

Université de Montréal

Modulation par l'insuffisance rénale chronique des protéines impliquées dans le transport intestinal des médicaments

par
Judith Naud

Département de Pharmacologie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître es Sciences
en Pharmacologie

décembre 2005

©, Judith Naud, 2005



Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Modulation par l'insuffisance rénale chronique des protéines impliquées dans le
transport intestinal des médicaments

présenté par :
Judith Naud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Chantal Lambert

président-rapporteur

Dr Vincent Pichette

directeur de recherche

Dr Jean-Pierre Villeneuve

membre du jury

RÉSUMÉ FRANÇAIS

Plusieurs études démontrent une augmentation de la biodisponibilité des médicaments en insuffisance rénale chronique (IRC). Le but de ce projet est de mesurer l'effet de l'IRC sur l'expression et l'activité des transporteurs membranaires intestinaux pouvant affecter la biodisponibilité des médicaments en modifiant leur absorption. Les transporteurs agissent comme importateurs (*organic-anion-transport-polypeptide type 3* [Oatp3]) ou exportateurs (P-glycoprotéine [Pgp], *multi-drug-resistance-related-protein type 2* [MRP2]) de médicaments à la membrane intestinale. L'équilibre entre les deux types de transporteurs assure une biodisponibilité constante et prévisible des médicaments. Notre hypothèse est qu'en IRC, cet équilibre est perturbé, favorisant une plus grande absorption intestinale des médicaments et augmentant leur biodisponibilité. L'IRC a été induite chez des rats par néphrectomie 5/6. Quarante-deux jours post-chirurgie, l'intestin a été prélevé pour analyses. La sévérité de l'IRC a été évaluée par la clairance de la créatinine qui diminue de $353.4 \pm 14,8$ chez les animaux sains à 115.2 ± 11.0 $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ de poids corporel chez les animaux insuffisants. Par immunobuvardage, nous avons démontré une diminution de 64% et 59% de l'expression protéique de la Pgp et de MRP2 dans l'intestin. Ceci n'est toutefois pas du à une diminution de l'ARNm puisqu'il reste inchangé pour les trois transporteurs mesurés (Pgp, MRP2, Oatp3). Finalement, des diminutions de 32% et de 24% de l'activité de la Pgp et de MRP2 ont été mesurées par la technique de l'intestin renversé. Les résultats obtenus démontrent que l'expression et l'activité d'au moins deux transporteurs d'exportation des médicaments sont diminuées en

IRC, ce qui contribue à expliquer l'augmentation de la biodisponibilité des médicaments.

MOTS CLÉS

P-glycoprotéine, MRP2, Oatp3, transport des médicaments, biodisponibilité, intestin, médiateur(s) sérique(s)

RÉSUMÉ ANGLAIS

It is well known that chronic renal failure (CRF) affects the bioavailability of many drugs. This project measured the effects of CRF on the expression and activity of the intestinal membrane transporters that can affect the bioavailability of drugs by modifying their absorption. Transporters can either import the drugs in the intestine towards the blood circulation (organic-anion-transport-polypeptide type 3 [Oatp3]) or act as export pumps to prevent absorption of the drugs (P-glycoprotein [Pgp], multi-drug-resistance-related-protein type 2 [MRP2]) in the intestinal membrane. The balance between these transporters ensures a constant and predictable bioavailability of orally administered drugs. Our hypothesis is that CRF perturbs this balance causing a greater intestinal absorption of drugs and an increase of their bioavailability. CRF was induced in rats by 5/6th nephrectomy. Forty-two days after surgery, the intestine was harvested for analysis. CRF was evaluated by measuring the clearance of creatinine which diminished from $353.4 \pm 14,8$ in control rats to $115.2 \pm 11.0 \mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ of body weight in CRF rats. Western blot analysis of the intestinal cells demonstrated a 64% and 59% decrease of Pgp and MRP2 protein expression. This was not due to a loss in mRNA expression as it was unchanged for the three transporters herein studied (Pgp, MRP2, Oatp3). Finally, a 32% and 24% decrease of Pgp and MRP2 activity were measured using everted gut sacs. These results demonstrate that the expression and activity of at least two export pumps is decreased in CRF. This contributes to the understanding of the mechanism regulating the increased bioavailability of drugs in CRF.

KEYWORDS:

P-glycoprotein, MRP2, Oatp3, drug transport, bioavailability, intestine, serum mediator(s)

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ FRANÇAIS	v
RÉSUMÉ ANGLAIS.....	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS.....	xiv
INTRODUCTION	1
1. L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE.....	1
2. L'ÉLIMINATION DES MÉDICAMENTS	3
2.1. LA BIOTRANSFORMATION EN IRC	4
3. LA DISTRIBUTION DES MÉDICAMENTS	7
3.1. DISTRIBUTION DES MÉDICAMENTS EN IRC	8
4. L'ABSORPTION DES MÉDICAMENTS.....	10
4.1. FACTEURS PHYSIOLOGIQUES	10
4.2. BIOTRANSFORMATION INTESTINALE.....	11
4.3. TRANSPORT DES MÉDICAMENTS.....	14
4.3.1 P-GLYCOPROTÉINE	15
4.3.2 MRP2	17
4.3.3 OATP3	18
4.3.4 TRANSPORT DES MÉDICAMENTS EN IRC	20
5. HYPOTHÈSE	21
6. OBJECTIFS.....	22
ARTICLE	23
ABREVIATIONS	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUCTION	26
MATERIAL AND METHODS.....	29
RESULTS.....	37

DISCUSSION	41
ACKNOWLEDGEMENTS	46
REFERENCES	47
LEGENDS	52
TABLES	55
FIGURES	57
DISCUSSION	64
CONCLUSION	79
RÉFÉRENCES	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Les stades de l'IRC.....	1
--	---

Tableau II L'effet de l'IRC sur la biodisponibilité des médicaments.....	12
--	----

ARTICLE

Table I Nucleotide sequences of primers.....	55
--	----

Table II Characteristic of the control and CRF rats.....	56
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Certains transporteurs intestinaux.....	15
--	----

ARTICLE

Figure 1 Protein expression of intestinal drug transporters in intestine.....	57
---	----

Figure 2 Immunohistochemistry for Pgp and MRP2 on intestinal tissue.....	58
--	----

Figure 3 mRNA expression of intestinal drug transporters.....	59
---	----

Figure 4 <i>In situ</i> hybridization for Pgp and MRP2 on intestinal tissue.....	60
--	----

Figure 5 Pgp and MRP2 transport activity measured by everted gut technique.....	61
---	----

Figure 6 Correlations between creatinine clearance and the protein expression and activity of Pgp and MRP2.....	62
---	----

Figure 7 Protein expression of Pgp and MRP2 in cultured enterocytes.....	63
--	----

SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ABC transporters : *ATP-Binding cassette transporters*

AH : acide hippurique

ARNi : acide ribonucléique interférant

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

CDF : 5-(et-6)-carboxy-2',7' dichlorofluoresceine

CDF-DA : 5-(et-6)-carboxy-2',7' dichlorofluoresceine di-acétate

CMPF : *3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid*

CYP450 : cytochrome P450

IGF-1 : facteur de croissance insulino-mimétique de type I

IL-1 β : interleukine-1 β

IL-6 : interleukine-6

IL-8 : interleukine-8

IRC : insuffisance rénale chronique

IS : *indoxyl sulfate*

MRP2 : *multidrug-resistance-related-protein de type 2*

OATP : *organic-anion-transport-polypeptide*

Oatp2 : *organic-anion-transport-polypeptide de type 2*

Oatp3 : *organic-anion-transport-polypeptide de type 3*

PCR : réaction de polymérase en chaîne

Pgp : P-glycoprotéine

PTH : hormone parathyroïdienne

qPCR : réaction de polymérase en chaîne quantitative

Rho-123 : rhodamine 123

SHPT : hyperparathyroïdie secondaire

TFG : taux de filtration glomérulaire

TNF- α : facteur de nécrose tumorale α

V_d : volume de distribution

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Vincent Pichette de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir offert un soutien constant tout au long de ma maîtrise. Je remercie Dr Francois Leblond pour sa générosité dans le soutien technique et intellectuel qu'il m'a apporté de même que pour son incroyable expertise dans d'innombrables domaines. Merci à Josée Michaud pour avoir été ma consœur de laboratoire et mon soutien moral. Merci à Karine Desbiens pour son soutien et l'aide qu'elle m'a apportée. Merci au Dr François Boudreau de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la réalisation des expériences d'hybridation *in situ* ainsi que pour tout le support qui m'a été apporté. Merci à Christine Jones de m'avoir suivie tout au long de mon apprentissage de l'hybridation *in situ*. Un merci particulier à Chantal Lambert et Jean-Pierre Villeneuve pour leur évaluation de ce mémoire de maîtrise. Finalement, je remercie les Fonds de recherche en Santé du Québec pour le soutien financier qu'ils m'ont accordé.

INTRODUCTION

1. L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE

L'incidence de l'insuffisance rénale chronique (IRC) augmente régulièrement depuis les dernières décennies. En effet, au Canada, on dénotait 23 601 patients traités en dialyse, le stade terminal de l'IRC en 1999, soit plus que les années précédentes où il y avait respectivement 21 867 et 20 446 patients dialysés ¹. Aux États-Unis, la prévalence de l'IRC est aussi très importante, puisque plus de 10% de la population est à haut risque de développer une insuffisance rénale et près de 5% de la population est atteinte d'insuffisance rénale modérée à sévère ².

Il existe 5 stades de l'insuffisance rénale chronique. Ces différents stades sont présentés dans le tableau suivant adapté d'un article de Levey publié dans le New England Journal of Medicine en 2002 ².

Tableau I : Les stades de l'IRC

Stade et définition	Taux de filtration glomérulaire (TFG)	Prévalence aux USA chez les adultes		Plan d'action clinique
	mL/min/1,73 m ²	(milliers)	(%)	
À haut risque	=90 avec facteurs de risque	>20 000	>10	Suivi régulier
1- Dommage rénal avec TFG normal ou élevé	=90	5 900	3,3	Traitement des facteurs de risque
2- Dommage rénal et TFG un peu diminué	60-89	5 300	3,0	Estimation de la progression
3- TFG modérément diminué	30-59	7 600	4,3	Traitement des complications
4- TFG sévèrement diminué	15-29	400	0,2	Préparation à la dialyse et à la greffe rénale
5- Insuffisance rénale terminale	<15 (ou dialyse)	300	0,1	Dialyse et greffe rénale

Les niveaux 1 et 2 sont caractérisés par la présence d'un dommage rénal sans modification du taux de filtration glomérulaire ou avec une légère diminution. L'insuffisance rénale plus sévère est caractérisée par un taux de filtration glomérulaire inférieur à 60mL/min/1,73m² pendant une période supérieure à 3 mois. Le traitement par dialyse est envisagé lorsque le patient atteint le cinquième stade, soit un taux de filtration glomérulaire inférieur à 15 mL/min/1,73m² ³.

Les causes de l'IRC sont très variables, les plus courantes étant : le diabète, l'hypertension, les maladies rénales ischémiques et les glomérulonéphrites ². Les coûts associés au traitement de ces patients ont progressivement augmenté au cours des dernières décennies pour plusieurs raisons. Le coût des médicaments administrés ne cesse de croître de même que les coûts associés aux traitements de dialyse. De plus, une mauvaise posologie des médicaments administrés en IRC entraîne une forte incidence d'effets secondaires dont le traitement est très dispendieux ⁴.

Des études montrent que les patients au stade 5 de l'IRC prennent en moyenne 11 médicaments différents chaque jour pour traiter les causes de l'IRC ainsi que les états pathologiques qui en découlent comme l'hyperparathyroïdie ou l'anémie ³. De plus, 40% des patients avec une clairance de créatinine de moins de 40 mL/min, soit aux troisième, quatrième et cinquième stades de l'IRC, reçoivent une dose trop élevée de médicaments (1,07 à 6,45 fois la dose recommandée) malgré un ajustement de la dose en fonction du taux de filtration glomérulaire du

patient ⁵. L'utilisation excessive de médicaments ainsi que le dosage inapproprié augmentent le risque d'effets secondaires, incluant la néphrotoxicité, augmentant ainsi le coût de traitement des patients ^{4, 6, 7}. Par exemple, en 1995, Johnson et Bootman ont estimé que 76,6 milliards de dollars américains étaient dépensés chaque année, toutes pathologies confondues, pour traiter les cas de morbidité et de mortalité dus à une mauvaise utilisation de médicaments ⁸.

Un dosage approprié des médicaments dans les cas d'IRC est donc essentiel pour éviter l'apparition d'effets secondaires, pour minimiser le temps et les coûts associés au traitement des patients souffrant de ces effets et pour assurer leur bien-être. Afin de pouvoir offrir aux patients un dosage approprié des médicaments, il est important de bien comprendre comment l'IRC affecte la pharmacocinétique de ceux-ci.

2. L'ÉLIMINATION DES MÉDICAMENTS

La pharmacocinétique d'un médicament comprend son absorption, sa distribution et son élimination. Il a été démontré que l'IRC affecte chacune de ces étapes compromettant ainsi l'administration des médicaments ⁹.

L'IRC est caractérisée par une importante diminution du taux de filtration glomérulaire et de la sécrétion tubulaire affectant directement le processus d'élimination rénale de plusieurs médicaments comme la metformine, la

vancomycine et l'acétazolamide ³. Plus précisément, leur clairance rénale ¹⁰. C'est pourquoi la dose de médicament administrée est ajustée en fonction du taux de filtration glomérulaire de chaque patient.

La clairance totale d'un médicament est égale à la somme des clairances rénale, biliaire et métabolique. La clairance métabolique d'un médicament correspond au volume sanguin entièrement épuré d'un composé par les différentes enzymes de biotransformation par unité de temps ⁹. Il existe deux mécanismes principaux de biotransformation : les mécanismes de phase I et de phase II. La phase I constitue une réaction d'oxydoréduction entre les médicaments et les enzymes du cytochrome P450 (CYP450) afin d'augmenter leur hydrosolubilité et, ainsi, permettre leur élimination rénale ou biliaire. L'oxydation par le CYP450 peut aussi servir d'étape préparatoire à la conjugaison avec de grosses protéines hydrosolubles encore dans le but de faciliter l'excrétion des médicaments liposolubles. Il s'agit du mécanisme de phase II où les principales réactions sont la glucuronidation, la sulfatation, l'acétylation, la méthylation et la conjugaison au glutathion.

2.1. LA BIOTRANSFORMATION EN IRC

Chez des patients souffrant d'IRC, une augmentation de la demi-vie de certains médicaments à élimination majoritairement métabolique a été observée. Par exemple, le repaglinide, un agent hypoglycémiant métabolisé par les CYP2C8 et CYP3A4 hépatiques et excrété par voie biliaire, présente une demi-vie 4 fois plus

longue chez les patients souffrant d'IRC à un stade avancé démontrant ainsi une importante diminution de ses clairances biliaire et métabolique ¹¹. Une étude *in vivo* publiée en 2003 par Dowling *et al.* qui étudiait le métabolisme de l'érythromycine par test d'exhalation a permis de démontrer une diminution de 28% de sa biotransformation dans des cas de maladies rénales au stade terminal ¹². Le test d'exhalation de l'érythromycine consiste à administrer, par voie intra-veineuse, de la N-méthyl-érythromycine marquée au carbone 14 (¹⁴C) sur son groupement méthyle. La biotransformation de l'érythromycine par le CYP3A4 entraîne la libération du groupement méthyle. On retrouve le ¹⁴C ainsi libéré dans le CO₂ expiré par le patient. Il a été démontré que la quantité de ¹⁴C expiré est directement proportionnelle à l'activité du CYP3A4 ¹³. Les résultats de Dowling *et al.* suggèrent donc une réduction de 28% de l'activité du CYP3A4 chez les patients atteints de maladies rénales au stade terminal, cet isoforme étant responsable du métabolisme de la majorité des xénobiotiques chez l'humain ¹².

Le même type de résultats a été obtenu pour ce qui est des réactions de phase II. Par exemple, le diacerein, un anti-inflammatoire non-stéroïdien majoritairement métabolisé par le foie, subit deux réactions de phase II ; 60% de chaque dose administrée est glucuronidé, 20% est sulfaté alors que seulement 20% est éliminé inchangé par les reins ¹⁴. Une étude de Debord *et al.* (1994) ¹⁵ démontre que le métabolisme non-rénal du diacerein est diminué de 40% chez les patients souffrant d'IRC sévère. Dans ce cas, l'auteur recommande même une diminution de

50% de la dose administrée chez un patient souffrant d'IRC par rapport à un patient en santé ¹⁵.

Des modèles d'IRC chez l'animal ont permis d'obtenir des résultats semblables et de mieux comprendre les répercussions de l'IRC sur la biotransformation des médicaments. En effet, Leblond *et al.* (2000) ¹⁶ ont induit l'IRC par néphrectomie subtotalaire chez des rats. Ceci consiste à procéder à l'ablation des 2/3 du rein gauche et, une semaine plus tard, à l'ablation totale du rein droit. Avec ce modèle d'IRC, Leblond *et al.* ont démontré une diminution de 35% de l'activité des CYP2C11 et CYP3A2 (l'équivalent du CYP3A4 humain) par un test d'exhalation utilisant comme substrats l'aminopyrine et l'érythromycine ¹⁶. Dans cette même étude, il a également été démontré que cette diminution d'activité était accompagnée d'une diminution de l'expression protéique des CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2 de 45%, 85% et 65% en plus d'une diminution de l'ARNm de ces différents isoformes du CYP450. L'activité, l'expression protéique et l'ARNm du CYP1A2 étaient toutefois inchangés ¹⁶, ce qui démontre une spécificité dans l'effet de l'IRC sur les différents CYP450 hépatiques.

