higuchi, T., C. Yamamoto, T. Kuno, M. Mizuno, S. Takahashi and K. Kanmatsuse (1997). "Increased production of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist by peripheral blood mononuclear cells in undialyzed chronic renal failure." Nephron **76**(1): 26-31.

Himmelfarb, J. and T. A. Ikizler (2010). "Hemodialysis." N Engl J Med **363**(19): 1833-1845.

Hirasawa, H., S. Oda and K. Matsuda (2007). "Continuous hemodiafiltration with cytokine-adsorbing hemofilter in the treatment of severe sepsis and septic shock." Contrib Nephrol **156**: 365-370.

Hoare, S. R. and T. B. Usdin (2001). "Molecular mechanisms of ligand recognition by parathyroid hormone 1 (PTH1) and PTH2 receptors." Curr Pharm Des **7**(8): 689-713.

Ikegwuonu, F. I., M. Christou and C. R. Jefcoate (1999). "Regulation of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in mouse embryo fibroblast (C3H10T1/2) cells by protein kinase C (PKC)." Biochem Pharmacol **57**(6): 619-630.

Isakova, T. and M. S. Wolf (2010). "FGF23 or PTH: which comes first in CKD ?" Kidney Int **78**(10): 947-949.

Jansson, I., M. Curti, P. M. Epstein, J. A. Peterson and J. B. Schenkman (1990). "Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction." Arch Biochem Biophys **283**(2): 285-292.

Jansson, I., P. M. Epstein, S. Bains and J. B. Schenkman (1987). "Inverse relationship between cytochrome P-450 phosphorylation and complexation with cytochrome b5." Arch Biochem Biophys **259**(2): 441-448.

Kalvik, T. V. and T. Arnesen (2013). "Protein N-terminal acetyltransferases in cancer." Oncogene **32**(3): 269-276.

Kaplan, B., N. A. Mason, L. A. Shimp and F. J. Ascione (1994). "Chronic hemodialysis patients. Part I: Characterization and drug-related problems." Ann Pharmacother **28**(3): 316-319.

Katzung, B. G. (2004). Basic and clinical pharmacology. New York, Lange Medical Books/McGray-Hill.

Ke, S., A. B. Rabson, J. F. Germino, M. A. Gallo and Y. Tian (2001). "Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide." J Biol Chem **276**(43): 39638-39644.

Kevorkian, J. P., C. Michel, U. Hofmann, E. Jacqz-Aigrain, H. K. Kroemer, M. N. Peraldi, M. Eichelbaum, P. Jaillon and C. Funck-Brentano (1996). "Assessment of individual CYP2D6 activity in extensive metabolizers with renal failure: comparison of sparteine and dextromethorphan." Clin Pharmacol Ther **59**(5): 583-592.

Kim, Y. G., J. G. Shin, S. G. Shin, I. J. Jang, S. Kim, J. S. Lee, J. S. Han and Y. N. Cha (1993). "Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure." Clin Pharmacol Ther **54**(6): 612-620.

Kliwer, S. A., B. Goodwin and T. M. Willson (2002). "The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism." Endocr Rev **23**(5): 687-702.

Klin, M., M. Smogorzewski, H. Khilnani, M. Michnowska and S. G. Massry (1994). "Mechanisms of PTH-induced rise in cytosolic calcium in adult rat hepatocytes." Am J Physiol **267**(5 Pt 1): G754-763.

Klin, M., M. Smogorzewski and S. G. Massry (1995). "Chronic renal failure increases cytosolic Ca²⁺ of hepatocytes." Am J Physiol **269**(1 Pt 1): G103-109.

Klin, M., M. Smogorzewski, Z. Ni, G. Zhang and S. G. Massry (1996). "Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone." J Clin Invest **97**(10): 2167-2173.

Komaba, H., T. Kakuta and M. Fukagawa (2011). "Diseases of the parathyroid gland in chronic kidney disease." Clin Exp Nephrol **15**(6): 797-809.

Kraut, J. A. and N. E. Madias (2011). "Consequences and therapy of the metabolic acidosis of chronic kidney disease." Pediatr Nephrol **26**(1): 19-28.

Kroetz, D. L. and D. C. Zeldin (2002). "Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism." Curr Opin Lipidol **13**(3): 273-283.

LaClair, R. E., R. N. Hellman, S. L. Karp, M. Kraus, S. Ofner, Q. Li, K. L. Graves and S. M. Moe (2005). "Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States." Am J Kidney Dis **45**(6): 1026-1033.

Lam, Y. W., S. Banerji, C. Hatfield and R. L. Talbert (1997). "Principles of drug administration in renal insufficiency." Clin Pharmacokinet **32**(1): 30-57.

Langlois, K., L. Greene-Finestone, J. Little, N. Hidioglou and S. Whiting (2010). "Vitamin D status of Canadians as measured in the 2007 to 2009 Canadian Health Measures Survey." Health Rep **21**(1): 47-55.

Launay-Vacher, V., T. Storme, H. Izzedine and G. Deray (2001). "[Pharmacokinetic changes in renal failure]." Presse Med **30**(12): 597-604.

Lavi-Moshayoff, V., G. Wasserman, T. Meir, J. Silver and T. Naveh-Many (2010). "PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop." Am J Physiol Renal Physiol **299**(4): F882-889.

Leblond, F., C. Guevin, C. Demers, I. Pellerin, M. Gascon-Barre and V. Pichette (2001). "Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure." J Am Soc Nephrol **12**(2): 326-332.

Leblond, F. A., L. Giroux, J. P. Villeneuve and V. Pichette (2000). "Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure." Drug Metab Dispos **28**(11): 1317-1320.

Leblond, F. A., M. Petrucci, P. Dube, G. Bernier, A. Bonnardeaux and V. Pichette (2002). "Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure." J Am Soc Nephrol **13**(6): 1579-1585.

LeHoux, J. G., G. Dupuis and A. Lefebvre (2000). "Regulation of CYP11B2 gene expression by protein kinase C." Endocr Res **26**(4): 1027-1031.

LeHoux, J. G., G. Dupuis and A. Lefebvre (2001). "Control of CYP11B2 gene expression through differential regulation of its promoter by atypical and conventional protein kinase C isoforms." J Biol Chem **276**(11): 8021-8028.

Levey, A. S., B. C. Astor, L. A. Stevens and J. Coresh (2010). "Chronic kidney disease, diabetes, and hypertension: what's in a name?" Kidney Int **78**(1): 19-22.

Levey, A. S., K. U. Eckardt, Y. Tsukamoto, A. Levin, J. Coresh, J. Rossert, D. De Zeeuw, T. H. Hostetter, N. Lameire and G. Eknoyan (2005). "Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)." Kidney Int **67**(6): 2089-2100.

Levi, R. and J. Silver (2005). "Pathogenesis of parathyroid dysfunction in end-stage kidney disease." Pediatr Nephrol **20**(3): 342-345. Epub 2004 Nov 2010.

Levi, R. and J. Silver (2005). "Pathogenesis of parathyroid dysfunction in end-stage kidney disease." Pediatr Nephrol **20**(3): 342-345.

Levin, A., G. L. Bakris, M. Molitch, M. Smulders, J. Tian, L. A. Williams and D. L. Andress (2007). "Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease." Kidney Int **71**(1): 31-38.

Lewis, D. F. V. (2001). Guide to cytochrome P450, Structure and function. Boca Raton, CRC Press.

Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-734.

Libetta, C., V. Sepe, P. Esposito, F. Galli and A. Dal Canton (2011). "Oxidative stress and inflammation: Implications in uremia and hemodialysis." Clin Biochem **44**(14-15): 1189-1198.

Liles, A. M. (2011). "Medication considerations for patients with chronic kidney disease who are not yet on dialysis." Nephrol Nurs J **38**(3): 263-270.

Lin, H. F., Y. H. Li, C. H. Wang, C. L. Chou, D. J. Kuo and T. C. Fang (2012). "Increased risk of cancer in chronic dialysis patients: a population-based cohort study in Taiwan." Nephrol Dial Transplant **27**(4): 1585-1590.

Lin, J. H. (1995). "Species similarities and differences in pharmacokinetics." Drug Metab Dispos **23**(10): 1008-1021.

Liu, Y. T., H. P. Hao, C. X. Liu, G. J. Wang and H. G. Xie (2007). "Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors." Drug Metab Rev **39**(4): 699-721.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Looker, A. C., C. L. Johnson, D. A. Lacher, C. M. Pfeiffer, R. L. Schleicher and C. T. Sempos (2011). "Vitamin D status: United States, 2001-2006." NCHS Data Brief(59): 1-8.

Lu, C. and A. P. Li (2001). "Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog." Chem Biol Interact **134**(3): 271-281.

Lu, Y. and J. Q. Feng (2011). "FGF23 in skeletal modeling and remodeling." Curr Osteoporos Rep **9**(2): 103-108.