Le même groupe de chercheurs a démontré que c'est un facteur présent dans le sérum urémique qui entraîne ces changements dans le métabolisme des médicaments par le CYP450. En effet, l'incubation d'hépatocytes avec 10% de sérum de rat urémique pendant 24h entraîne une diminution de l'expression protéique des CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2 de 38%, 43%, 80% et 68% ¹⁷. L'ARNm

était aussi diminué de 27% pour le CYP2C11 et de 36 % pour le CYP3A2. De plus, la N-déméthylation de l'érythromycine par le CYP3A2 était diminuée de 50%. Ces différentes modulations du CYP450 étaient toutes dépendantes de la concentration de sérum urémique dans le milieu et du temps d'incubation des cellules avec le sérum provenant de rats souffrant d'IRC ¹⁷. À ce jour, aucune étude n'a été publiée sur des modèles animaux concernant le métabolisme de phase II.

En résumé, il est clairement établi que l'élimination rénale et métabolique des médicaments est affectée par l'insuffisance rénale, ce qui a pour effet d'augmenter leur concentration sanguine et de possiblement augmenter le risque d'effets secondaires.

3. LA DISTRIBUTION DES MÉDICAMENTS

Le volume de distribution (V_d) d'un médicament est aussi très important pour déterminer la dose qui doit être administrée. Le volume de distribution permet de déterminer la capacité d'un médicament à pénétrer dans les différents organes. On peut l'utiliser pour déterminer quelle dose de médicament devra être administrée pour obtenir une concentration sanguine à l'intérieur de l'indice thérapeutique du médicament. Le V_d , de façon abstraite, représente le volume fictif de liquide ou de tissus nécessaire pour obtenir une concentration de médicament égale à celle retrouvée dans le sang pour une dose donnée ^{3, 18}. C'est toutefois seulement la fraction libre d'un médicament, c'est-à-dire la portion de médicament non-liée aux

protéines plasmatiques et tissulaires, qui peut passer au travers des membranes cellulaires et produire l'effet recherché. Les principaux facteurs déterminant le V_d sont la liaison aux protéines plasmatiques et tissulaires, le volume total de liquide corporel et les propriétés physico-chimiques du médicament. Un changement physiopathologique qui affecterait l'un ou l'autre de ces facteurs, entraînerait une augmentation ou une réduction de la fraction libre et pourrait causer de la toxicité ou une perte d'efficacité, surtout pour des médicaments à faible indice thérapeutique.

3.1. DISTRIBUTION DES MÉDICAMENTS EN IRC

Il a été démontré que l'IRC affecte la liaison aux protéines plasmatiques de plusieurs médicaments ^{4, 18, 19}. Les médicaments acides, par exemple la pénicilline, le furosémide, les barbituriques, les sulphonamides et la phénytoïne, sont surtout liés à l'albumine plasmatique ²⁰. Les patients souffrant d'IRC présentent une diminution du taux sanguin d'albumine et une modification de son site de liaison aux médicaments. De plus, ces patients prennent plusieurs médicaments et ils présentent des taux d'acides organiques endogènes augmentés qui peuvent compétitionner pour le-dit site de liaison ^{4, 7, 19} ce qui entraîne une augmentation de la fraction libre des médicaments et possiblement un effet toxique. Par exemple, l'acide hippurique inhibe la liaison aux protéines de la phénytoïne de manière dose-dépendante ¹⁹. Cela a pour effet d'augmenter la fraction libre du médicament et peut entraîner des effets secondaires.

À l'inverse, les médicaments alcalins, par exemple le propranolol, la morphine et la vancomycine, sont majoritairement liés à l' α_1 -glycoprotéine acide, une protéine sanguine. Les concentrations d' α_1 -glycoprotéine sont souvent augmentées en IRC. Bien que ceci pourrait théoriquement causer une diminution de la concentration plasmatique libre des médicaments alcalins, pour la majorité d'entre eux, cette dernière demeure inchangée¹⁸.

Finalement, l'IRC cause une augmentation du volume total de liquide, une augmentation des tissus adipeux et une diminution de la masse musculaire. Cela crée des effets contradictoires pour des médicaments hydrophiles comme la morphine et le pravastatin. En effet, la rétention d'eau par augmentation du volume total de liquide extracellulaire et par des ascites, peut, en théorie, causer une augmentation du V_d et ainsi diminuer la concentration plasmatique du médicament. Toutefois, la perte de masse musculaire associée à l'IRC ainsi que l'augmentation des tissus adipeux peut réduire le V_d et augmenter la concentration plasmatique de différents médicaments hydrophiles en augmentant la fraction libre⁹.

En résumé, la distribution des médicaments acides est la plus affectée par l'IRC, en raison d'un volume de distribution diminué et d'une plus grande fraction libre qui augmente les risques d'effets secondaires.

4. L'ABSORPTION DES MÉDICAMENTS

L'absorption d'un médicament est une étape clé de sa pharmacocinétique, car elle influence directement sa biodisponibilité. La biodisponibilité d'un médicament correspond à la proportion d'une dose donnée qui atteint la circulation sanguine et elle dépend de plusieurs facteurs. Dans le cas d'un médicament administré par voie orale, les propriétés physico-chimiques du médicament telles que son poids moléculaire, son pKa, sa lipophilicité et son hydrosolubilité sont très importantes de même que la physiologie du tractus gastro-intestinal soit le pH, le transit, la vidange gastrique et l'interaction des médicaments avec divers aliments ²¹. Les deux autres facteurs majeurs pouvant influencer la biodisponibilité d'un médicament donné oralement sont son métabolisme pré-systémique et son extrusion cellulaire ²²⁻²⁵.

4.1. FACTEURS PHYSIOLOGIQUES

L'IRC affecte le tractus gastro-intestinal de plusieurs façons. Tout d'abord, plusieurs patients souffrent d'un ralentissement de la motilité intestinale ⁴. Toutefois, l'impact de ce ralentissement sur la biodisponibilité des médicaments devrait être négligeable puisque selon Gugler et Hallagyer (1990) ²⁶, un changement de la motilité gastrique affecte le temps nécessaire pour atteindre la concentration sanguine maximale, mais pas la biodisponibilité. L'augmentation de la concentration d'urée dans la salive causée par l'IRC semble stimuler la production d'ammoniaque par l'uréase gastrique, ce qui a pour conséquence d'augmenter le pH gastrique ^{9, 27}.

L'alcalinisation du tractus gastro-intestinal peut affecter l'ionisation et la dissolution des médicaments dont l'absorption est optimale dans un environnement acide, par exemple le furosémide, et en réduire la biodisponibilité^{9, 26}. Le pH gastrique peut aussi être augmenté par la prise de plusieurs médicaments comme les antiacides, les inhibiteurs de la pompe à protons et les inhibiteurs du récepteur H₂ de l'histamine qui réduisent la biodisponibilité des médicaments absorbés en milieu acide¹¹. La prise de tels médicaments n'est pas rare en IRC et une augmentation de la biodisponibilité de certains médicaments faiblement acides comme l'ibuprofène et le tolbutamide qui sont mieux absorbés en environnement plus alcalins a été observée⁹.

4.2. BIOTRANSFORMATION INTESTINALE

Bien que le foie joue un rôle crucial dans la biotransformation des médicaments, on retrouve des enzymes de phase I et de phase II dans d'autres organes, particulièrement l'intestin^{24, 28}.

Le système de biotransformation prédominant dans l'intestin est le CYP450^{24, 29, 30}. Le CYP450 intestinal est le premier site de biotransformation pour les médicaments administrés par voie orale et il est impliqué dans le métabolisme de premier passage (ou pré-systémique) qui cause la biotransformation d'une fraction des doses administrées avant leur entrée dans la circulation systémique²³. Suite à son entrée dans l'entérocyte, un médicament peut être métabolisé par le CYP450 intestinal entraînant la formation de métabolites actifs ou inactifs. Le médicament et

ses métabolites entrent ensuite dans la veine porte qui va directement au foie où ils peuvent encore être transformés par le CYP450 et les enzymes de phase II avant de finalement rejoindre la circulation systémique. Comme mentionné plus haut, il est bien connu que l'IRC affecte les enzymes de biotransformation hépatiques ce qui a pour effet de diminuer le métabolisme de premier passage hépatique des médicaments de même que leur clairance métabolique. Toutefois, toutes modifications au niveau du CYP450 intestinal pourraient aussi avoir d'importantes répercussions sur la biodisponibilité des médicaments par diminution de leur biotransformation dans l'étape intestinale du métabolisme de premier passage²³.

À ce jour, aucune étude *in vivo* chez l'humain n'a démontré les répercussions de l'IRC sur le métabolisme de premier passage intestinal des médicaments. Toutefois, il a été démontré que la biodisponibilité de plusieurs médicaments était augmentée chez les patients souffrant d'IRC comme on peut le voir dans le tableau suivant^{6, 7, 31-35} :

Tableau II : L'effet de l'IRC sur la biodisponibilité des médicaments

Biodisponibilité inchangée en IRC	Biodisponibilité augmentée en IRC
Cimétidine	Dextropropoxyphène
Cyprofloxacine	Dihydrocodéine
Codéine	Érythromycine
Digoxine	Oxprenolol
Labétalol	Propranolol
Triméthoprime	Immunosuppresseurs
Sulfaméthoxazole	Antagonistes β -adrénergiques
	Inhibiteurs de la protéase du VIH

Certains de ces médicaments, par exemple le propranolol, sont sujets au métabolisme de premier passage ³⁶. Puisque sa biodisponibilité est augmentée lors de l'IRC, il est possible que son métabolisme intestinal soit diminué.

Pour vérifier cette hypothèse, Leblond *et al.* (2002) ³⁷ ont mesuré, à l'aide du modèle de rats néphrectomisés décrit plus haut, l'expression et l'activité de différents isoformes du CYP450 dans des microsomes d'intestin. Ils ont démontré que l'expression protéique des CYP1A1 et CYP3A2 (le CYP3A2 représentant près du trois-quarts du CYP450 intestinal ⁹) était diminuée de 43% et 71%. Ces diminutions étaient associées à une diminution de plus de 30% de l'ARNm de chacun des 2 isoformes. Finalement, les tests d'activité *in vitro* mesurant la O-dééthylation de l'éthoxyrésorufine et la N-déméthylation de l'érythromycine ont démontré une baisse d'au moins 25% de l'activité métabolique des CYP1A1 et CYP3A2. Théoriquement, ceci pourrait entraîner une diminution de la quantité de médicament métabolisée avant d'atteindre la circulation sanguine. Les médicaments qui auraient normalement été dégradés en métabolites inactifs entrent donc intacts dans la circulation sanguine, ce qui peut entraîner l'apparition d'effets secondaires à cause de l'augmentation de leur biodisponibilité. Par ailleurs, les médicaments qui auraient dû être activés par le CYP450 produisent moins d'effet à cause d'une diminution de la quantité de métabolites actifs produits. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la biodisponibilité que l'on observe pour des médicaments comme l'érythromycine et le propranolol.

4.3. TRANSPORT DES MÉDICAMENTS

Le dernier facteur pouvant affecter l'absorption et la biodisponibilité des médicaments est leur transport actif au niveau de la membrane épithéliale intestinale. On parle de la perméabilité intestinale d'un médicament. La perméabilité totale du médicament dépend de sa perméabilité passive, de sa perméabilité d'absorption et de sa perméabilité sécrétoire. Les deux dernières sont influencées par le transport actif des médicaments par des transporteurs membranaires vers la circulation sanguine ou vers la lumière intestinale³⁸. Les différents transporteurs membranaires peuvent être classés en 3 catégories importantes. La première comprend les transporteurs situés sur la membrane apicale des entérocytes favorisant l'entrée des médicaments dans l'entérocyte (influx). Le plus connu de ces transporteurs est le *organic-anion-transport-polypeptide de type 3* (Oatp3). La deuxième catégorie comprend les transporteurs situés sur la membrane apicale ou basolatérale permettant la sortie des médicaments de l'entérocyte vers la circulation sanguine ou la lumière intestinale (efflux). Ces transporteurs peuvent donc avoir une action d'absorption ou sécrétrice selon qu'ils sont situés sur la membrane apicale ou basolatérale des entérocytes. Les plus connus sont les P-glycoprotéines (Pgp) et la *multidrug-resistance-related-protein de type 2* (MRP2) qui ont tous les deux une action sécrétrice puisqu'ils sont situés sur la membrane apicale des entérocytes. La dernière catégorie correspond aux transporteurs retrouvés sur la membrane basolatérale des entérocytes, qui extraient les médicaments du réseau sanguin pour les rejeter dans l'entérocyte. Ces transporteurs ont un impact au niveau de la sécrétion des médicaments, mais leur rôle est

négligeable par rapport au rôle joué par le foie pour l'élimination des médicaments.

Ces différents transporteurs sont présentés dans la figure ci-dessous.

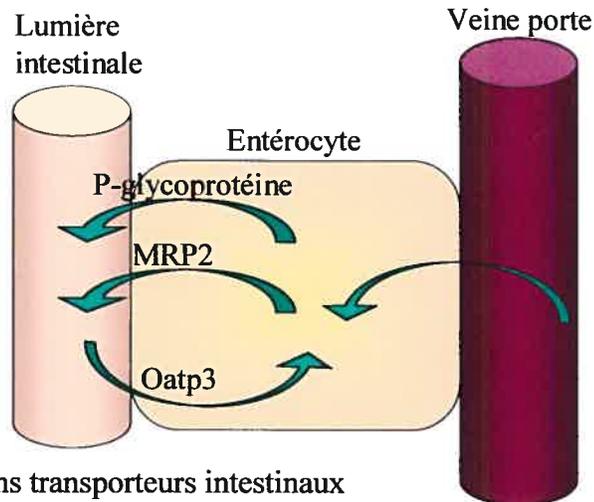


Figure 1 : Certains transporteurs intestinaux

4.3.1 P-GLYCOPROTÉINE

Les Pgp ont été découvertes en raison de leur capacité de conférer de la résistance aux médicaments aux cellules cancéreuses ³⁹. Elles font partie de la superfamille des *ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters*. Elles utilisent donc l'énergie de l'ATP pour effectuer le transport rétrograde des médicaments vers la lumière intestinale. Les Pgp ont un poids moléculaire de 170 kDa ⁴⁰. Elles sont encodées chez l'humain par les gènes *MDR1* et *MDR3* (*mdr1a*, *mdr1b* et *mdr2* chez les rongeurs) ⁴¹⁻⁴⁵. Ce sont les Pgp encodées par les gènes *MDR1*, *mdr1a* et *mdr1b* qui confèrent la résistance aux médicaments alors que *MDR3* et *mdr2* servent de translocateurs de phospholipides ^{40, 46, 47}. On retrouve les Pgp du côté apical dans plusieurs épithéliums du corps humain comme la muqueuse intestinale, les canalicules biliaires et dans le tubule proximal rénal ^{45, 48}. Cette distribution à travers

le corps humain laisse supposer que le rôle des Pgp est de protéger le corps humain de l'accumulation de substances toxiques comme les xénobiotiques. La Pgp la plus abondante dans l'intestin de rat est celle encodée par *mdr1a*⁴⁵ et la mention de Pgp la désignera par la suite. En effet, plusieurs auteurs ont conclu que la *mdr1b* était indétectable dans la muqueuse intestinale^{45,49}.

La Pgp est une protéine transmembranaire exprimée seulement à la surface des villi des entérocytes matures^{48, 50}. Sa distribution n'est pas égale sur toute la longueur de l'intestin. En effet, l'expression protéique de la Pgp est croissante du duodénum jusqu'à la fin de l'iléon, ce qui entraîne une absorption différente des médicaments selon la région intestinale⁵¹.

La Pgp effectue le transport de plusieurs composés cationiques ou neutres⁵².⁵³ En effet, plusieurs classes de médicaments ont été identifiées comme étant des substrats de la Pgp²⁵. Les principales sont les inhibiteurs de protéase du VIH, les agents chimiothérapeutiques, les immunosuppresseurs (ex : cyclosporine, tacrolimus, sirolimus) et les antagonistes β -adrénergiques. Même si plusieurs études *in vitro* de transport de médicament sur monocouche de cellules Caco-2, un lignée cellulaire immortalisée de carcinome de côlon humain exprimant les différents transporteurs intestinaux, ont confirmé le rôle de la Pgp dans la sécrétion de ces médicaments, la meilleure preuve a été obtenue par Schinkel *et al.* à l'aide de souris déficientes pour la Pgp. En effet, dans ce modèle, l'absence de Pgp au niveau intestinal entraîne une augmentation de 2 à 6 fois de la biodisponibilité du paclitaxel^{54,55}.

Finalement, la Pgp et le CYP450 sont induits ou inhibés par plusieurs substances communes. Par exemple, la dexaméthasone et le rifampin ont tous deux été présentés comme des inducteurs de la Pgp alors que le kétoconazole et le diltiazem ont été présentés comme des inhibiteurs^{45, 46}. Il n'y a toutefois pas de lien commun qui a été établi au niveau du mécanisme qui mènerait à l'inhibition des deux systèmes⁵³.

4.3.2 MRP2

Le second transporteur d'extrusion en importance dans l'intestin est MRP2. Il fait lui aussi partie de la superfamille des *ABC Transporters*. Il s'agit d'une protéine à 17 passages transmembranaires qui a un poids moléculaire d'environ 190 kDa. Son gène est le *MRP2* chez l'humain et *mrp2* chez les rongeurs. MRP2 est situé sur la membrane apicale des entérocytes matures à l'extrémité des villi et il utilise l'énergie de l'ATP pour effectuer le transport rétrograde de plusieurs composés anioniques. L'expression de MRP2 est croissante du duodénum jusqu'au jéjunum, puis elle diminue dans l'iléon⁵¹. Parmi ses différents substrats, on retrouve le pravastatin, le méthotrexate et surtout les produits de la phase II du métabolisme comme les produits conjugués au glutathion et au sulfate. Plusieurs études démontrent un chevauchement des substrats entre la Pgp et MRP2. En effet, les agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine et la vinblastine sont aussi transportés par MRP2, mais à une moins grande échelle que par la Pgp. Certains qualifient ce transport de négligeable^{56, 57}. Des différences au niveau des inhibiteurs permettent toutefois de constater que leurs

substrats ne sont pas identiques. En effet, des inhibiteurs de la Pgp comme la cyclosporine A et le vérapamil n'ont pas ou peu d'effet sur le transport de MRP2⁵⁶. MRP2 transporte donc quelques médicaments non conjugués, mais surtout des médicaments conjugués par les enzymes de phase II, ce que la Pgp ne fait pas.