Lu, Z. G., H. Liu, T. Yamaguchi, Y. Miki and K. Yoshida (2009). "Protein kinase Cdelta activates RelA/p65 and nuclear factor-kappaB signaling in response to tumor necrosis factor-alpha." Cancer Res **69**(14): 5927-5935.

Lucchi, L., S. Banni, A. Iannone, M. P. Melis, G. Carta, E. Murru, L. Cordeddu, L. Stipo, S. Uggeri, V. Gatti, V. Malaguti and A. Albertazzi (2005). "Changes in conjugated linoleic acid and palmitoleic acid are correlated to retinol levels in chronic renal failure in both hemodialysis and conservative treatment patients." Artif Organs **29**(5): 413-418.

Lucchi, L., S. Banni, M. P. Melis, E. Angioni, G. Carta, V. Casu, R. Rapana, A. Ciuffreda, F. P. Corongiu and A. Albertazzi (2000). "Changes in conjugated linoleic acid and its metabolites in patients with chronic renal failure." Kidney Int **58**(4): 1695-1702.

Ma, Q. and A. Y. Lu (2007). "CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies." Drug Metab Dispos **35**(7): 1009-1016.

Mandayam, S. and V. B. Shahinian (2008). "Are chronic dialysis patients at increased risk for cancer?" J Nephrol **21**(2): 166-174.

Mannstadt, M., H. Juppner and T. J. Gardella (1999). "Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties." Am J Physiol **277**(5 Pt 2): F665-675.

Martignoni, M., G. M. Grootuis and R. de Kanter (2006). "Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction." Expert Opin Drug Metab Toxicol **2**(6): 875-894.

Massry, S. G., M. Klin, Z. Ni, J. Tian, L. Kedes and M. Smogorzewski (1995). "Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats." Kidney Int **48**(4): 1324-1331.

Massry, S. G. and M. Smogorzewski (1997). "Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver." Kidney Int Suppl **62**: S5-7.

Matzke, G. E. and R. F. Frey (1992). Drug dosing in patients with impaired renal function. Pharmacotherapy: A pathophysiologic basis. New York, Elsevier Science Publishing Inc: 750-763.

Matzke, G. R. and R. F. Frye (1997). "Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity." Drug Saf **16**(3): 205-231.

McFarlane, P. A. (2011). "Nocturnal hemodialysis: effects on solute clearance, quality of life, and patient survival." Curr Opin Nephrol Hypertens **20**(2): 182-188.

McLean, K. J., M. Hans and A. W. Munro (2012). "Cholesterol, an essential molecule: diverse roles involving cytochrome P450 enzymes." Biochem Soc Trans **40**(3): 587-593.

Messa, P., C. Alfieri and M. P. Rastaldi (2011). "Recent insights into vitamin D and its receptor." J Nephrol **24 Suppl 18**: S30-37.

Michaud, J., P. Dube, J. Naud, F. A. Leblond, K. Desbiens, A. Bonnardeaux and V. Pichette (2005). "Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450." Br J Pharmacol **144**(8): 1067-1077.

Michaud, J., P. Dubé, J. Naud, F. A. Leblond, K. Desbiens, A. Bonnardeaux and V. Pichette (2005). "Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450." Br J Pharmacol **144**(8): 1067-1077.

Michaud, J., J. Naud, J. Chouinard, F. Desy, F. A. Leblond, K. Desbiens, A. Bonnardeaux and V. Pichette (2006). "Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure." J Am Soc Nephrol **17**(11): 3041-3048.

Michaud, J., T. D. Nolin, J. Naud, M. Dani, J. P. Lafrance, F. A. Leblond, J. Himmelfarb and V. Pichette (2008). "Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression." J Pharmacol Sci **108**(2): 157-163.

Miller, W. L. and A. A. Portale (2003). "Vitamin D biosynthesis and vitamin D 1 alpha-hydroxylase deficiency." Endocr Dev **6**: 156-174.

Molanaei, H., P. Stenvinkel, A. R. Qureshi, J. J. Carrero, O. Heimbürger, B. Lindholm, U. Diczfalussy, I. Odar-Cederlöf and L. Bertilsson (2012). "Metabolism of alprazolam (a marker of CYP3A4) in hemodialysis patients with persistent inflammation." Eur J Clin Pharmacol **68**(5): 571-577.

Moore, L. B., D. J. Parks, S. A. Jones, R. K. Bledsoe, T. G. Consler, J. B. Stimmel, B. Goodwin, C. Liddle, S. G. Blanchard, T. M. Willson, J. L. Collins and S. A. Kliewer (2000). "Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands." J Biol Chem **275**(20): 15122-15127.

Morgan, E. T. (2001). "Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?" Drug Metab Dispos **29**(3): 207-212.

Morgan, E. T., T. Li-Masters and P. Y. Cheng (2002). "Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators." Toxicology **181-182**: 207-210.

Motiwala, S. R. and T. J. Wang (2012). "Vitamin D and Cardiovascular Risk." Curr Hypertens Rep **14**(3): 209-218.

Mrozikiewicz, P. M., E. Grzeskowiak, A. Seremak-Mrozikiewicz, A. Bogacz, M. Barlik, A. Semczuk, J. Bartkowiak-Wieczorek and K. Drews (2011). "Importance of CYP1A1 polymorphism and its transcriptional regulation in ovarian and endometrial cancer." Ginekol Pol **82**(12): 925-932.

Muniz-Junqueira, M. I., C. Braga Lopes, C. A. Magalhaes, C. C. Schleicher and J. P. Veiga (2005). "Acute and chronic influence of hemodialysis according to the membrane used on phagocytic function of neutrophils and monocytes and pro-inflammatory cytokines production in chronic renal failure patients." Life Sci **77**(25): 3141-3155. Epub 2005 Jul 3111.

Nash, T. (1953). "The calorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsh reaction." The Biochemical Journal **55**: 416-421.

Naud, J., J. Michaud, S. Beauchemin, M. J. Hebert, M. Roger, S. Lefrancois, F. A. Leblond and V. Pichette (2011). "Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats." Drug Metab Dispos **39**(8): 1363-1369.

Naud, J., J. Michaud, C. Boisvert, K. Desbiens, F. A. Leblond, A. Mitchell, C. Jones, A. Bonnardeaux and V. Pichette (2007). "Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats." J Pharmacol Exp Ther **320**(3): 978-985.

Naud, J., J. Michaud, F. A. Leblond, S. Lefrancois, A. Bonnardeaux and V. Pichette (2008). "Effects of chronic renal failure on liver drug transporters." Drug Metab Dispos **36**(1): 124-128.

Nebert, D. W. and D. W. Russell (2002). "Clinical importance of the cytochromes P450." Lancet **360**(9340): 1155-1162.

Nicoll-Griffith, D. A., N. Chauret, R. Houle, S. H. Day, M. D'Antoni and J. M. Silva (2004). "Use of a benzyloxy-substituted lactone cyclooxygenase-2 inhibitor as a selective fluorescent probe for CYP3A activity in primary cultured rat and human hepatocytes." Drug Metabolism and Disposition **32**(12): 1509-1515.

Niwa, T., N. Murayama and H. Yamazaki (2009). "Oxidation of Endobiotics Mediated by Xenobiotic-metabolizing Forms of Human Cytochrome P450." Curr Drug Metab **10** (7):700-712.

Nolin, T. D. (2008). "Altered nonrenal drug clearance in ESRD." Curr Opin Nephrol Hypertens **17**(6): 555-559.

Nolin, T. D., K. Appiah, S. A. Kendrick, P. Le, E. McMonagle and J. Himmelfarb (2006). "Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity." J Am Soc Nephrol **17**(9): 2363-2367.

Nolin, T. D., K. Appiah, S. A. Kendrick, P. Le, E. McMonagle and J. Himmelfarb (2006). "Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity." J Am Soc Nephrol **17**(9): 2363-2367.

Nolin, T. D., R. F. Frye and G. R. Matzke (2003). "Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease." Am J Kidney Dis **42**(5): 906-925.

Nugent, C., K. Roche, S. Wilson, M. Fitzgibbon, D. Griffin, N. Nichaidhin and E. Mulkerrin (2010). "The effect of intramuscular vitamin D (cholecalciferol) on serum 25OH vitamin D levels in older female acute hospital admissions." Ir J Med Sci **179**(1): 57-61.

Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch (2002). "Fast regulation of cytochrome P450 activities by phosphorylation and consequences for drug metabolism and toxicity." Biol Chem **383**(10): 1587-1592.

Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch (2003). "Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch." Arch Biochem Biophys **409**(1): 228-234.

Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch (2005). "Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 446-449.

Oettinger, C. W., L. A. Bland, J. C. Oliver, M. J. Arduino, S. K. McAllister and M. S. Favero (1994). "The effect of uremia on tumor necrosis factor-alpha release after an in vitro whole-blood endotoxin challenge." J Am Soc Nephrol **4**(11): 1890-1895.