Une modification de l'activité de l'un ou l'autre des transporteurs : Pgp ou MRP2, pourrait avoir un effet important sur la biodisponibilité de leurs médicaments substrats. Par exemple, suite à des injections de millepertuis pendant 14 jours chez des volontaires sains, l'expression protéique de la Pgp a augmenté de 1,4 fois entraînant une diminution de 18% de la biodisponibilité de la digoxine⁵⁸. Une diminution de l'activité de ces deux transporteurs ou encore une interaction médicamenteuse pourrait augmenter la biodisponibilité de leurs médicaments substrats. Par exemple, la coadministration de paclitaxel avec la cyclosporine A, un inhibiteur de la Pgp, entraîne une augmentation de 10 fois de la biodisponibilité du paclitaxel chez des patients porteurs d'une tumeur solide⁵⁹. Ceci met bien en évidence le rôle de la Pgp et du MRP2 intestinaux qui est de diminuer l'absorption orale des médicaments.

4.3.3 OATP3

Le transporteur d'inclusion par excellence dans l'intestin, est Oatp3. On le retrouve sur la membrane apicale des entérocytes matures à l'extrémité des villi. Il existe 9 OATPs chez l'humain et 11 chez le rat, mais dans l'intestin, on n'en retrouve

qu'un seul, soit Oatp3 (OATP-B chez l'humain) ³⁸. Les OATPs sont des glycoprotéines à 12 passages transmembranaires avec un poids moléculaire de 80 à 90 kDa. Oatp3 effectue le transport vers l'entérocyte de plusieurs anions organiques et de plusieurs composés neutres comme la pravastatine, la digoxine, la fexofenadine, les sels biliaires et la bilirubine ^{38, 60}. Les mécanismes de transport par les OATP n'ont pas été très bien caractérisés ^{38, 60}. Il a toutefois été démontré qu'une augmentation de l'activité de Oatp3 dans l'intestin a pour effet d'augmenter la biodisponibilité d'un médicament qu'il transporte, puisque celui-ci a un passage facilité de la lumière intestinale vers la circulation sanguine. Une diminution de l'activité de Oatp3 intestinal a l'effet inverse, soit une diminution de la biodisponibilité orale des médicaments qu'il transporte.

C'est la somme de l'activité (perméabilité) de chacun de ces transporteurs qui doit être étudiée dans l'évaluation de la biodisponibilité d'un médicament. En effet, un médicament qui est à la fois absorbé par Oatp3 et rejeté par la Pgp a une perméabilité finale moindre qu'un médicament qui est seulement transporté par Oatp3. Par exemple, la fexofenadine est fortement transportée dans l'entérocyte par Oatp3 et rejetée par la Pgp. Ceci a pour effet que sa biodisponibilité orale est de seulement 30% de la dose donnée, puisqu'une bonne partie de la dose absorbée est rejetée dans la lumière intestinale ³⁸. De plus, avant d'être rejetés par la Pgp ou MRP2, les médicaments peuvent être métabolisés par le CYP450 et les enzymes de phase II intestinaux, ce qui permet une élimination des médicaments à la source. Il faut aussi noter qu'un médicament rejeté dans la lumière intestinale par la Pgp ou par

MRP2 peut toujours être réabsorbé par Oatp3 ou par diffusion passive et être de nouveau rejeté et ainsi de suite, comme, par exemple, l'indinavir qui voit sa biodisponibilité orale diminuée par le CYP3A4 à la suite de plusieurs passages dans les entérocytes. Ceci a été démontré *in vitro* par des tests de transport et de métabolisme sur des cellules Caco-2⁶¹. Ceci démontre bien que l'équilibre entre les différents transporteurs est essentiel pour assurer une biodisponibilité prévisible et reproductible des médicaments.

4.3.4 TRANSPORT DES MÉDICAMENTS EN IRC

À ce jour, très peu d'études ont tenté de déterminer les effets de l'IRC sur les différents transporteurs de médicaments dans l'intestin ainsi que le rôle de ces derniers dans l'augmentation de la biodisponibilité des médicaments chez les patients urémiques. *In vivo*, des études humaines ont clairement démontré l'importance de la Pgp intestinale dans la variation interpatient de la biodisponibilité orale de la cyclosporine. En effet, il a été démontré que la variabilité dans la biodisponibilité orale et la concentration sanguine maximale de la cyclosporine était associée à l'expression de la Pgp chez des patients ayant reçu une greffe rénale⁵⁰. Les auteurs n'ont cependant pas établi de corrélation entre l'expression de la Pgp et la fonction rénale des patients.

Veau *et al.* ont aussi démontré une diminution de l'activité intestinale de la Pgp chez des rats ayant subi une néphrectomie subtotale sans toutefois observer de

changement au niveau de son expression protéique et de son ARNm ⁶². L'équipe de Murakami (2002) a obtenu les mêmes résultats en insuffisance rénale aiguë induite par le glycérol chez des rats. Il s'agit d'un insuffisance rénale de courte durée qui est causée par la toxicité rénale d'une dose de glycérol administrée par voie veineuse chez des rats. Dans ce modèle, ils ont noté une diminution de l'activité de la Pgp intestinale sans changement de son expression protéique ⁶³. Finalement, Huang *et al.* (2000) ont démontré *in vitro* une diminution de l'activité de la Pgp en présence de sérum de rat en insuffisance rénale aiguë. Ils ont incubé des Caco-2 avec les sérums et ils ont démontré une inhibition du transport de la rhodamine 123, un substrat spécifique à la Pgp ⁶⁴. Les deux autres transporteurs intestinaux, MRP2 et Oatp3 n'ont toutefois pas été étudiés à ce jour en IRC.

5. HYPOTHÈSE

En résumé, la pharmacocinétique des médicaments lors de l'IRC est affectée à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'élimination des médicaments est perturbée tant au niveau rénal que métabolique. Ensuite, la distribution des médicaments est affectée à cause des changements physiopathologiques qui surviennent en IRC. Ces phénomènes sont bien connus et ils pourraient être suffisants pour expliquer l'augmentation de l'incidence des effets secondaires des médicaments observés lors de l'IRC. Toutefois, l'absorption orale des médicaments semble aussi être modifiée, comme le démontre l'augmentation de la biodisponibilité de plusieurs médicaments lors de l'IRC. Cela a, cependant, été beaucoup moins étudié.

Le but de ce travail de maîtrise était d'étudier les effets de l'IRC sur l'absorption des médicaments. Plus particulièrement, l'effet de l'IRC sur les différents transporteurs de médicaments. Notre hypothèse de travail est que l'IRC affecte la biodisponibilité des médicaments en diminuant l'activité de la Pgp et de MRP2 et en augmentant l'activité de Oatp3, ce qui expliquerait en partie l'accumulation observée des médicaments. Ces modulations seraient dues à des changements de l'expression protéique et génique des différents transporteurs par un facteur circulant chez les patients souffrant d'IRC.

6. OBJECTIFS

Afin de vérifier la véracité de notre hypothèse, nous avons établi plusieurs objectifs de travail :

- 1) déterminer l'effet de l'IRC sur l'expression protéique et génique de la Pgp, de MRP2 et de Oatp3 dans l'intestin de rats néphrectomisés,
- 2) déterminer l'effet de l'IRC sur l'activité de la Pgp et de MRP2 par la technique de l'intestin inversé en utilisant des substrats spécifiques,
- 3) vérifier *in vitro* l'effet du sérum urémique sur l'expression protéique de la Pgp et de MRP2 dans des entérocytes de rat en culture, et finalement,
- 4) déterminer l'effet du sérum de rat urémique sur le transport de la rhodamine 123, un substrat de la Pgp, par des Caco-2 en culture.

Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats

Judith Naud^{1,2}, Josée Michaud^{1,2}, Karine Desbiens¹, Francois A. Leblond Ph.D¹,
Andrew Mitchell MD¹, Christine Jones³, Alain Bonnardeaux MD Ph.D¹ and
Vincent Pichette MD Ph.D^{1,2}

¹Service de néphrologie et Centre de recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada

²Département de pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada

³Département de biologie cellulaire et moléculaire, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

Correspondence should be addressed to: Vincent Pichette MD Ph.D.
Centre de recherche Guy-Bernier
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal,
Québec, Canada
H1T 2M4
Tel: (514) 252-3489
Fax: (514) 255-3026
E-mail: 

Short title: Decreased drug transporters in renal failure

Key words: gene expression, P-glycoprotein, multidrug resistance related protein, organic anion transporting polypeptide, *in situ* hybridization, immunohistochemistry, everted gut transport.

Abbreviations

ABC transporters: ATP-Binding cassette transporters

ARF: acute renal failure

CDF: 5-(et-6)-carboxy-2', 7' dichlorofluorescein

CDF-DA: 5-(et-6)-carboxy-2', 7' dichlorofluorescein di-acetate

CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid

CRF: chronic renal failure

CYP450: cytochrome P450

GFR: glomerular filtration rate

IL-1: interleukin-1

IL-6: interleukin-6

IS: indoxyl sulfate

MRP2: multidrug resistance related protein type 2

Oatp2: organic anion transport polypeptide type 2

Oatp3: organic anion transport polypeptide type 3

Pgp: P-glycoprotein

Rho-123: rhodamine 123

ABSTRACT

Background and Aims: Chronic renal failure (CRF) is associated with an increased bioavailability of drugs by a poorly understood mechanism. One hypothesis is a reduction in the elimination of drugs by the intestine, *i.e.* drug elimination mediated by protein membrane transporters such as P-glycoprotein (Pgp) and multi-drug-resistance-related protein (MRP). The present study aimed to investigate the repercussions of CRF on intestinal transporters involved in drug luminal absorption (organic-anion-transporting-polypeptide type 3 (Oatp3)) and those implicated in drug luminal extrusion (Pgp and MRP). **Methods:** Pgp, MRP2 and Oatp3 protein (Western and immunohistochemistry) and mRNA (qPCR and *in situ* hybridization) expression were assessed in the intestine of CRF (induced by 5/6th nephrectomy) and control rats. Pgp and MRP2 activities were measured using the everted gut technique. Rat enterocytes and Caco-2 cells were incubated with sera from control and CRF rats to characterize the mechanism of transporters down-regulation. **Results:** Protein expression of Pgp and MRP2 were reduced by more than 40% ($p < 0.01$) in CRF rats while Oatp3 expression remained unchanged. There was no difference in the mRNA levels assessed by real time PCR. Pgp and MRP2 activities were decreased by 30% and 25% respectively in CRF rats compared to control ($p < 0.05$). Uremic sera induced a reduction in protein expression and in activity of drug transporters compared to control sera. **Conclusion:** CRF in rats is associated with a decrease in intestinal Pgp and MRP2 protein expression and function secondarily to serum uremic factors. This reduction could explain the increased bioavailability of drugs in CRF.

INTRODUCTION

Chronic renal failure (CRF) interferes with renal elimination of many drugs as a result of the reduction in glomerular filtration rate (GFR) and tubular secretion. Dose adjustment of kidney excreted drugs is usually done according to the GFR. However, despite dosage adjustment, patients with CRF present a great number of drug adverse side effects¹. Part of this phenomenon is related to the fact that CRF also affects the non-renal route of elimination of drugs, *i.e.* hepatic and intestinal metabolisms of drugs¹⁻⁵. Drug accumulation in CRF could also be explained by alterations in the non-metabolic clearance of drugs by the liver and the intestine, *i.e.* drug elimination mediated by protein membrane transporters such as P-glycoprotein (Pgp) and multidrug-resistance-related protein type 2 (MRP2).

Oral bioavailability *i.e.* the quantity of drug reaching the blood circulation, depends on different factors, the two most important being pre-systemic metabolism (intestinal and hepatic) and intestinal drug transport^{5, 6}. Pre-systemic metabolism is primarily associated with intestinal and liver cytochrome P450 (CYP450), while drug extrusion and import is mediated by several membrane proteins (transporters). The most important intestinal extrusion transporters are Pgp and MRP2 while the most important intestinal import transporter is the organic-anion-transporting-polypeptide type 3 (Oatp3). Any modification in these systems will have important repercussions in the bioavailability of xenobiotics⁶.

The effects of CRF on the bioavailability of drugs are poorly documented, but several studies have shown an increase in the bioavailability of many drugs such as erythromycin, dextropropoxyphene, dihydrocodeine, oxprenolol, propranolol, tolamolol, and tacrolimus in patients with CRF ^{1, 7, 8}. This could be related to a decrease in intestinal extrusion or pre-systemic metabolism of these drugs. We have demonstrated that intestinal activity and expression of CYP450 are decreased by 40 % in rats with CRF ⁹. On the other hand, very few studies have described the repercussions of CRF on intestinal drug transporters. Veau *et al.* reported a decrease in intestinal transport of rhodamine 123 (Rho-123), pointing to an inhibition of intestinal Pgp activity ¹⁰. Furthermore, Huang *et al.* demonstrated that the incubation of Caco-2 cells with serum from rats with acute renal failure (ARF) decreases Pgp mediated transport of Rho-123 ¹¹, suggesting that serum from animals with ARF contains mediators which could down-regulate Pgp. However, the mechanism leading to decrease Pgp activity and the effects of CRF on other intestinal drug transporters are unknown.

The objectives of this study were to determine the effects of CRF on intestinal drug transporters and to define the mechanisms leading to their down-regulation. To achieve this goal, we measured, in CRF and control rats, 1) intestinal Pgp and MRP2 as well as Oatp3 protein and mRNA expression and 2) intestinal Pgp and MRP2 activities using specific substrates. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization studies were also conducted on the same groups. Finally, rat enterocytes and Caco-2 cells were incubated with sera from control and CRF rats to

determine the effects of uremic factors on intestinal drug transporters and to characterize the mechanism by which the transporters are down-regulated.

MATERIALS AND METHODS

All reagents were of ACS grades or higher and, unless otherwise stated, purchased from Sigma Chemicals (St-Louis, MO).

Experimental models

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St-Constant, PQ), weighing 200 to 300 g were housed in the Research Center animal care facility. An acclimatization 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.

Studies were performed in two groups of 25 animals: control pair-fed and CRF. Drug transporters protein expression and mRNA levels as well as drug transporters activities were assessed in the two groups (n=10 in both groups). Immunochemistry was done in 10 rats (5 CRF and 5 controls) while *in situ* hybridization studies were done in some of these rats. In order to evaluate the effects of uremic sera, sera from 16 rats were used (8 CRF and 8 controls).

Chronic renal failure was induced by two-stage five-sixth nephrectomy, as previously described¹². Control pair-fed rats were fed the same amount of rat chow that was ingested by the CRF rats on the previous day. Body weight was measured every other day for the duration of the study. At day 41 after the first nephrectomy, the

rats were housed in metabolic cages and urine was collected for 24 hours to determine the clearance of creatinine. Rats were sacrificed 42 days after nephrectomy.

Intestinal membrane protein preparation

Intestinal membrane proteins were prepared from enterocytes obtained by elution, based on the methods of Weiser *et al.* as previously published^{13, 14}. The third collected fraction was rapidly pelleted and frozen in liquid nitrogen to be used for mRNA level assessment. The six remaining fractions were pooled and homogenized in 0.9% NaCl, 0.1 mM PMSF using a Potter-Elvehjem tissue grinder (Wheaton Science Products, Millville, NJ). Aliquots were stored at -80°C until western blot analysis.

Western blot analysis

Drug transporters Pgp, MRP2 and Oatp3 protein expression were assessed by Western blot analysis. Every blot was repeated three times and results were pooled to obtain the final reported values. The major intestinal cytochrome P450 isoform implicated in the metabolism of drugs in rats (CYP3A2) was also assessed by Western blot analysis as described previously⁹.

Pgp and MRP2 were detected using mouse monoclonal antibodies from ID Labs (London, Ontario, Canada): C219 and M₂ III-6 respectively. Oatp3 was detected using rabbit anti-rat Oatp3 antibody from US Biological (Swampscott, MA). Villin (a protein specific to mature enterocytes) was also measured by

Western blot using a mouse anti-chicken villin antibody (Chemicon International, Temecula, CA). Villin was used as a loading control for Western analysis. In preliminary experiments, we have demonstrated that the expression of villin was not modified in CRF rats compared to controls (results not shown). Immune complexes were revealed by secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG from Sigma) coupled to peroxidase and the Luminol derivative of Lumi-Light Western blotting substrate (Roche Diagnostic, Laval, Quebec, Canada). Immune reaction intensity was determined by a digital camera Fuji LAS-3000 (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan) and analysed by computer-assisted densitometry.

RNA isolation and real time PCR

Total RNA was extracted from the third eluted fraction of enterocytes using Trizol reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). RNA concentrations were determined by measuring absorbance at 260nm. One μg of total RNA was used to prepare cDNA by reverse transcription using Omniscript RT kit from QIAGEN (Mississauga, Ontario, Canada) and random primer from Invitrogen. The mRNA encoding for Pgp (mdr1a), MRP2 and Oatp3 were measured by quantitative Real-Time PCR (qPCR) using Platinum SybrGreen PCR Supermix UDG from Invitrogen and appropriate primers on a Icyler thermocycler (BioRad, Mississauga, Ontario, Canada) with 30-sec incubation at 94°C, 30-sec incubation at 60°C and 30-sec incubation at 72°C. A standard curve was achieved by cloning the PCR product of each transporter into pCr 2.1 plasmid (TA cloning kit, Invitrogen) which were then

used at different known concentrations allowing us to determine the number of copies of the genes expressed in each intestinal sample.

Table I shows the sequences of primers used for the quantification of mRNA for each transporter. Primers were selected to discriminate between isoforms and between cDNA and genomic DNA and were obtained from Sigma.

Immunohistochemistry studies

Biopsies of intestines were fixed in buffered 4% paraformaldehyde (PFA) for 24h and embedded in paraffin in transversal orientation to allow exposure of the intestinal lumen on the slides. Slides were deparaffined and treated in EDTA 0.1M (pH 8.0) under microwaves. Endogenous peroxidases were blocked in H₂O₂-methanol for 10 minutes. After blocking with protein blocking agent for 30 minutes, slides were incubated for 60 minutes with the primary antibody used for western blotting. Immune complexes were revealed with the LSAB® 2 System HRP from Dako (Mississauga, Ontario, Canada), following instructions provided by the manufacturer. Slides were counter-stained using hematoxyline and mounted.

***In situ* hybridization studies**

In situ hybridization probes were prepared as follows: primers for *mdr1a* and *mrp2* were modified to include T7 sequence at the 5' extremity of the sense primers and SP6 sequence at the 5' extremity of the anti-sense primer. PCR reactions were performed in intestinal cDNA as follows: *mdr1a* T7 sens primer with *mdr1a* anti-

sense primer, therefore creating a sense probe used as a negative control, and *mdr1a* sense primer with *mdr1a* SP6 anti-sense primer creating an anti-sense probe for the localization of mRNA. The same PCRs were performed with the *mrp2* genes. Digoxigenin (DIG) labeled RNA probes were obtained using DIG-labeled RNA polymerase kit (Roche Diagnostic) with T7 or SP6 RNA polymerases and 1 µg of each PCR product. Sense (T7) and anti-sense (SP6) probes were stored at -80°C until hybridization. Slides were prepared as for the immunohistochemistry studies. *In situ* hybridization was performed according to Roche Applied Science's DIG application manual for non-radioactive *in situ* hybridization. RNA complexes were colored by incubation of the slides with the alkaline phosphatase substrates NBT and BCIP until the apparition of a brown coloration. Finally, slides were washed in PBS, dried and mounted for observation.

Pgp and MRP2 activity in everted gut

Pgp function was evaluated by the *in vitro* transport of Rho-123 (Sigma) across rat everted gut sacs as previously described^{10, 16}. The ileum (where Pgp is more abundant) was removed above the caecum from fasted rats, washed in ice-cold 0.9% saline and cut into 6 cm long segments. These were everted, ligated at each extremity, filled with 0.7 ml of 300 µM Rho-123 in buffer A and maintained at 37°C in 40 mL of oxygenated buffer A throughout the experiment. Secretion of Rho-123 from the serosal to the mucosal side was measured by sampling 200 µL of the external medium every 15 minutes up to 120 min. The rate of Rho-123 transport was expressed in pmoles excreted in the mucosal compartment per minute. In order

to evaluate the residual transport of Rho-123 in this model, the Pgp inhibitor verapamil was added at concentrations of 300 $\mu\text{mol/l}$ ¹⁶ to both mucosal and serosal sides after 90 minutes. Rho-123 was measured by spectrofluorometry (excitation: 485 nm, emission: 530 nm).

MRP2 activity was evaluated by the transport of 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) using the everted gut sacs system. Everted jejunum (where MRP2 is most abundant) segments were filled with 0.7 ml of 100 μM 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDF-DA) (Molecular Probes, Eugene, OR) in buffer A. CDF was administered in the form of CDF-DA to facilitate the passive absorption into the cells. CDF-DA was digested into CDF by esterases immediately after diffusion into the cells¹⁷. Excretion of CDF from the serosal to the mucosal side by MRP2 was measured by sampling 200 μL of the external medium every 15 minutes up to 120 min. The MRP2 inhibitor probenecid was added at a concentration of 10 mM after 90 minutes^{17, 18}. A CDF standard curve was prepared with CDF from Molecular Probes. CDF was measured by spectrofluorometry (ex: 485 nm, em: 530 nm).

Effects of uremic serum on intestinal drug transporters

In order to determine whether uremic serum could affect the expression and function of intestinal drug transporters, two sets of experiments were conducted using normal rat enterocytes or Caco-2 cells. Rat enterocytes were used to study the effects of uremic serum on drug transporters protein expression, while Caco-2 cells

were used to study the effects of uremic serum on their activity.

Normal rat enterocytes were harvested as described above. Instead of preparing a homogenate with these cells, they were washed by centrifugation twice in serum free culture medium (DMEM-F12, 1.2 g/L NaHCO₃, 0.1% penicillin-streptomycin, 0.01% gentamycin), counted and seeded into 75 mm uncoated polystyrene flasks (Sarstedt, St-Leonard, Quebec, Canada) at a density of 12×10^6 cells/flask in culture medium containing 10% of CTL or CRF rat serum. Viability was measured by the trypan blue exclusion method. Cells were kept in suspension for 48 h at 37°C, 5% CO₂ in a humidified incubator without changing the medium. After 48 h, the cells were pelleted, homogenized in 0.9% NaCl, 1% SDS and 75 µg were loaded for Western Blot analysis.

The effects of uremic serum on Pgp function was evaluated in Caco-2 cells using the transepithelial transport of Rho-123 across Caco-2 monolayers as reported previously^{11, 16, 19}. Caco-2 cells were cultured in collagen-coated cell culture inserts (PET membrane, pore size: 0.45 µm, Becton Dickinson, Bedford, MA) for 21-28 days in DMEM containing 1% Non-essential amino acids, 1% L-glutamine, 1% PenStrep, 10% Foetal bovine serum. Medium was changed every other day. Twenty four hours prior to the transport experiment, culture medium was replaced by culture medium containing 10% CTL or CRF rat serum. On the day of the experiment, Everted gut's buffer A containing 10% CTL or CRF rat sera was placed on the apical and basolateral side of each transwell and equilibrated for 1 hour. Then, Rho-

123 was added to the apical or basolateral side of the transwells to obtain a final concentration of 300 μ M. The transepithelial transport of Rho-123 was measured at 37°C for 120 min by collecting 100 μ L samples on the basolateral or the apical side and replacing it with fresh buffer A + serum every 15 minutes. After 90 minutes, the Pgp inhibitor cyclosporine A was added at a concentration of 0.06 mg/mL.

Blood and urine chemistries

Blood urea and creatinine, and urine creatinine were determined with a Hitachi 717 autoanalyser (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada).

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm s.e. mean. Differences between groups were assessed by using an unpaired Student's *t* test or an ANOVA test. Significant ANOVA was followed by a Scheffe post hoc comparison of groups. The threshold of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Biochemical parameters and body weight in control and CRF rats (Table II)

Table II presents the biochemical parameters and body weights of both groups of rats. Compared to control animals, CRF rats had higher levels of serum creatinine and urea and lower creatinine clearances (reduced by 78%, $p < 0.001$). There was no difference in body weight between control and CRF rats.

Intestinal protein expression of Pgp, MRP2, Oatp3 and CYP3A2 in control and CRF rats (Figure 1)

Compared to control animals, the levels of Pgp, MRP2 and CYP3A2 in CRF rats were reduced by 65% ($p < 0.001$), 60% ($p < 0.01$), and 30% ($p < 0.01$) respectively, while the protein expression of Oatp3 was not modified.

Immunohistochemistry (Figure 2)

In order to determine whether CRF was associated with a modification in the distribution of Pgp and MRP2 within the intestinal mucosa (crypt versus villi) and within the enterocyte (membranous versus cytoplasmic), immunohistochemical analysis was performed.

There was no difference in intestinal mucosa morphology between control and CRF rats (Figures 2A and 2B). Pgp was strongly detected in the surface epithelium in both groups of rats. The distribution of Pgp along the villi was identical in control and CRF rats (Figures 2C and 2D). Similar results were obtained for

MRP2 (Figures 2E and 2F).

mRNA encoding intestinal Pgp, MRP2, Oatp3 and CYP3A2 in control and CRF rats (Figure 3)

In order to determine whether a reduction in gene transcription could explain the down-regulation in the protein expression of Pgp and MRP2, mRNA encoding these proteins were measured by qPCR analysis. There was no difference in mRNA levels of Pgp, MRP2 and Oatp3 between CRF and control rats. On the opposite, mRNA encoding for CYP3A2 was significantly reduced (25%, $p < 0,05$) in CRF rats compared to control animals, as shown previously⁹.

***In situ* hybridization (Figure 4)**

No modulation of the mRNA encoding for transporters was observed on eluted cells, consisting mainly of mature enterocytes (Figure 3). This does not exclude a modification in the distribution of the mRNA more deeply in the intestinal epithelium. The expression pattern of Pgp and MRP2 mRNAs along the vertical axis of the intestinal villi was thus characterized by *in situ* hybridization. As shown in Figure 4, Pgp and MRP2 mRNA were detected in both groups of animals and the observed expression was mainly in enterocytes located at the crypt-villus junction and in the crypt. Control rats displayed no significant differences in localization compared to CRF animals (Figure 4).

Pgp and MRP2 activity in everted gut (Figure 5)

To determine the repercussion of decreased Pgp and MRP2 protein expression on intestinal drug extrusion, we evaluated the transport of rhodamine 123 and CDF, two specific substrates for Pgp and MRP2, respectively in everted gut sacs. As shown in Figure 5A, Rho-123 efflux was reduced by 30% in CRF rat intestine ($p=0.003$). For MRP2, CDF efflux was reduced by 23% in CRF rats ($p=0.002$) (Figure 5B).

Although these substrates have been shown to be quite specific for these drug transporters, there is nevertheless an efflux that is not mediated by Pgp or MRP2. As shown in Figure 5A and 5B, this residual transport of rhodamine 123 and CDF, after the addition of specific inhibitors (verapamil for Pgp and probenecid for MRP2), was identical in CRF and CTL rats demonstrating that CRF affects only the transport of these substrates mediated by Pgp and MRP2.

Correlation of Pgp and MRP2 protein expression and activity with biochemical parameters (Figure 6)

All the CRF rats present a decrease in Pgp and MRP2 protein expression and activity. However, there was a difference in the magnitude of the decrease. We evaluated whether uremic markers such as serum creatinine and urea, and creatinine clearance were correlated with intestinal drug transporters reduction. We found significant correlations between the protein expression of Pgp and MRP2 as well as their activity with creatinine clearance (Figure 6). No correlation was found with

serum urea.

Protein expression of Pgp and MRP2 in enterocytes incubated with serum from control or CRF rats (Figure 7)

In order to characterize the mechanism underlying the decrease in drug transporters, we next evaluated the effects of CRF serum on the expression of membrane transporters. Following 48 hours of incubation of normal enterocytes with serum (10%) from rats with CRF, drug transporter expression decreased, compared to enterocytes incubated with sera from control animals (Figure 7). The levels of Pgp and MRP2 were reduced by 23 and 35% respectively ($p < 0.01$), whereas the levels of Oatp3 and villin were similar in the two groups of enterocytes.

Pgp activity in Caco-2 cells incubated with serum from control or CRF rats

The effect of uremic serum on Pgp function was evaluated in Caco-2 cells using the transepithelial transport of Rho-123 across Caco-2 monolayers. We found a 43% reduction in the apparent permeability (P_{app}) of rhodamine 123 across Caco-2 cells preincubated with uremic sera (data not shown).

DISCUSSION

Several studies have shown that the bioavailability of many drugs (such as propranolol, dihydrocodeine, erythromycin and tacrolimus) is increased in patients with CRF^{1, 7, 8}. Furthermore, some recent data also suggest that sulfonylurea, such as glibenclamide, a Pgp substrate, accumulate in CRF due to an increased bioavailability^{20, 21}. This suggests that the major determinants of bioavailability, *i.e.* the first pass metabolism and/or the intestinal extrusion of drugs, are decreased in CRF. We have already shown that intestinal CYP450 is reduced in CRF rats⁹. The purpose of the present study was to demonstrate that the intestinal extrusion of drugs is also affected by CRF.

Our results demonstrate, for the first time, that the protein expression of major efflux transporters (Pgp and MRP2) is reduced in CRF while the protein expression of the import transporter Oatp3 and villin (a structural marker of enterocytes) remain unchanged. Veau *et al.* have previously demonstrated a reduction in the activity of Pgp in CRF rats¹⁰. However they did not detect any difference in protein expression of intestinal Pgp in CRF rats. This discrepancy could potentially be explained by differences in the technique used for intestinal cell isolation. Indeed, the scraping of intestinal epithelium, as performed by Veau *et al.*, favors the recovery of all types of cell constituting the intestinal mucosa. The elution technique¹³ used in the present study favors the preferential recovery of mature enterocytes from the top of the villi.

The difference in Pgp and MRP2 protein expression does not seem to be a consequence of decreased mRNA expression, as demonstrated by our qPCR results. To further rule out a decrease in gene expression, which could have been missed by the use of an epithelial cell sub-population, we studied the expression profile of the mRNA of both Pgp and MRP2 by *in situ* hybridization. Since the protein distribution is not uniform along the vertical axis of the villus, it is possible that the use of mature enterocytes precludes the demonstration of a difference in the synthesis of the transporter. Despite the semi-quantitative nature of the *in situ* hybridization technique, no evidence could be obtained demonstrating a difference in the mRNA transcription in CRF intestinal epithelium. As shown in Figure 4, the mRNA for Pgp and MRP2 are mostly expressed in crypt cells in control and CRF intestines and there was no major difference in localization between CRF and control rats.

It thus appears that the down-regulation of Pgp and MRP2 in CRF depends on post-translational mechanisms such as a faulted maturation and folding of the protein, a decrease in its migration to the membrane or an increase in its internalisation as well as its degradation. However, none of these have been shown to be involved in CRF. Thus the mechanism by which Pgp and MRP2 protein expression are decreased remains to be determined and further studies are ongoing.

The repercussions of CRF on intestinal extrusion of drugs are important, since we observed a significant reduction in Pgp and MRP2 activity. We have

demonstrated, using the everted gut technique, that Pgp and MRP2 activity were reduced by 32% and 24% in CRF rat intestine using specific substrates Rho-123 and CDF (Figure 5A and 5B). No difference in the residual transport of the substrates was measured between CRF and control rats, suggesting that CRF only impedes the efflux of drugs mediated by Pgp and MRP2. Our results confirm those published by Veau *et al.* who demonstrated a 33% decrease in Pgp activity using Rho-123 as a Pgp substrate across CRF rat intestine¹⁰. The reduction in drug export that we observed in CRF rat intestines could explain the increase in bioavailability of certain drugs described in CRF patients. We have not studied the effects of CRF on drug influx since Oatp3 protein expression remained unchanged in CRF intestines.

A number of studies indicate that intestinal function could be altered in CRF. Several enzymatic reactions carried out by the intestinal mucosa have been shown to be decreased in rats with CRF. For instance, sucrase and maltase activities are significantly reduced while the activities of other dipeptidases are unchanged²². Furthermore, Vaziri *et al.* reported that the enteric xanthine oxidase activity was diminished in CRF animals²³. The results of the present study strongly support the hypothesis that CRF is associated with perturbations in intestinal function.

We have tried to determine if a mediator present in uremic serum could be responsible for the decrease in protein expression and activity of intestinal drug transporters in CRF. First, we have demonstrated a correlation between the clearance of creatinine and the protein expression and the activity of Pgp and MRP2.

This suggests that the more severe the renal failure, the more important is the decrease in protein expression and activity of the transporters. This argues in favour of the presence of a serum mediator responsible for these decreases. Second, we have demonstrated that the incubation of cultured mature enterocytes with CRF serum decreases by 25% and 35% the protein expression of Pgp and MRP2. We have also demonstrated that uremic serum reduces by 43% the apparent permeability of Rho-123 across a Caco-2 cell monolayer, which reflects a decrease in the transport activity of Pgp. Once again, this strongly suggests that a factor present in uremic serum has a modulatory effect on Pgp and MRP2 protein expression and activity, similarly to what we showed for the CYP450⁹.

Several endogenous molecules accumulate in CRF and some of them have been recognized to have an effect on drug transporters either in the liver or in the kidney. Recently, Sun *et al.* have shown that 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid (CMPF), a uremic toxin, decreases the activity and expression of Oatp2 in the liver²⁴. Another study by Shibata *et al.* has demonstrated that Pgp mediated cyclosporine transport is reduced in Caco-2 cells in the presence of uremic toxins CMPF and indoxyl sulphate (IS)²⁵. Whether the presence of these toxins could explain the results in our model remains to be defined.

Other potential uremic mediators are cytokines. Several studies have demonstrated that CRF is associated with a chronic activation of inflammatory response²⁶. Patients with CRF present an increase in plasma levels of many

cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), monocyte chemotactic and activating factor, interleukin-6 (IL-6), granulocyte inhibitory protein and transforming growth factor²⁷⁻³¹. Cytokines are able to down-regulate intestinal and liver drug transporters *in vitro* and *in vivo*^{32, 33}. This supports the hypothesis that the mediators contained in the plasma of CRF rats which down-regulate the intestinal transporters could be some specific cytokines which are increased in CRF. Furthermore, IL-1 β has been demonstrated to decrease Pgp protein expression and activity via a post-translational mechanism³³, but to decrease CYP3A2 expression via a decrease in mRNA^{34, 35}. This could also explain why we demonstrated a decrease in CYP3A2 mRNA expression while the transporters mRNA remain unchanged.

In conclusion, CRF induces a decrease in the activity of the two main intestinal drug efflux transporters, Pgp and MRP2 secondary to a marked reduction in their protein expression, while influx transporters are not affected. The down-regulation of Pgp and MRP2 induced by CRF rat serum was similar to that produced by CRF in *in vivo* models, suggesting that uremic mediator(s) are responsible for the reduction in intestinal drug extrusion *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Vincent Pichette and Judith Naud are scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We would like to thank Dr François Boudreau that kindly welcomed the author in his lab for *in situ* hybridization studies and provided very generous technical support.