Ohyama, Y. and T. Yamasaki (2004). "Eight cytochrome P450s catalyze vitamin D metabolism." Front Biosci **9**: 3007-3018.

Okuda, S., Y. Oh, H. Tsuruda, K. Onoyama, S. Fujimi, T. Omae and M. Fujishima (1985). "Rapidly progressive renal deterioration in partially nephrectomized rats with experimental membranous nephropathy." Nephron **41**(4): 359-364.

Orgaz-Molina, J., A. Buendia-Eisman, M. A. Arrabal-Polo, J. C. Ruiz and S. Arias-Santiago (2012). "Deficiency of serum concentration of 25-hydroxyvitamin D in psoriatic patients: A case-control study." J Am Acad Dermatol **67**(5): 931-938.

Patterson, S. E. and V. H. Cohn (1984). "Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure." Biochem Pharmacol **33**(5): 711-716.

Pham, H., K. M. Utzschneider and I. H. de Boer (2011). "Measurement of insulin resistance in chronic kidney disease." Curr Opin Nephrol Hypertens **20**(6): 640-646.

Pichette, V. and F. Leblond (2002). "Metabolism of drugs in chronic renal failure." Recent Res Devel Drug Metabol Disposition **1**: 43-56.

Pichette, V. and F. A. Leblond (2003). "Drug metabolism in chronic renal failure." Curr Drug Metab **4**(2): 91-103.

Pilz, S., H. Dobnig, A. Tomaschitz, K. Kienreich, A. Meinitzer, C. Friedl, D. Wagner, C. Piswanger-Solkner, W. Marz and A. Fahrleitner-Pammer (2012). "Low 25-Hydroxyvitamin D Is Associated with Increased Mortality in Female Nursing Home Residents." J Clin Endocrinol Metab **97**(4): E653-657.

Prosser, D. E. and G. Jones (2004). "Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D." Trends Biochem Sci **29**(12): 664-673.

Pyerin, W., F. Horn and H. Taniguchi (1987). "Posttranslational modifications of the cytochrome P-450 monooxygenase system." J Cancer Res Clin Oncol **113**(2): 155-159.

Qing, D. P., H. Ding, J. Vadgama, Y. Y. Wu and J. D. Kopple (1999). "Elevated myocardial cytosolic calcium impairs insulin-like growth factor-1-stimulated protein synthesis in chronic renal failure." J Am Soc Nephrol **10**(1): 84-92.

Quarles, L. D. (2008). "Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation." J Clin Invest **118**(12): 3820-3828.

Quarles, L. D. (2012). "Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: Implications in chronic kidney disease." Exp Cell Res **318**(9): 1040-1048.

Ray, W. J., G. Bain, M. Yao and D. I. Gottlieb (1997). "CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family." J Biol Chem **272**(30): 18702-18708.

Reid, D., B. J. Toole, S. Knox, D. Talwar, J. Harten, D. S. O'Reilly, S. Blackwell, J. Kinsella, D. C. McMillan and A. M. Wallace (2011). "The relation between acute changes in the systemic inflammatory response and plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations after elective knee arthroplasty." Am J Clin Nutr **93**(5): 1006-1011.

Reyes, M. and L. Z. Benet (2011). "Effects of uremic toxins on transport and metabolism of different biopharmaceutics drug disposition classification system xenobiotics." J Pharm Sci **100**(9): 3831-3842.

Rogacev, K. S., T. Pinsdorf, O. Weingartner, M. K. Gerhart, E. Welzel, K. van Bentum, J. Popp, A. Menzner, D. Fliser, D. Lutjohann and G. H. Heine (2012). "Cholesterol Synthesis, Cholesterol Absorption, and Mortality in Hemodialysis Patients." Clin J Am Soc Nephrol **7**(6): 943-948.

Rostami-Hodjegan, A., H. K. Kroemer and G. T. Tucker (1999). "In-vivo indices of enzyme activity: the effect of renal impairment on the assessment of CYP2D6 activity." Pharmacogenetics **9**(3): 277-286.

Rouissi, K., S. Ouerhani, B. Hamrita, K. Bougatef, R. Marrakchi, M. Cherif, M. R. Ben Slama, M. Bouzouita, M. Chebil and A. Ben Ammar Elgaaied (2011). "Smoking and polymorphisms in xenobiotic metabolism and DNA repair genes are additive risk

factors affecting bladder cancer in Northern Tunisia." Pathol Oncol Res **17**(4): 879-886.