REFERENCES

1. Matzke GR, Frye RF. Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* 1997;16:205-31.
2. Touchette MA, Slaughter RL. The effect of renal failure on hepatic drug clearance. *DICP* 1991;25:1214-24.
3. Pichette V, Leblond F. Metabolism of drugs in chronic renal failure. *Recent Res Devel Drug Metabol Disposition* 2002;1:43-56.
4. Pichette V, Leblond FA. Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* 2003;4:91-103.
5. Nolin TD, Frye RF, Matzke GR. Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:906-25.
6. Hall SD, Thummel KE, Watkins PB, Lown KS, Benet LZ, Paine MF, Mayo RR, Turgeon DK, Bailey DG, Fontana RJ, Wrighton SA. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos* 1999;27:161-6.
7. Talbert RL. Drug dosing in renal insufficiency. *J Clin Pharmacol* 1994;34:99-110.
8. Okabe H, Hashimoto Y, Inui KI. Pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:1467-72.

9. Leblond FA, Petrucci M, Dube P, Bernier G, Bonnardeaux A, Pichette V. Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1579-85.
10. Veau C, Leroy C, Banide H, Auchere D, Tardivel S, Farinotti R, Lacour B. Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1607-14.
11. Huang ZH, Murakami T, Okochi A, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 2000;406:453-60.
12. 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;12:326-32.
13. Weiser MM. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. *J Biol chem* 1973;248:2536-2541.
14. Fasco MJ, Silkworth JB, Dundar DA, L.S. K. Rat small intestinal cytochromes P450 probed by warfarin metabolism. *Mol Pharmacol* 1993;43:226-332.
15. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3389-402.
16. Barthe L, Woodley J, Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clin Pharmacol* 1999;13:154-68.

17. Zamek-Gliszczyński MJ, Xiong H, Patel NJ, Turncliff RZ, Pollack GM, Brouwer KL. Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein and its diacetate moiety in the liver. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:801-9.
18. Itagaki S, Chiba M, Shimamoto S, Sugawara M, Kobayashi M, Miyazaki K, Hirano T, Iseki K. Characterization of secretory intestinal transport of phenolsulfonphthalein. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:72-8.
19. Yumoto R, Murakami T, Nakamoto Y, Hasegawa R, Nagai J, Takano M. Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:149-55.
20. Gabardi S, Abramson S. Drug dosing in chronic kidney disease. *Med Clin North Am* 2005;89:649-87.
21. Golstein PE, Boom A, van Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R. P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch* 1999;437:652-60.
22. Grimm K, Bongartz S, Kasper H. Activities of intestinal enzymes in experimental chronic renal insufficiency. *Nephron* 1977;19:81-7.
23. Vaziri ND, Freel RW, Hatch M. Effect of chronic experimental renal insufficiency on urate metabolism. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:1313-7.
24. Sun H, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ. Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1239-46. Epub 2004 Jul 30.

25. Shibata N, Morimoto J, Hoshino N, Minouchi T, Yamaji A. Factors that affect absorption behavior of cyclosporin a in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* 2000;22:181-94.
26. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease--a fire that burns within. *Contrib Nephrol* 2005;149:185-99.
27. Yao Q, Axelsson J, Stenvinkel P, Lindholm B. Chronic systemic inflammation in dialysis patients: an update on causes and consequences. *ASAIO J* 2004;50:lii-lvii.
28. Akahoshi T, Kobayashi N, Hosaka S, Sekiyama N, Wada C, Kondo H. In-vivo induction of monocyte chemotactic and activating factor in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:2244-9.
29. Higuchi T, Yamamoto C, Kuno T, Mizuno M, Takahashi S, Kanmatsuse K. Increased production of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist by peripheral blood mononuclear cells in undialyzed chronic renal failure. *Nephron* 1997;76:26-31.
30. Oettinger CW, Bland LA, Oliver JC, Arduino MJ, McAllister SK, Favero MS. The effect of uremia on tumor necrosis factor-alpha release after an in vitro whole-blood endotoxin challenge. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1890-5.
31. Ziesche R, Roth M, Papakonstantinou E, Nauck M, Horl WH, Kashgarian M, Block LH. A granulocyte inhibitory protein overexpressed in chronic renal disease regulates expression of interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:301-5.

32. McRae MP, Brouwer KL, Kashuba AD. Cytokine regulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2003;35:19-33.
33. Sukhai M, Yong A, Pak A, Piquette-Miller M. Decreased expression of P-glycoprotein in interleukin-1beta and interleukin-6 treated rat hepatocytes. *Inflamm Res* 2001;50:362-70.
34. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, Guillouzo A. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993;44:707-15.
35. Abdel-Razzak Z, Corcos L, Fautrel A, Guillouzo A. Interleukin-1 beta antagonizes phenobarbital induction of several major cytochromes P450 in adult rat hepatocytes in primary culture. *FEBS Lett* 1995;366:159-64.

LEGENDS

Figure 1 Protein expression of intestinal transporters and cytochrome P450 3A2 in intestinal cell homogenate from control (white bars) and CRF rats (black bars). Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for transporters and CYP3A2 were standardized by dividing them by the value obtained for villin. The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100%. Data are the mean \pm SEM of 8 experiments in each group.

* $p < 0.01$ as compared to control.

Figure 2 Immunolocalization of membrane intestinal transporters in control (C, and E) and CRF (D, and F) rats intestine. Jejunum biopsies were fixed in 4% phosphate buffered paraformaldehyde. Tissues were either stained with hematoxylin-phloxin for histological examination (A and B) or incubated with specific antibodies for Pgp (C and D) or MRP2 (E and F). Immune complex were revealed by DAB, leaving a brown coloration on the extremities of the villi (see blue arrows). As shown, CRF does not modify the epithelium structure nor the distribution of transporters (brown coloration) which are expressed all along the villi and are absent from crypts. Magnification 200X

Figure 3 mRNA encoding intestinal drug transporters and CYP3A2 in intestinal cells from control (white bars) and CRF rats (black bars) were measured by quantitative real time PCR. mRNA are expressed in number of copies of the gene. The number of copies of control rats was arbitrarily defined as 100%. Data are the mean \pm SEM of 8 experiments in each group. $p < 0.05$ as compared to control rats.

Figure 4 *In situ* localization of mRNA coding for transporters in control (A and C) and CRF (B and D) rats. Jejunum biopsies were fixed in 4% phosphate buffered paraformaldehyde. RNA probes were produced and labeled with digoxigenin with the DIG-labeled RNA polymerase kit form Roche Diagnostic. Hybridization was revealed with NBT and BCIP which produced a dark deposit in the crypts (see blue arrows). As shown, CRF does not change the site of synthesis of Pgp (A and B) nor MRP2 (C and D). Positive signal was detected only in crypt cells and was totally absent from villi mature cells. Magnification 200X.

Figure 5 *In vitro* transport of rhodamine 123 and CDF in everted gut sacs. a) Transport of rhodamine 123 in control (white bars) and CRF (black bars) everted gut sacs in the absence and presence of specific inhibitor verapamil. Control Rho-123 transport was 1092.8 ± 165.4 pmol/min and was defined as 100%. b) CDF transport in control (white bars) and CRF (black bars) in the absence or presence of MRP2 inhibitor probenecid. Control CDF transport was 122.9 ± 7.9 pmol/min and was defined as 100%. Data are the mean \pm SEM

Figure 6 a) Correlation between Pgp protein expression and creatinine clearance of control and CRF rats ($R^2=0.210$). b) Correlation between MRP2 protein expression and creatinine clearance of control and CRF rats ($R^2=0.246$). c) Correlation between Pgp transport activities and creatinine clearance of control and CRF rats ($R^2=0.277$). d) Correlation between MRP2 transport activities and creatinine clearance of control and CRF rats ($R^2=0.424$). $p<0.05$ for each correlation.

Figure 7 Level of Pgp, MRP2 and Oatp3 protein expression in enterocytes incubated with 10% serum from control (white bars) and CRF rats (black bars) for 48h. Protein bands are expressed in standardized densitometry units (See figure 1) (%). Data are the mean \pm SEM of 3 experiments.

* $p<0.05$ as compared to enterocytes incubated with serum from control rats.

TABLES

Table I. Nucleotide sequences of PCR primers.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Predicted Product size
<i>mdr1a</i>	Sens: ATCAACTCGCAAAGCATCC	116 bp
	Anti-sens : CAACTGCCACAATGTTGGTC	
<i>mrp2</i>	Sens: GCTGGTTGGAAACTTGGTCG	173 bp
	Anti-sens: CAACTGCCACAATGTTGGTC	
<i>oatp3</i>	Sens: TCTGCAGTCCTGGGGTTATG	202 bp
	Anti-sens: TGCCAGCGAATACTCTTGTG	
CYP3A2	Sens: GATTCTAAGCATAAGCACCGAGT	91 bp
	Anti-sens: ACAGGGCTTTATGAGACACTTCGTCTT	

Primers were designed based on published cDNA sequences with the help of the Jellyfish and BLASTIN 2.2.1 computer programs ¹⁵. The resulting PCR products were sequenced on an ABI Prism 3100 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Table II. Characteristics of control and CRF rats

	Control (n=25)	CRF (n=25)	p-value
Body Weight (grams)	387.9 ± 3.4	331.6 ± 11.6	0.0603
Serum creatinine (μmol/L)	55.2 ± 0.8	171.8 ± 15.3	4.6025 x 10 ⁻¹⁰
Creatinine clearance (μL/100 g of body weight/min)	353.4 ± 14.8	113.6 ± 13.7	5.4808 x 10 ⁻¹⁵
Serum urea (mmol/L)	5.0 ± 0.2	35.8 ± 5.7	1.2176 x 10 ⁻⁰⁶

Data are the mean ± SEM. Measurements were made at the time of sacrifice.

Urinary collection was begun the day before.