Sakaki, T., N. Kagawa, K. Yamamoto and K. Inouye (2005). "Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450." Front Biosci **10**: 119-134.

Sameer, A. S., S. Nissar, Q. Qadri, S. Alam, S. M. Baba and M. A. Siddiqi (2011). "Role of CYP2E1 genotypes in susceptibility to colorectal cancer in the Kashmiri population." Hum Genomics **5**(6): 530-537.

Samouilidou, E. C., A. P. Karpouza, V. Kostopoulos, T. Bakirtzi, K. Pantelias, D. Petras, H. Tzanatou-Exarchou and J. G. E (2012). "Lipid abnormalities and oxidized LDL in chronic kidney disease patients on hemodialysis and peritoneal dialysis." Ren Fail **34**(2): 160-164.

Santoro, D., G. Bellinghieri, G. Conti, D. Pazzano, E. Satta, G. Costantino and V. Savica (2010). "Endothelial dysfunction in chronic renal failure." J Ren Nutr **20**(5 Suppl): S103-108.

Sato, K. A., R. W. Gray and J. Lemann, Jr. (1982). "Urinary excretion of 25-hydroxyvitamin D in health and the nephrotic syndrome." J Lab Clin Med **99**(3): 325-330.

Schmelzle, M., L. Dizdar, H. Matthaei, S. E. Baldus, J. Wolters, N. Lindenlauf, I. Bruns, R. P. Cadeddu, F. Kropil, S. A. Topp, J. Schulte am Esch, 2nd, C. F. Eisenberger, W. T. Knoefel and N. H. Stoecklein (2011). "Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome P450 2C9 (CYP2C9)." Prostaglandins Other Lipid Mediat **94**(1-2): 25-33.

Segre, G. V., H. D. Niall, J. F. Habener and J. T. Potts, Jr. (1974). "Metabolism of parathyroid hormone: physiologic and clinical significance." Am J Med **56**(6): 774-784.

Seki, T., M. Yamamoto, R. Ohwada, K. Takano, M. Kure, H. Sekine, Y. Katsura and K. Sato (2010). "Successful treatment of postsurgical hypoparathyroidism by intramuscular injection of vitamin D3 in a patient associated with malabsorption syndrome due to multiple abdominal surgeries." J Bone Miner Metab **28**(2): 227-232.

Shou, M. and A. Y. Lu (2009). "Antibodies as a probe in cytochrome P450 research." Drug Metab Dispos **37**(5): 925-931.

Sidhu, J. S. and C. J. Omiecinski (1995). "cAmp-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures." J Biol Chem **270**(21): 12762-12773.

Siew, E. D. and T. A. Ikizler (2010). "Insulin resistance and protein energy metabolism in patients with advanced chronic kidney disease." Semin Dial **23**(4): 378-382.

Silva, F. G. (2005). "The aging kidney: a review -- part I." Int Urol Nephrol **37**(1): 185-205.

Silver, J. and R. Levi (2005). "Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism." Clin Nephrol **63**(2): 119-126.

Silver, J. and R. Levi (2005). "Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease." Kidney Int Suppl(95): S8-12.

Silver, J. and T. Naveh-Many (2012). "FGF23 and the parathyroid." Adv Exp Med Biol **728**: 92-99.

Simard, E., J. Naud, J. Michaud, F. A. Leblond, A. Bonnardeaux, C. Guillemette, E. Sim and V. Pichette (2008). "Downregulation of hepatic acetylation of drugs in chronic renal failure." J Am Soc Nephrol **19**(7): 1352-1359.

Sliem, H., G. Tawfik, F. Moustafa and H. Zaki (2011). "Relationship of associated secondary hyperparathyroidism to serum fibroblast growth factor-23 in end stage renal disease: a case-control study." Indian J Endocrinol Metab **15**(2): 105-109.

Soliman, A., A. Adel, M. Wagdy, M. Al Ali and N. ElMulla (2008). "Calcium homeostasis in 40 adolescents with beta-thalassemia major: a case-control study of the effects of intramuscular injection of a megadose of cholecalciferol." Pediatr Endocrinol Rev **6 Suppl 1**: 149-154.

Soliman, A. T., M. El-Dabbagh, A. Adel, M. Al Ali, E. M. Aziz Bedair and R. K. Elalaily (2010). "Clinical responses to a mega-dose of vitamin D3 in infants and toddlers with vitamin D deficiency rickets." J Trop Pediatr **56**(1): 19-26.