FIGURES

Figure 1

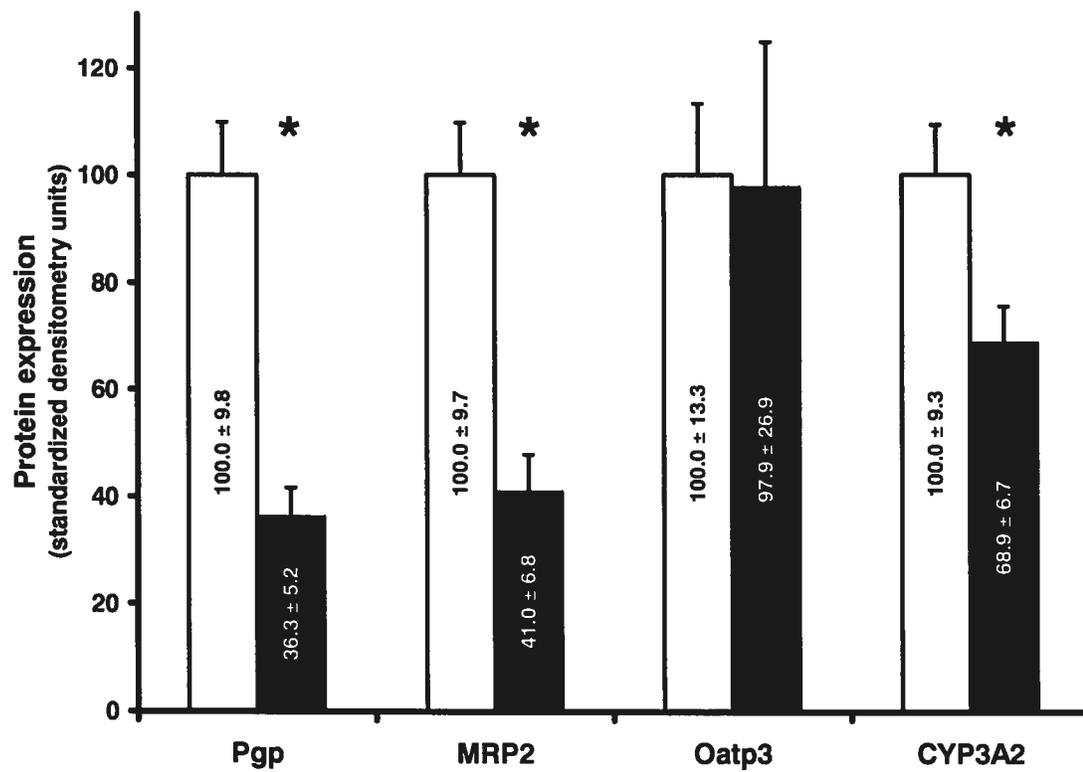


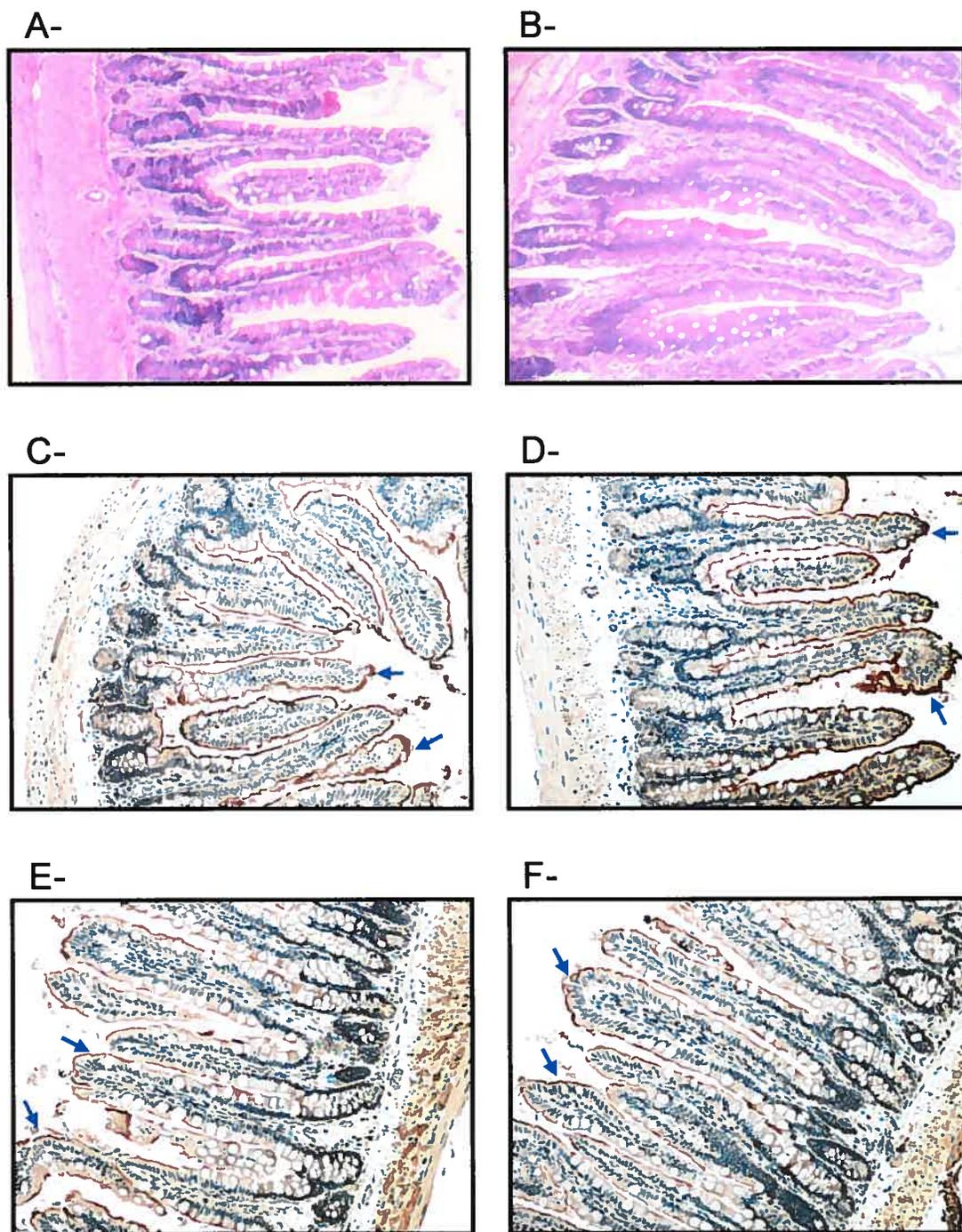
Figure 2

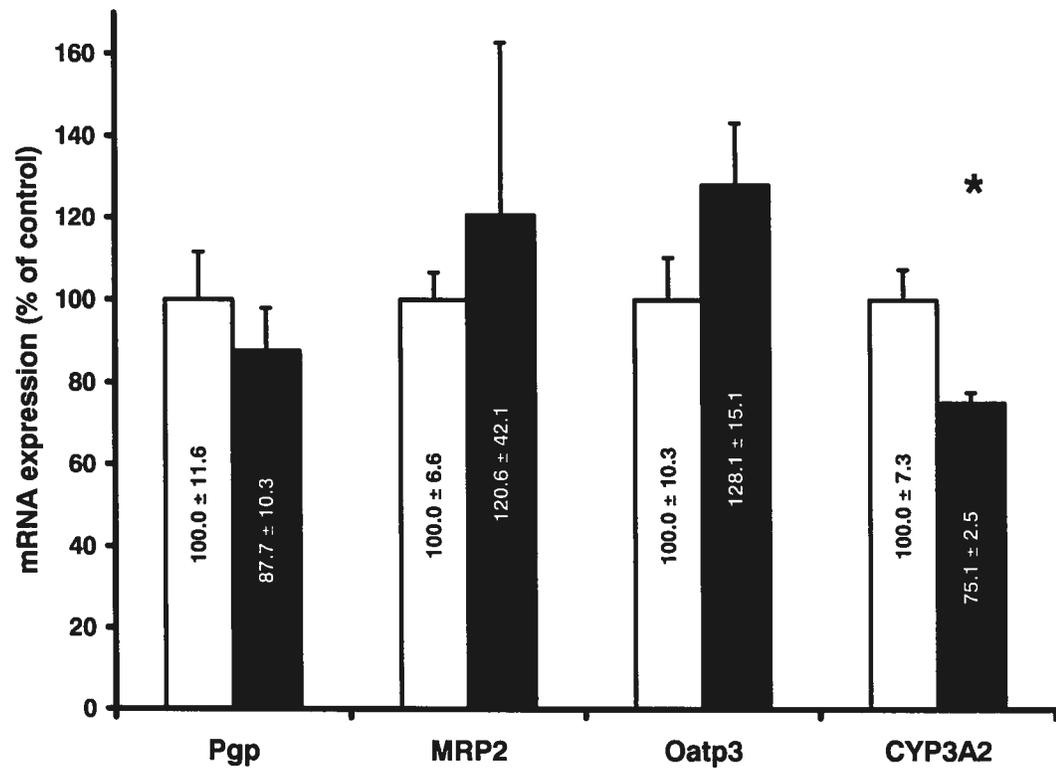
Figure 3

Figure 4

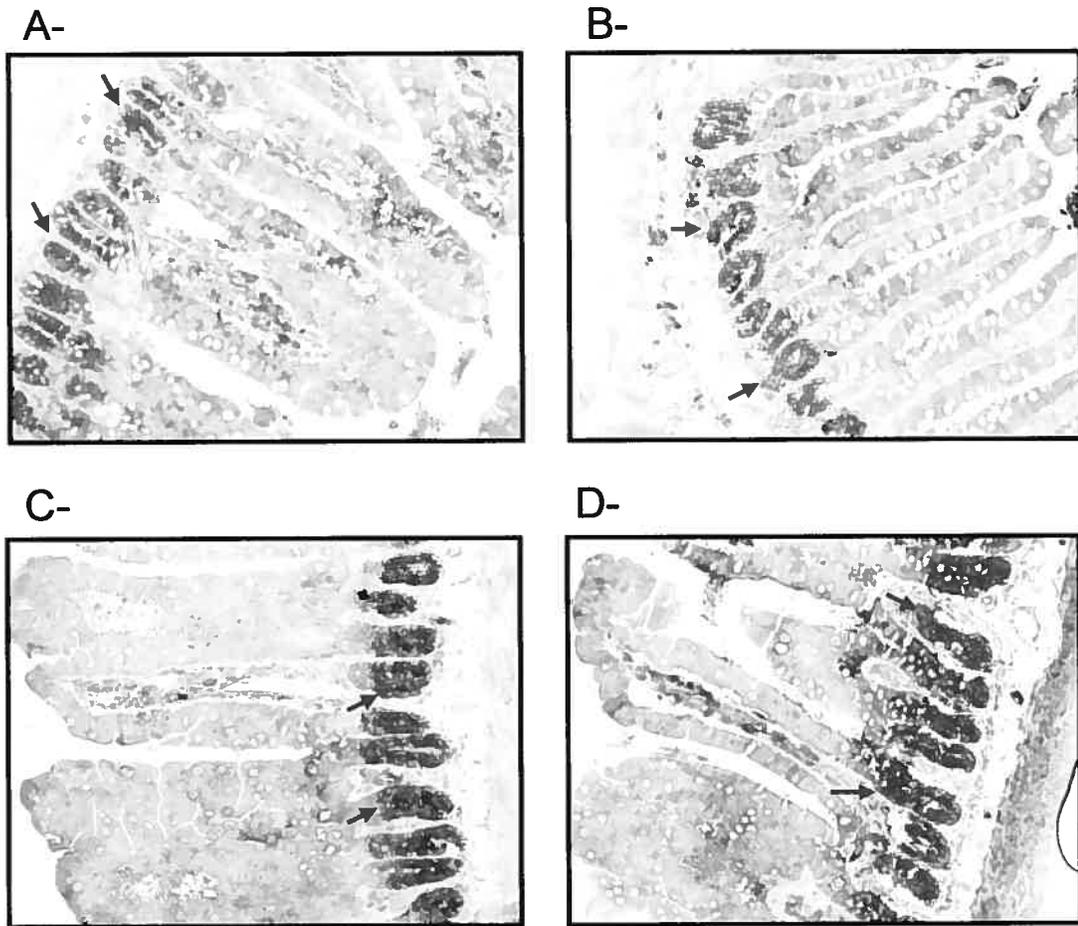
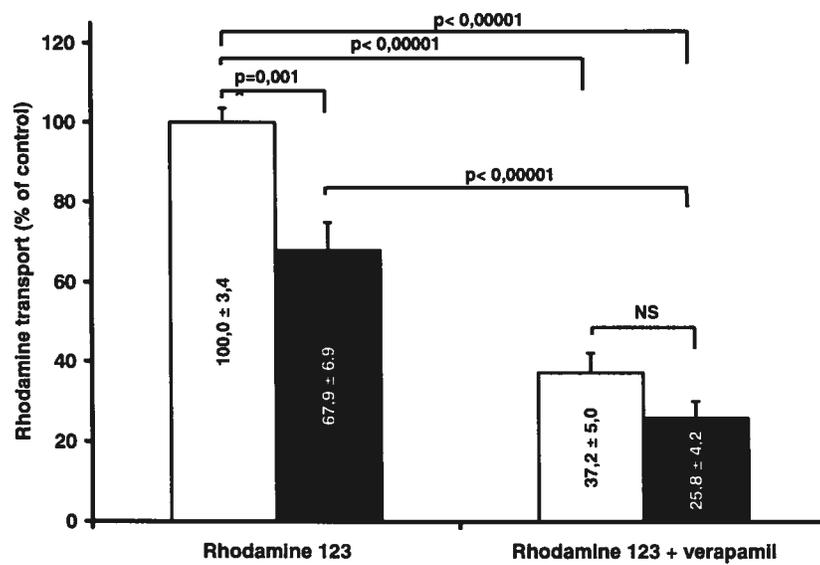


Figure 5

A



B

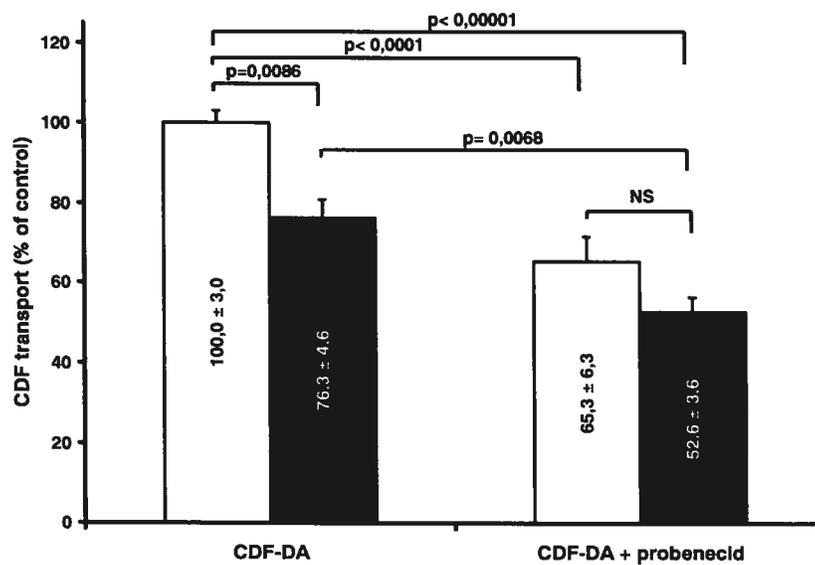


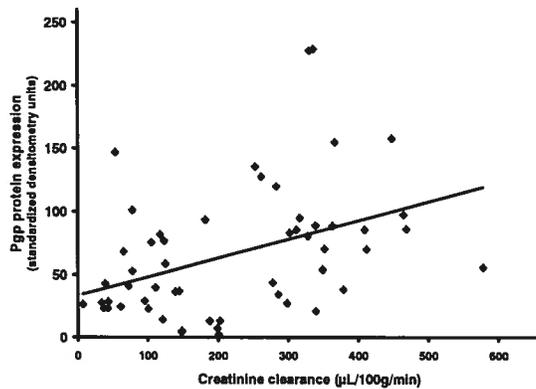
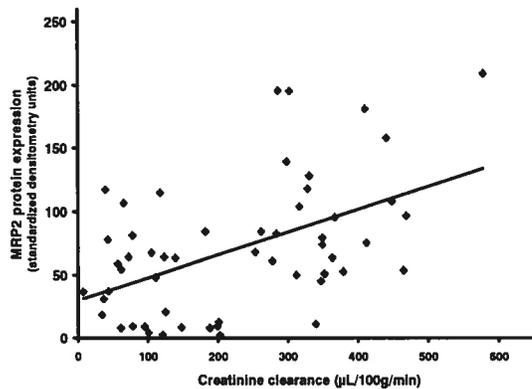
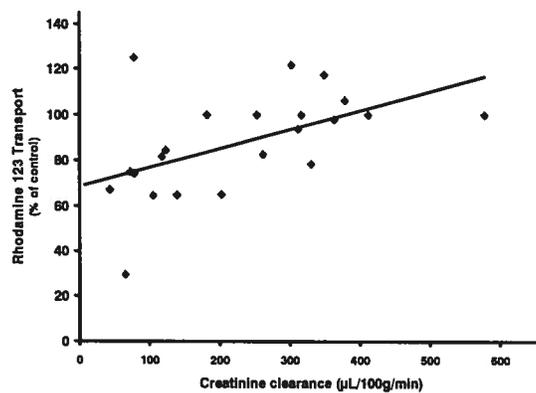
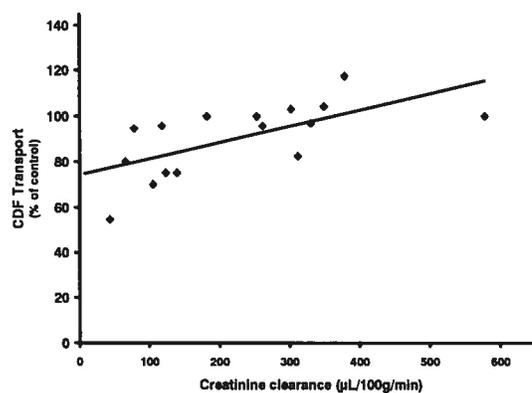
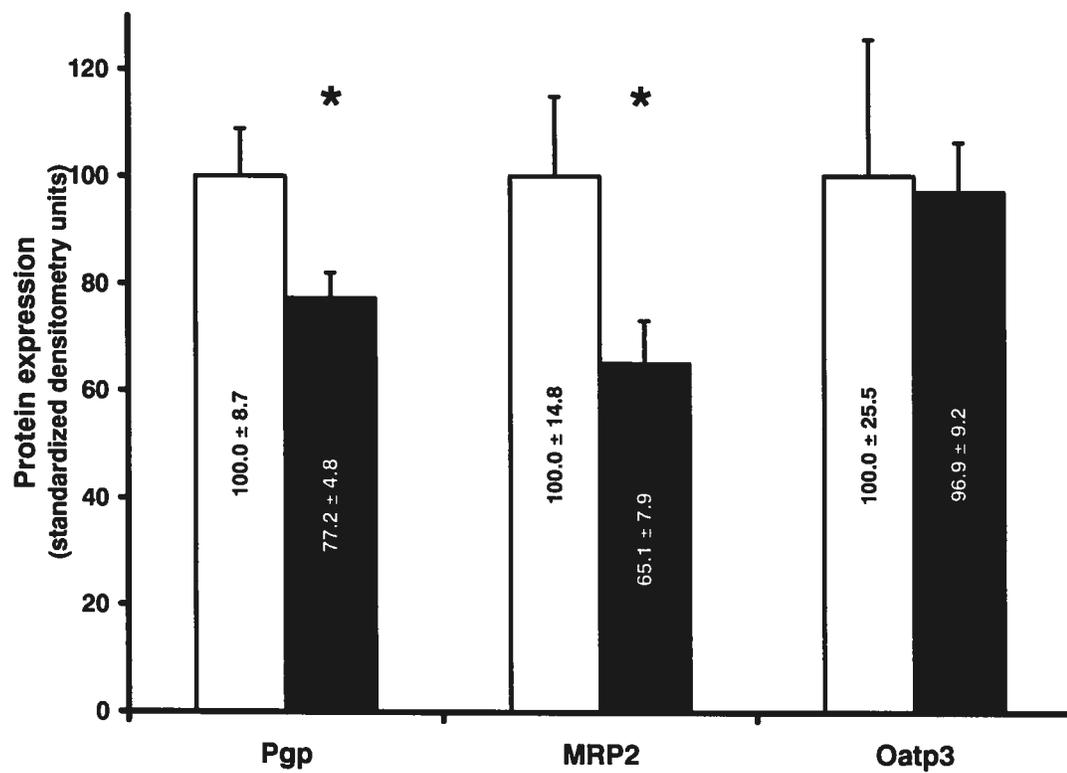
Figure 6**A****B****C****D**

Figure 7



DISCUSSION

Le but de ce travail de maîtrise était de déterminer les effets de l'IRC sur le transport des médicaments dans l'intestin. Notre hypothèse de travail était que l'IRC réduit l'expression et l'activité des transporteurs Pgp et MRP2, alors que l'expression et l'activité de Oatp3 augmentent, expliquant ainsi l'augmentation de la biodisponibilité de plusieurs médicaments lors de cette pathologie. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de rat avec une insuffisance rénale induite par néphrectomie 5/6. Les animaux témoins ont subi une anesthésie et ont reçu la même quantité de nourriture que celle consommée la veille par les animaux IRC. Ceci permet de pallier à l'inappétence des animaux IRC qui cause une prise de poids inférieure chez les rats souffrant d'IRC par rapport aux rats témoins. Le contrôle de l'ingestion de nourriture par les animaux témoins permet de garder les deux groupes de rats à croissance égale, comme le démontrent les données physiologiques des rats dans le tableau 2 qui indiquent qu'il n'y a pas de différence de poids entre les animaux témoins et IRC. Cependant, il y a une nette différence entre la clairance de la créatinine et l'urée sanguine dans les deux modèles, ce qui démontre bien l'IRC des animaux.

Le premier objectif était d'évaluer l'expression protéique de la Pgp, de MRP2 et de Oatp3 dans les cellules épithéliales intestinales par immunobuvardage de type Western. Nos résultats montrent une importante diminution de l'expression protéique totale de la Pgp et de MRP2 chez les rats IRC (Figure 1). L'expression

protéique de Oatp3, par contre ne semble pas affectée, ce qui réfute l'hypothèse qu'il soit induit, augmentant ainsi la biodisponibilité de ses substrats.

Par immunohistochimie, nous avons étudié le profil d'expression protéique de la Pgp et de MRP2 dans des coupes d'intestin. Tout d'abord, il est à noter que l'histologie intestinale est la même chez les animaux témoins et les animaux en IRC (Figure 2A-B), ce qui permet de déterminer que la diminution de l'expression protéique des deux transporteurs n'est pas due à une érosion de la muqueuse intestinale, donc à une diminution du nombre de cellules exprimant la Pgp et MRP2. Ceci est, de plus, vérifié par le fait que l'expression protéique de chacun des deux transporteurs est exprimée par rapport à l'expression de la villine que l'on retrouve seulement dans les entérocytes matures à l'extrémité des villi, ceux-là même qui expriment les transporteurs, et dont l'expression reste inchangée en IRC (Figure 1). Deuxièmement, le profil d'expression des transporteurs le long des villi est identique chez les animaux témoins et les animaux en IRC démontrant que même si l'expression protéique de la Pgp et de MRP2 est diminuée en IRC, leur distribution tout au long des villi reste inchangée (Figures 2C-F).

La diminution de l'expression protéique de la Pgp et de MRP2 n'est toutefois pas associée à une diminution de la production d'ARNm dans la troisième fraction d'élution (Figure 3). Les cellules isolées par la technique d'élution de l'intestin sont des entérocytes matures à l'extrémité des villi. Comme l'ARN est extrait de la troisième fraction d'élution, ce sont des entérocytes matures qui sont

utilisés pour effectuer les tests de PCR en temps réel. Il a toutefois été démontré, pour plusieurs protéines présentes dans les entérocytes matures, que leur ARNm est produit dans les cryptes et que les protéines produites migrent avec les cellules vers les extrémités des villi. En effet, les entérocytes sont tous issus des quelques cellules mères que l'on retrouve dans les cryptes intestinales. Les cellules filles migrent le long des villi pour aller terminer leur vie en entérocytes matures à leur extrémité^{65,66}. Nous avons donc voulu déterminer où est produit l'ARNm de la Pgp et de MRP2 et ainsi déterminer si ce sont des protéines qui sont produites pendant la migration des entérocytes ou si elles sont produites *de novo* dans les entérocytes matures. Une synthèse de la Pgp et de MRP2 majoritairement au niveau des cryptes pourrait expliquer l'absence de différence apparente de l'expression d'ARNm pour les deux transporteurs dans la fraction 3 d'élution, puisque les cellules des cryptes ne sont pas récoltées par élution.

L'analyse par hybridation *in situ* démontre que l'ARNm de la Pgp et de MRP2 est majoritairement produit dans les cryptes (Figure 4A-B). Ce résultat, combiné avec l'immunohistochimie qui démontre que l'expression protéique des transporteurs commence dans les cellules de la base des villi (Figure 2C-F), permet de croire qu'il y a production et maturation de la Pgp et de MRP2 le long des villi à partir d'un ARNm produit dans les cryptes. Ceci laisse toutefois en suspens la question de l'expression d'ARNm pour les deux transporteurs.

Il est impossible, dans notre modèle, de déterminer s'il y a diminution ou non de l'expression d'ARNm pour la Pgp et MRP2 dans les cryptes. Pour le vérifier, il nous a, en effet, été impossible d'extraire de l'ARN d'intestin complet, puisque l'ARN obtenu à chaque extraction était dégradé par des ARNases. Nous croyons que ceci est dû à la difficulté de bien laver l'intestin avant l'extraction, ce qui laisse des bactéries intestinales et que c'est les ARNases de ces bactéries intestinales qui causent la dégradation de l'ARN d'intestin total. Plusieurs lavages des cellules de la fraction 3 d'élution auraient, en revanche, permis d'éliminer les bactéries intestinales et ainsi d'éviter la contamination par des ARNases bactériennes. Deux options restent donc possibles : il y a une diminution de l'ARNm que nous ne pouvons détecter dans les cryptes chez les animaux IRC et cette diminution explique la diminution protéique des transporteurs, ou il n'y a pas de diminution de l'expression de l'ARNm et la diminution de l'expression protéique des transporteurs est due à une modulation post-traductionnelle.

Ces modifications post-traductionnelles pourraient être de plusieurs ordres. Tout d'abord, la maturation ou le repliement de la protéine pourrait être affecté. Ensuite, la migration vers la membrane apicale, l'internalisation et la dégradation de la Pgp et de MRP2 pourraient être modifiées en IRC.

À ce jour, aucune étude n'a démontré qu'une pathologie affecte le repliement ou la maturation de la Pgp et de MRP2 à l'exception du syndrome de Dubin-Johnson qui est dû à un mauvais repliement de MRP2 ⁶⁷. Ce problème de

maturation est toutefois dû à une mutation dans le gène de MRP2⁶⁷, ce qui n'est évidemment pas le cas chez les rats IRC.

Une étude publiée en 2002 par Kikuchi *et al.*, a démontré que la radixine est essentielle à la migration de MRP2 à la membrane apicale des cellules polarisées⁶⁸. La radixine fait partie de la famille des ezrine-radixine-moesine à qui l'on a attribué des rôles dans la motilité cellulaire, l'adhésion cellulaire et la prolifération en générale⁶⁹⁻⁷¹. Ces auteurs ont démontré que, dans le foie de souris knock-out pour la radixine, il y a une forte diminution de MRP2 à la membrane apicale des villi des cellules canaliculaires, sans toutefois qu'il y ait de diminution de MRP2 total dans les hépatocytes.

Dans le même ordre d'idée, Ortiz *et al.* ont démontré en 2004 que la protéine HAX-1 est un des facteurs responsables de l'internalisation de la Pgp⁷². En effet, la déplétion de HAX-1 à l'aide de ARNi, des petits brins d'ARN complémentaires qui empêchent la traduction de l'ARNm en protéines, entraîne une augmentation de la Pgp à la membrane apicale des cellules polarisées. Ortiz *et al.* ont aussi démontré une interaction entre HAX-1 et les molécules de clathrine, ce qui démontre bien son rôle dans l'internalisation de la Pgp. Ils ont par ailleurs démontré que l'internalisation par HAX-1 n'entraîne pas la dégradation de la Pgp puisque son expression protéique totale n'est pas modifiée⁷². À ce jour, ce sont les deux seules protéines connues qui jouent un rôle dans la régulation post-traductionnelle de la Pgp et de MRP2. Comme toutes deux n'influencent pas la

dégradation de la Pgp ou de MRP2, ce n'est pas par le biais de HAX-1 ou de la radixine que leur expression protéique est diminuée en IRC. Il faut donc continuer à chercher quels sont les mécanismes post-traductionnels qui régulent l'expression protéique de la Pgp et de MRP2 dans les villi et ensuite évaluer leur rôle en IRC.

Le second objectif de ma maîtrise était de déterminer l'effet de l'IRC sur l'activité de la Pgp et de MRP2 par la technique de l'intestin inversé. Nous avons démontré une diminution de 32% du transport de la rhodamine 123, un substrat très spécifique à la Pgp^{73, 74}, (Figure 5A) dans l'intestin de rats IRC. Il n'y a pas de différence significative dans le transport résiduel de la Rho-123 suite à l'ajout de vérapamil, un inhibiteur de la Pgp (Figure 5A). Des résultats semblables ont été obtenus pour le transporteur MRP2. En effet, le transport de CDF, un substrat très spécifique à MRP2⁷⁵⁻⁷⁹, est diminué de près de 25% chez les animaux IRC par rapport aux animaux témoins (Figure 5B). Comme pour le transport de la Rho-123, le transport de CDF est identique dans les intestins de rats IRC et témoins suite à l'ajout de probénécide, un inhibiteur de MRP2. Ceci démontre que la différence observée dans le transport de la Rho-123 et de CDF entre les intestins de rats IRC et témoins est due à une diminution de leur transport spécifique par la Pgp et par MRP2.

L'effet de l'IRC sur l'activité de la Pgp avait toutefois déjà été étudié par Veau *et al.*⁶². Ils avaient détecté une diminution de 33% de l'activité de la Pgp dans l'intestin de rats IRC. Nos résultats confirment ces résultats puisque nous obtenons

une diminution similaire de l'activité de la Pgp intestinale à l'aide de notre modèle (figure 5A). Ce qui est intéressant est que Veau *et al.* n'avaient pas observé de diminution de l'expression protéique de la Pgp, alors que nous observons une diminution de plus de 60%. Ceci est probablement dû à leur technique d'isolation de cellules intestinales. En effet, ils utilisent la technique du grattage de la muqueuse intestinale. Bien que cette méthode soit très efficace pour récupérer le plus de cellules possible, elle ne permet pas de discriminer entre les entérocytes matures à l'extrémité des villi et les entérocytes plus jeunes qui n'effectuent pas le transport des médicaments. Par la technique d'éluion, nous ne prélevons que les entérocytes matures, ce qui permet de mesurer l'expression protéique de la Pgp seulement dans les cellules qui transportent les médicaments, donc les cellules d'intérêt.

Nous avons ensuite établi une importante corrélation entre la clairance de créatinine, un marqueur du niveau de l'IRC, l'expression protéique de même que l'activité de la Pgp et de MRP2. Ceci démontre que plus l'insuffisance rénale est sévère, plus il y a diminution de l'expression protéique et de l'activité des deux transporteurs, ce qui permet de penser qu'un facteur circulant s'accumulant en IRC serait responsable de ces diminutions. Il a déjà été démontré que des facteurs circulants en IRC réduisent l'expression de certaines protéines. Comme mentionné dans l'introduction, Guévin *et al.* ont montré une diminution de l'expression protéique de différents CYP450 dans des hépatocytes en culture en présence de sérum de rat urémique ¹⁷. Il est donc possible qu'un facteur sérique soit également

responsable de la diminution de l'expression protéique et de l'activité de la Pgp et de MRP2 dans l'intestin de rats IRC.

Ceci semble être confirmé par nos expériences sur des entérocytes incubés avec du sérum de rat urémique où une diminution de plus de 20% de l'expression protéique des deux transporteurs est observée. De plus, l'incubation avec du sérum de rat urémique réduit de 43% le transport de la rhodamine 123 sur une monocouche de cellules Caco-2. Il reste toutefois à démontrer quel(s) pourrai(en)t être le(s) facteur(s) responsable(s) de ces diminutions.

Plusieurs molécules endogènes induites par l'IRC sont reconnues pour leur capacité à diminuer l'expression et l'activité des différents transporteurs. Tout d'abord, en IRC, il y a accumulation de plusieurs toxines urémiques qui sont normalement éliminées par le rein. À ce jour, le *European Uremic Toxin Work Group* en a dénombré pas moins de 90⁸⁰. Ces toxines sont de poids moléculaires variés, 68 d'entre-elles pesant moins de 500 Da, 12 excédant 12 000 Da et 10 ayant un poids moléculaire entre 500 et 12 000 Da⁸⁰. Certaines de ces toxines ont des effets connus sur l'activité de différents transporteurs au niveau rénal et hépatique. Par exemple, le *3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid* (CMPF), l'*indoxyl sulfate* (IS) et l'acide hippurique (AH) sont reconnus non seulement pour inhiber la liaison des médicaments à l'albumine^{81, 82}, mais aussi pour leur capacité à inhiber la sécrétion tubulaire de certains acides organiques en diminuant l'activité des transporteurs rénaux d'anions organiques⁸³.

Sun *et al.* (2004) ont étudié ces toxines afin de préciser leurs effets sur le transport de l'érythromycine dans des hépatocytes en culture⁸⁴. La clairance hépatique de l'érythromycine est diminuée chez les patients en IRC³³. Son élimination se fait surtout par transport actif de la molécule intacte vers la voie biliaire, et un peu par détoxification par le CYP450⁸⁵. L'érythromycine est transportée par le *organic-anion-transport-polypeptide de type 2* (Oatp2, même famille que Oatp3) situé à la membrane basolatérale des hépatocytes dans le foie de rat et elle est rejetée dans la bile par la Pgp située sur la membrane apicale des hépatocytes⁸⁴. Sun *et al.* ont démontré que le (CMPF) inhibe directement inhiber le transport de l'érythromycine par une diminution de l'expression protéique et de l'activité de Oatp2. Il est donc démontré que des toxines urémiques peuvent moduler l'expression et l'activité des transporteurs aux niveaux rénal et hépatique. Finalement, Shibata *et al.* (2000) ont démontré que les toxines CMPF et IS réduisent de façon significative le transport de la cyclosporine A, un substrat de la Pgp, à travers une monocouche de cellules Caco-2⁸⁶. Ils n'ont toutefois pas étudié l'effet de ces toxines sur l'expression protéique de la Pgp. Il serait donc pertinent d'étudier les différentes toxines urémiques et leurs effets sur l'expression et l'activité des différents transporteurs de médicaments au niveau intestinal.

La seconde famille de molécules endogènes qui pourraient affecter l'expression et l'activité des transporteurs intestinaux sont les cytokines pro-inflammatoires. Il est bien connu qu'il y a surexpression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires en IRC⁸⁷⁻⁹⁰. En effet, l'expression de l'interleukine-1 β (IL-1 β)⁸⁸,

du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)⁹¹ et des interleukines-6 et -8 (IL-6 et IL-8)⁸⁹ est augmentée en IRC. Ces différentes cytokines sont reconnues pour avoir un effet sur l'expression et l'activité de la Pgp^{92, 93}. Par exemple, Sukhai *et al.* (2001) ont incubé des hépatocytes de rat avec différentes concentrations d'IL-1 β et d'IL-6. Ils ont ainsi observé une diminution de l'expression protéique de la Pgp de façon dose et temps-dépendante⁹⁴. De plus, l'activité de la Pgp, mesurée par l'efflux de rhodamine 123, est diminuée lors de l'incubation des hépatocytes avec IL-1 β ou IL-6. Les deux cytokines n'agissent toutefois vraisemblablement pas selon le même mécanisme, puisque seul l'IL-6 entraîne une diminution de l'ARNm de la Pgp⁹⁴. En effet, Sukhai *et al.* ont démontré que la diminution de l'expression protéique et de l'activité de la Pgp causées par l'IL-1 β ne sont pas accompagnées d'une diminution de l'ARNm⁹⁴. Il semble donc qu'un mécanisme post-traductionnel soit responsable de la diminution de l'expression protéique de la Pgp en présence d'IL-1 β alors que c'est la transcription du gène qui est diminuée en présence d'IL-6.

L'effet du TNF- α sur l'expression protéique et l'activité de la Pgp n'est pas aussi bien établi que celui de l'IL-1 β et de l'IL-6. En effet, Hirsch-Ernst *et al.* (1998) ont démontré que l'incubation d'hépatocytes de rat avec différentes concentrations de TNF- α entraîne, de façon dose- et temps-dépendante, une augmentation de l'expression protéique, de l'ARNm et de l'activité de la Pgp⁹⁵. Des études dans des cellules humaines ont toutefois donné des résultats inverses. En effet, il a été démontré dans plusieurs lignées cellulaires humaines que le TNF- α

entraîne une diminution de l'expression protéique, de l'ARNm et de l'activité de la Pgp⁹⁶⁻⁹⁸. Finalement, une étude dans la lignée de cellules Caco-2 (cellules de carcinome de colon humain) a démontré que le TNF- α entraîne une diminution de l'ARNm de la Pgp et du transport de la rhodamine 123⁹⁹. Les effets du TNF- α sur l'expression et l'activité de la Pgp restent donc incertains. Plusieurs cytokines surexprimées en IRC ont donc la capacité d'influencer l'expression et l'activité de la Pgp.

De façon similaire à la Pgp, les différentes cytokines peuvent influencer sur l'expression et l'activité de MRP2. Par exemple, il a été démontré par Siewert *et al.* (2004) que l'IL-6 réduit l'expression protéique, l'ARNm et l'activité de MRP2 dans le foie de souris¹⁰⁰. Pour ce faire, ils ont induit l'inflammation par la térébenthine chez des souris normales ou déficientes en IL-6. Chez les souris normales, ils ont obtenu une nette diminution de l'expression et de l'activité de MRP2 qu'ils ne retrouvaient pas chez les souris déficientes en IL-6¹⁰⁰. De plus, il a été démontré que l'IL-1 β et le TNF- α pouvaient avoir les mêmes effets sur l'expression et l'activité de MRP2 dans le foie de rat. Ceci a été démontré par Geier *et al.* (2003) qui ont inactivé l'une ou l'autre des cytokines pour ensuite induire l'inflammation à l'aide de lipopolysaccharides¹⁰¹. Kubitz *et al.* (1999) ont aussi démontré que l'inflammation induite par le LPS favorise l'internalisation de MRP2 et produit, 12h plus tard, une diminution importante de son ARNm¹⁰². Finalement, une étude de Dietrich *et al.* (2004) a démontré, dans le duodénum de rat, que, suite à

l'obstruction du canal biliaire, la cytokine IL-1 β est responsable de la diminution de l'expression protéique et de l'ARNm de MRP2¹⁰³.

Il est cependant à noter que la majorité de ces études ont été réalisées dans des cellules hépatiques. Par conséquent, on ne peut qu'extrapoler l'effet des différentes cytokines aux transporteurs intestinaux puisque ceux-ci ont beaucoup moins été étudiés en situation inflammatoire que les transporteurs hépatiques.

Comme mentionné plus tôt, il est difficile de confirmer ou d'exclure qu'une diminution de l'ARNm soit responsable de la diminution de l'expression protéique de la Pgp et de MRP2 intestinaux en IRC en raison de difficultés techniques liées à la nature du tissu intestinal. Advenant le cas où il n'y aurait aucune diminution de l'ARNm des deux transporteurs qui accompagnent la diminution de leur expression protéique, il serait important d'étudier l'effet de l'IRC sur l'internalisation et la dégradation des transporteurs de médicaments. Une étude de ce type a été publiée récemment. En effet, Nemeth *et al.* (2004) ont démontré que l'inflammation entraîne l'internalisation et la dégradation d'un transporteur de fer retrouvé entre autres dans les entérocytes. La ferroportine est un transporteur relâchant le fer dans le plasma lorsque les niveaux de fer sanguin sont insuffisants. Lorsque la concentration sanguine de fer est optimale, il y a production d'hepcidine par les hépatocytes et celle-ci induit l'internalisation et la dégradation de la ferroportine dans les lysosomes hépatiques et intestinaux, ce qui entraîne une diminution du relâchement de fer ainsi qu'une baisse de son absorption intestinale¹⁰⁴. L'anémie

retrouvée lors de l'inflammation est due à une hausse de la sécrétion d'hepcidine par les hépatocytes en réponse aux cytokines pro-inflammatoires, plus particulièrement l'IL-6¹⁰⁴. Cette régulation post-traductionnelle de l'expression protéique et de l'activité de la ferroportine par les cytokines pro-inflammatoires pourrait être applicable aux transporteurs de médicaments. En effet, la ferroportine est un transporteur fortement glycosylé, à plusieurs passages transmembranaires (10) et de structure similaire à la Pgp et à MRP2. La Pgp et MRP2 pourraient donc, en réponse à un stimulus de l'IRC donné, être internalisés et dirigés vers les lysosomes, causant ainsi leur dégradation. Ceci entraînerait une diminution de l'expression protéique des transporteurs, sans toutefois affecter leur ARNm.

La dernière molécule endogène induite par l'IRC qui pourrait affecter l'expression protéique et l'activité des transporteurs est l'hormone parathyroïdienne (PTH). Tout d'abord, il est bien connu que la majorité des patients souffrant d'IRC au stade terminal souffrent également d'hyperparathyroïdie secondaire (SHPT)¹⁰⁵. Cette SHPT est due à une longue suite d'évènements tout au long de la progression de l'IRC qui produit une diminution prolongée de la concentration plasmatique de 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25[OH]₂D) et de calcium (Ca) de même qu'une augmentation de la concentration plasmatique de phosphate (P) ce qui a pour effet d'induire l'expression de l'ARNm, la synthèse et la sécrétion de la PTH au niveau des parathyroïdes^{106, 107}. Plus précisément, l'IRC entraîne une incapacité du rein à hydroxyler la 25-hydroxyvitamine D (25[OH]D), préalablement formée dans le foie, en position 1 pour former la 1,25[OH]₂D. Un des rôles de la 1,25[OH]₂D est

d'inhiber la sécrétion de PTH par les parathyroïdes. En absence d'inhibition par la $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$, les parathyroïdes sécrètent sans arrêt de la PTH ce qui en augmente la concentration plasmatique. L'absence de $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$, qui agit normalement au niveau de l'intestin pour augmenter l'absorption intestinale du Ca, entraîne aussi une diminution de la concentration plasmatique de Ca. De plus, la diminution de taux de filtration glomérulaire chez les patients souffrant d'IRC entraîne une diminution de la phosphaturie, ce qui a pour effet d'en augmenter la concentration plasmatique. Le P forme un complexe avec le Ca plasmatique, ce qui fait paraître les niveaux de Ca encore plus bas aux parathyroïdes. La perte des effets inhibiteurs du Ca et de la $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$ sur la production de PTH entraîne l'augmentation de la sécrétion de PTH causant la SHPT retrouvée en IRC ^{106, 107}.

Une surstimulation prolongée comme celle observée en IRC peut même aller jusqu'à induire la prolifération des cellules parathyroïdiennes ¹⁰⁶. De plus, il a été démontré qu'en IRC, la PTH est responsable de la diminution de synthèse de plusieurs protéines. Par exemple, la synthèse de la lipase hépatique, du récepteur de la vasopressine et du récepteur de l'angiotensine II est réduite dans les hépatocytes ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. La PTH est aussi responsable d'une diminution de la synthèse du facteur de croissance insulino-mimétique de type I (IGF-1) dans les cardiomyocytes ¹¹¹. Finalement, nous avons démontré dans notre laboratoire que la PTH réduit, de façon dose- et temps-dépendante, l'expression protéique, l'ARNm et l'activité du CYP3A2 hépatique de rat. Ces résultats seront bientôt soumis pour publication dans un article qui sera signé par Michaud *et al.* Comme mentionné en introduction, le

CYP450 et la Pgp ont plusieurs inhibiteurs communs. De plus, une étude préliminaire réalisée dans notre laboratoire a démontré que l'incubation d'hépatocytes de rat avec de la PTH à une concentration de 10^{-9} M (concentration plasmatique retrouvée chez les patients IRC) entraîne une diminution de l'expression protéique de la Pgp. Il n'est donc pas exclu que, lors de l'IRC, la PTH inhibe l'expression et l'activité des différents transporteurs.