Song, Y. S., H. J. Yang, E. S. Song, D. C. Han, C. Moon and J. H. Ku (2008). "Sexual function and quality of life in Korean women with chronic renal failure on hemodialysis: case-control study." Urology **71**(2): 243-246.

St Peter, W. L., K. A. Redic-Kill and C. E. Halstenson (1992). "Clinical pharmacokinetics of antibiotics in patients with impaired renal function." Clin Pharmacokinet **22**(3): 169-210.

Staudinger, J. L., C. Xu, A. Biswas and S. Mani (2011). "Post-translational modification of pregnane x receptor." Pharmacol Res **64**(1): 4-10.

Stenvinkel, P. and A. Alvestrand (2002). "Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy." Semin Dial **15**(5): 329-337.

Stenvinkel, P., O. Heimbürger, F. Paultre, U. Diczfalussy, T. Wang, L. Berglund and T. Jogestrand (1999). "Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure." Kidney Int **55**(5): 1899-1911.

Stenvinkel, P., M. Ketteler, R. J. Johnson, B. Lindholm, R. Pecoits-Filho, M. Riella, O. Heimbürger, T. Cederholm and M. Girndt (2005). "IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly." Kidney Int **67**(4): 1216-1233.

Stivelman, E. and R. Retnakaran (2012). "Role of vitamin D in the pathophysiology and treatment of type 2 diabetes." Curr Diabetes Rev **8**(1): 42-47.

Sueyoshi, T. and M. Negishi (2001). "Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 123-143.

Sun, H., L. Frassetto and L. Z. Benet (2006). "Effects of renal failure on drug transport and metabolism." Pharmacol Ther **109**(1-2): 1-11.

Sun, H., Y. Huang, L. Frassetto and L. Z. Benet (2004). "Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin." Drug Metab Dispos **32**(11): 1239-1246.

Sunder-Plassmann, G., S. Kapiotis, C. Gasche and U. Klar (1994). "Functional characterization of cytokine autoantibodies in chronic renal failure patients." Kidney Int **45**(5): 1484-1488.

Swan, S. K. and W. M. Bennett (1992). "Drug dosing guidelines in patients with renal failure." West J Med **156**(6): 633-638.

Swarthout, J. T., R. C. D'Alonzo, N. Selvamurugan and N. C. Partridge (2002). "Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells." Gene **282**(1-2): 1-17.

Taburet, A. M., I. Vincent, L. Perello, B. Coret, B. Baune and V. Furlan (1996). "Impairment of drug biotransformation in renal disease an in vitro model." American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics **59**(2): 136.

Takemoto, F., T. Shinki, K. Yokoyama, T. Inokami, S. Hara, A. Yamada, K. Kurokawa and S. Uchida (2003). "Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats." Kidney Int **64**(2): 414-420.

Teng, S. and M. Piquette-Miller (2005). "The involvement of the pregnane X receptor in hepatic gene regulation during inflammation in mice." J Pharmacol Exp Ther **312**(2): 841-848.

Terao, N. and D. D. Shen (1985). "Reduced extraction of l-propranolol by perfused rat liver in the presence of uremic blood." J Pharmacol Exp Ther **233**(2): 277-284.

Tian, Y., S. Ke, M. S. Denison, A. B. Rabson and M. A. Gallo (1999). "Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity." J Biol Chem **274**(1): 510-515.

Tissandie, E., Y. Gueguen, J. M. Lobaccaro, J. Aigueperse and M. Souidi (2006). "[Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases]." Med Sci (Paris) **22**(12): 1095-1100.

Touchette, M. A. and R. L. Slaughter (1991). "The effect of renal failure on hepatic drug clearance." DIAP **25**(11): 1214-1224.

Tsimihodimos, V., Z. Mitrogianni and M. Elisaf (2011). "Dyslipidemia associated with chronic kidney disease." Open Cardiovasc Med J **5**: 41-48.

Urena, P., A. B. Abou Samra, H. Juppner, X. F. Kong, K. Lee, F. R. Bringhurst and G. V. Segre (1994). "[Mode of action of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide (PTHrP) in target organs]." Ann Endocrinol (Paris) **55**(5): 133-141.

Usdin, T. B., T. I. Bonner and S. R. Hoare (2002). "The parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor." Receptors Channels **8**(3-4): 211-218.

Vanholder, R., R. De Smet and S. Ringoir (1993). "Factors influencing drug protein binding in patients with end stage renal failure." Eur J Clin Pharmacol **44**(Suppl 1): S17-21.

Vaziri, N. D. (2004). "Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences." Semin Nephrol **24**(5): 469-473.

Vaziri, N. D. (2009). "Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure." Semin Dial **22**(6): 644-651.

Vaziri, N. D. and K. Norris (2011). "Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease." Blood Purif **31**(1-3): 189-196.

Vilardaga, J. P., M. Frank, C. Krasel, C. Dees, R. A. Nissenson and M. J. Lohse (2001). "Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein." J Biol Chem **276**(36): 33435-33443.

Vilardaga, J. P., G. Romero, P. A. Friedman and T. J. Gardella (2011). "Molecular basis of parathyroid hormone receptor signaling and trafficking: a family B GPCR paradigm." Cell Mol Life Sci **68**(1): 1-13.

Ward, R. A. (2011). "Do clinical outcomes in chronic hemodialysis depend on the choice of a dialyzer?" Semin Dial **24**(1): 65-71.

Watkins, P. B., S. A. Wrighton, E. G. Schuetz, D. T. Molowa and P. S. Guzelian (1987). "Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man." J Clin Invest **80**(4): 1029-1036.

Waxman, D. J., C. Attisano, F. P. Guengerich and D. P. Lapenson (1988). "Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme." Arch Biochem Biophys **263**(2): 424-436.

Waxman, D. J., D. P. Lapenson, T. Aoyama, H. V. Gelboin, F. J. Gonzalez and K. Korzekwa (1991). "Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s." Arch Biochem Biophys **290**(1): 160-166.

Wedlund, P. J., W. S. Aslanian, C. B. McAllister, G. R. Wilkinson and R. A. Branch (1984). "Mephenytoin hydroxylation deficiency in Caucasians: frequency of a new oxidative drug metabolism polymorphism." Clin Pharmacol Ther **36**(6): 773-780.

Wei, P., J. Zhang, M. Egan-Hafley, S. Liang and D. D. Moore (2000). "The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism." Nature **407**(6806): 920-923.

Willson, T. M. and S. A. Kliewer (2002). "PXR, CAR and drug metabolism." Nat Rev Drug Discov **1**(4): 259-266.

Wolf, M. (2009). "Fibroblast growth factor 23 and the future of phosphorus management." Curr Opin Nephrol Hypertens **18**(6): 463-468.

Wong, G., A. Hayen, J. R. Chapman, A. C. Webster, J. J. Wang, P. Mitchell and J. C. Craig (2009). "Association of CKD and cancer risk in older people." J Am Soc Nephrol **20**(6): 1341-1350.

Xie (2009). Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Wiley.

Yamasaki, T., S. Izumi, H. Ide and Y. Ohyama (2004). "Identification of a novel rat microsomal vitamin D3 25-hydroxylase." J Biol Chem **279**(22): 22848-22856.

Yamazaki, M., S. Akiyama, R. Nishigaki and Y. Sugiyama (1996). "Uptake is the rate-limiting step in the overall hepatic elimination of pravastatin at steady-state in rats." Pharm Res **13**(10): 1559-1564.

Yavuz, A., C. Tetta, F. F. Ersoy, V. D'Intini, R. Ratanarat, M. De Cal, M. Bonello, V. Bordoni, G. Salvatori, E. Andrikos, G. Yakupoglu, N. W. Levin and C. Ronco (2005). "Uremic toxins: a new focus on an old subject." Semin Dial **18**(3): 203-211.

Yoshitani, T., H. Yagi, N. Inotsume and M. Yasuhara (2002). "Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats." Biol Pharm Bull **25**(8): 1077-1083.

Zhou, C., M. M. Tabb, E. L. Nelson, F. Grun, S. Verma, A. Sadatrafieji, M. Lin, S. Mallick, B. M. Forman, K. E. Thummel and B. Blumberg (2006). "Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation." J Clin Invest **116**(8): 2280-2289.

Ziesche, R., M. Roth, E. Papakonstantinou, M. Nauck, W. H. Horl, M. Kashgarian and L. H. Block (1994). "A granulocyte inhibitory protein overexpressed in chronic renal disease regulates expression of interleukin 6 and interleukin 8." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 301-305.

Zisman, A. L., M. Hristova, L. T. Ho and S. M. Sprague (2007). "Impact of ergocalciferol treatment of vitamin D deficiency on serum parathyroid hormone concentrations in chronic kidney disease." Am J Nephrol **27**(1): 36-43.

Zordoky, B. N. and A. O. El-Kadi (2009). "Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes." Curr Drug Metab **10**(2): 164-178.