En conclusion, nous avons démontré que l'IRC induit une diminution de l'expression protéique et de l'activité des transporteurs de médicaments, Pgp et MRP2, en réponse à un facteur urémique circulant. Nous ne pouvons toutefois pas affirmer que cette diminution de l'expression protéique est associée à une diminution de l'expression de l'ARNm des deux transporteurs. Contrairement à l'hypothèse que nous avons émise, l'IRC ne semble toutefois pas affecter l'expression protéique de Oatp3. La diminution de l'activité de la Pgp et de MRP2 observée en IRC peut contribuer à l'augmentation de la biodisponibilité de plusieurs médicaments. En effet, une diminution de l'extrusion des médicaments en plus d'une diminution de leur métabolisme intestinal, comme on l'observe en IRC, peuvent facilement augmenter la fraction de la dose donnée d'un médicament atteignant la circulation sanguine, c'est-à-dire sa biodisponibilité. Il reste maintenant à déterminer quels facteurs circulants sont responsables de la diminution de l'expression protéique et de l'activité des transporteurs.

CONCLUSION

Il est bien démontré que les patients souffrant d'IRC présentent une forte incidence d'effets secondaires qui entraînent des coûts de traitement très élevés. Il a déjà été démontré qu'une diminution de l'élimination rénale et métabolique des médicaments peut être responsable de l'augmentation des concentrations sanguines de médicaments. Ces concentrations plasmatiques élevées sont aussi dues à une augmentation de la biodisponibilité de plusieurs médicaments lors de l'IRC.

La biodisponibilité d'un médicament est surtout influencée par son métabolisme de premier passage et son transport actif intestinal. Il a déjà été démontré que les enzymes de métabolisme de phase I intestinales sont inhibées lors de l'IRC, pouvant en soit expliquer la plus grande biodisponibilité des médicaments. Nous venons toutefois de démontrer que le transport actif intestinal des médicaments est également affecté par l'IRC. En effet, les transporteurs exportateurs Pgp et MRP2 voient leur expression protéique ainsi que leur activité diminuée en IRC. Les médicaments qui sont normalement rejetés dans l'intestin par ces transporteurs sont donc absorbés contribuant à l'augmentation de la biodisponibilité des médicaments observée lors de l'IRC. Il nous est toutefois impossible de déterminer si l'inhibition des deux transporteurs est due à une diminution de l'expression de leur ARNm ou à un mécanisme post-traductionnel.

Le mécanisme exact qui entraîne l'inhibition de l'expression protéique et de l'activité de la Pgp et de MRP2 demeure inconnu. Nos résultats supportent toutefois l'hypothèse qu'un facteur présent dans le sérum des rats IRC est responsable de cette diminution. En effet, l'incubation d'entérocytes avec du sérum de rat urémique entraîne une diminution de leur expression protéique. De plus, l'incubation d'une monocouche de cellules Caco-2 avec ce sérum entraîne une diminution du transport de la rhodamine 123, un substrat spécifique de la Pgp.

Dans un avenir prochain, nous tenterons de déterminer si l'IRC affecte l'expression et l'activité de la Pgp et de MRP2 au niveau hépatique. Nous tenterons ensuite d'identifier quel(s) médiateur(s) sérique(s) est (sont) responsable(s) de la modulation des transporteurs de médicaments en IRC. Les études déjà publiées sur l'impact de différentes toxines urémiques sur l'expression et l'activité de la Pgp et de MRP2 dans le foie en font des molécules de choix comme responsables de cette modulation. De plus, les cytokines pro-inflammatoires fortement exprimées en IRC sont aussi reconnues pour leur capacité à réguler l'expression et l'activité de la Pgp et de MRP2 dans différents tissus. Finalement, la PTH, une hormone surexprimée en IRC, est reconnue pour diminuer plusieurs protéines hépatiques et cardiaques. Par conséquent, l'impact de la PTH sur l'expression protéique et l'activité de la Pgp et de MRP2 sera finalement étudié.

RÉFÉRENCES

1. Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes: Rapport 2001. In: CIHI, ed. Volume 1. Ottawa (Ontario): Institut canadien d'information sur la santé, 2001.
2. Levey AS. Clinical practice. Nondiabetic kidney disease. *N Engl J Med* 2002;347:1505-11.
3. Campoy S, Elwell R. Pharmacology & CKD: how chronic kidney disease and its complications alter drug response. *Am J Nurs* 2005;105:60-71; quiz 72.
4. Lam YW, Banerji S, Hatfield C, Talbert RL. Principles of drug administration in renal insufficiency. *Clin Pharmacokinet* 1997;32:30-57.
5. Cantu TG, Ellerbeck EF, Yun SW, Castine SD, Kornhauser DM. Drug prescribing for patients with changing renal function. *Am J Hosp Pharm* 1992;49:2944-8.
6. Talbert RL. Drug dosing in renal insufficiency. *J Clin Pharmacol* 1994;34:99-110.
7. Matzke GR, Frye RF. Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* 1997;16:205-31.
8. Johnson JA, Bootman JL. Drug-related morbidity and mortality. A cost-of-illness model. *Arch Intern Med* 1995;155:1949-56.

9. Gabardi S, Abramson S. Drug dosing in chronic kidney disease. *Med Clin North Am* 2005;89:649-87.
10. Matzke GE, Frey RF. Drug dosing in patients with impaired renal function. In: Pipiro JT TR, Hayes PE, Yee GC, Matzke GR, Posey ML, ed. *Pharmacotherapy: A pathophysiologic basis*. Second ed. New York: Elsevier Science Publishing Inc, 1992:750-763.
11. Nolin TD, Frye RF, Matzke GR. Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:906-25.
12. Dowling TC, Briglia AE, Fink JC, Hanes DS, Light PD, Stackiewicz L, Karyekar CS, Eddington ND, Weir MR, Henrich WL. Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:427-34.
13. Watkins PB, Murray SA, Winkelman LG, Heuman DM, Wrighton SA, Guzelian PS. Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J Clin Invest* 1989;83:688-97.
14. Nicolas P, Tod M, Padoin C, Petitjean O. Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clin Pharmacokinet* 1998;35:347-59.
15. Debord P, Louchahi K, Tod M, Cournot A, Perret G, Petitjean O. Influence of renal function on the pharmacokinetics of diacerein after a single oral dose. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994;19:13-9.

16. Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP, Pichette V. Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1317-20.
17. 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* 2002;137:1039-46.
18. Elston AC, Bayliss MK, Park GR. Effect of renal failure on drug metabolism by the liver. *Br J Anaesth* 1993;71:282-90.
19. Vanholder R, De Smet R, Ringoir S. Factors influencing drug protein binding in patients with end stage renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1993;44:S17-21.
20. Swan SK, Bennett WM. Drug dosing guidelines in patients with renal failure. *West J Med* 1992;156:633-8.
21. Barthe L, Woodley J, Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clin Pharmacol* 1999;13:154-68.
22. Benet LZ, Cummins CL. The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:S3-S11.
23. Hall SD, Thummel KE, Watkins PB, Lown KS, Benet LZ, Paine MF, Mayo RR, Turgeon DK, Bailey DG, Fontana RJ, Wrighton SA. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos* 1999;27:161-6.
24. Krishna DR, Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 1994;26:144-60.

25. Wacher VJ, Salphati L, Benet LZ. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:89-102.
26. Gugler R, Allgayer H. Effects of antacids on the clinical pharmacokinetics of drugs. An update. *Clin Pharmacokinet* 1990;18:210-9.
27. St Peter WL, Redic-Kill KA, Halstenson CE. Clinical pharmacokinetics of antibiotics in patients with impaired renal function. *Clin Pharmacokinet* 1992;22:169-210.
28. Ilett KF, Tee LB, Reeves PT, Minchin RF. Metabolism of drugs and other xenobiotics in the gut lumen and wall. *Pharmacol Ther* 1990;46:67-93.
29. Kaminsky LS, Fasco MJ. Small intestinal cytochromes P450. *Crit Rev Toxicol* 1991;21:407-22.
30. Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes. In: Montellano Od, ed. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Second edition ed. New York: Plenum Press, 1995:473-536.
31. Gibson TP, Giacomini KM, Briggs WA. Propoxyphene and norpropoxyphene plasma concentrations in the anephric patients. *Clin Pharmacol Ther* 1980;27:665-770.
32. Barnes JN, Williams AJ, Tomson MJ, Toseland PA, Goodwin FJ. Dihydrocodeine in renal failure: further evidence for an important role of the kidney in the handling of opioid drugs. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;290:740-2.

33. Kanfer A, Stamatakis G, Torlotin JC, Fredj G, Kenouch S, Mery JP. Changes in erythromycin pharmacokinetics induced by renal failure. *Clin Nephrol* 1987;27:147-50.
34. Okabe H, Hashimoto Y, Inui KI. Pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J Pharm Pharmacol* 2000;52:1467-72.
35. Balant L, Gorgia A, Marmy A, Tschopp JM. [Clearance concept applied to pharmacokinetics: 2. Experience with tolamolol (beta-blocking agent) in renal insufficiency (author's transl)]. *Nephrologie* 1980;1:177-82.
36. Du Souich P, Maurice H, Heroux L. Contribution of the small intestine to the first-pass uptake and systemic clearance of propranolol in rabbits. *Drug Metab Dispos* 1995;23:279-84.
37. Leblond FA, Petrucci M, Dube P, Bernier G, Bonnardeaux A, Pichette V. Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1579-85.
38. Kunta JR, Sinko PJ. Intestinal drug transporters: in vivo function and clinical importance. *Curr Drug Metab* 2004;5:109-24.
39. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455:152-62.
40. Bellamy WT. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:161-83.

41. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;47:381-9.
42. Gros P, Raymond M, Bell J, Housman D. Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol* 1988;8:2770-8.
43. Hsu SI, Lothstein L, Horwitz SB. Differential overexpression of three *mdr* gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique *mdr* genes. *J Biol Chem* 1989;264:12053-62.
44. van der Blik AM, Kooiman PM, Schneider C, Borst P. Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene* 1988;71:401-11.
45. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997;8:161-70.
46. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
47. Gottesman MM, Pastan I, Ambudkar SV. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6:610-7.
48. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7735-8.

49. Li M, Hurren R, Zastawny RL, Ling V, Buick RN. Regulation and expression of multidrug resistance (MDR) transcripts in the intestinal epithelium. *Br J Cancer* 1999;80:1123-31.
50. Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, Brown MB, Guo W, Rossi SJ, Benet LZ, Watkins PB. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:248-60.
51. Fricker G, Miller DS. Relevance of multidrug resistance proteins for intestinal drug absorption in vitro and in vivo. *Pharmacol Toxicol* 2002;90:5-13.
52. Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ, Wilkinson GR. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* 1999;16:408-14.
53. Wandel C, Kim RB, Kajiji S, Guengerich P, Wilkinson GR, Wood AJ. P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res* 1999;59:3944-8.
54. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77:491-502.

55. Schinkel AH, Mol CA, Wagenaar E, van Deemter L, Smit JJ, Borst P. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur J Cancer* 1995;31A:1295-8.
56. Lautier D, Canitrot Y, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 1996;52:967-77.
57. Cole SP, Deeley RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 1998;20:931-40.
58. Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, Fattinger K. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:598-604.
59. Meerum Terwogt JM, Malingre MM, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW, Rosing H, Koopman FJ, van Tellingen O, Swart M, Schellens JH. Coadministration of oral cyclosporin A enables oral therapy with paclitaxel. *Clin Cancer Res* 1999;5:3379-84.
60. Sun H, Frassetto L, Benet LZ. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* 2006;109:1-11. Epub 2005 Aug 8.
61. Hochman JH, Chiba M, Nishime J, Yamazaki M, Lin JH. Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:310-8.
62. Veau C, Leroy C, Banide H, Auchere D, Tardivel S, Farinotti R, Lacour B. Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1607-14.

63. Murakami T, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Factors affecting the expression and function of P-glycoprotein in rats: drug treatments and diseased states. *Pharmazie* 2002;57:102-7.
64. Huang ZH, Murakami T, Okochi A, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 2000;406:453-60.
65. Traber PG. Regulation of sucrase-isomaltase gene expression along the crypt-villus axis of rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:765-73.
66. Traber PG, Yu L, Wu GD, Judge TA. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. *Am J Physiol* 1992;262:G123-30.
67. Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M, Keppler D. Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 2000;32:1317-28.
68. Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* 2002;31:320-5. Epub 2002 Jun 17.
69. Mangeat P, Roy C, Martin M. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 1999;9:187-92.

70. Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 1999;274:34507-10.
71. Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:113-43.
72. Ortiz DF, Moseley J, Calderon G, Swift AL, Li S, Arias IM. Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 2004;279:32761-70. Epub 2004 May 24.
73. Annaert PP, Turncliff RZ, Booth CL, Thakker DR, Brouwer KL. P-glycoprotein-mediated in vitro biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1277-83.
74. Kuniyama M, Nagai J, Murakami T, Takano M. Renal excretion of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats with glycerol-induced acute renal failure. *J Pharm Pharmacol* 1998;50:1161-5.
75. Zamek-Gliszczyński MJ, Xiong H, Patel NJ, Turncliff RZ, Pollack GM, Brouwer KL. Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein and its diacetate promoiety in the liver. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:801-9.
76. Turncliff RZ, Meier PJ, Brouwer KL. Effect of dexamethasone treatment on the expression and function of transport proteins in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2004;32:834-9.

77. Xiong H, Suzuki H, Sugiyama Y, Meier PJ, Pollack GM, Brouwer KL. Mechanisms of impaired biliary excretion of acetaminophen glucuronide after acute phenobarbital treatment or phenobarbital pretreatment. *Drug Metab Dispos* 2002;30:962-9.
78. Patel NJ, Zamek-Gliszczyński MJ, Zhang P, Han YH, Jansen PL, Meier PJ, Stieger B, Brouwer KL. Phenobarbital alters hepatic Mrp2 function by direct and indirect interactions. *Mol Pharmacol* 2003;64:154-9.
79. Zhang P, Tian X, Chandra P, Brouwer KL. Role of glycosylation in trafficking of Mrp2 in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Mol Pharmacol* 2005;67:1334-41. Epub 2005 Jan 20.
80. Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, D'Intini V, Ratanarat R, De Cal M, Bonello M, Bordoni V, Salvatori G, Andrikos E, Yakupoglu G, Levin NW, Ronco C. Uremic toxins: a new focus on an old subject. *Semin Dial* 2005;18:203-11.
81. Takamura N, Maruyama T, Otagiri M. Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clin Chem* 1997;43:2274-80.
82. Sarnatskaya VV, Lindup WE, Niwa T, Ivanov AI, Yushko LA, Tjia J, Maslenny VN, Korneeva LN, Nikolaev VG. Effect of protein-bound uraemic toxins on the thermodynamic characteristics of human albumin. *Biochem Pharmacol* 2002;63:1287-96.
83. Tsutsumi Y, Deguchi T, Takano M, Takadate A, Lindup WE, Otagiri M. Renal disposition of a furan dicarboxylic acid and other uremic toxins in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:880-7.

84. Sun H, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ. Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1239-46. Epub 2004 Jul 30.
85. Touchette MA, Slaughter RL. The effect of renal failure on hepatic drug clearance. *DICP* 1991;25:1214-24.
86. Shibata N, Morimoto J, Hoshino N, Minouchi T, Yamaji A. Factors that affect absorption behavior of cyclosporin a in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail* 2000;22:181-94.
87. Akahoshi T, Kobayashi N, Hosaka S, Sekiyama N, Wada C, Kondo H. In-vivo induction of monocyte chemotactic and activating factor in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:2244-9.
88. Higuchi T, Yamamoto C, Kuno T, Mizuno M, Takahashi S, Kanmatsuse K. Increased production of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist by peripheral blood mononuclear cells in undialyzed chronic renal failure. *Nephron* 1997;76:26-31.
89. Ziesche R, Roth M, Papakonstantinou E, Nauck M, Horl WH, Kashgarian M, Block LH. A granulocyte inhibitory protein overexpressed in chronic renal disease regulates expression of interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:301-5.
90. Sunder-Plassmann G, Kapiotis S, Gasche C, Klar U. Functional characterization of cytokine autoantibodies in chronic renal failure patients. *Kidney Int* 1994;45:1484-8.

91. Oettinger CW, Bland LA, Oliver JC, Arduino MJ, McAllister SK, Favero MS. The effect of uremia on tumor necrosis factor-alpha release after an in vitro whole-blood endotoxin challenge. *J Am Soc Nephrol* 1994;4:1890-5.
92. McRae MP, Brouwer KL, Kashuba AD. Cytokine regulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2003;35:19-33.
93. Theron D, Barraud de Lagerie S, Tardivel S, Pelerin H, Demeuse P, Mercier C, Mabondzo A, Farinotti R, Lacour B, Roux F, Gimenez F. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the expression and function of P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line, GPNT. *Biochem Pharmacol* 2003;66:579-87.
94. Sukhai M, Yong A, Pak A, Piquette-Miller M. Decreased expression of P-glycoprotein in interleukin-1beta and interleukin-6 treated rat hepatocytes. *Inflamm Res* 2001;50:362-70.
95. Hirsch-Ernst KI, Ziemann C, Foth H, Kozian D, Schmitz-Salue C, Kahl GF. Induction of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* 1998;176:506-15.
96. Stein U, Walther W, Shoemaker RH. Reversal of multidrug resistance by transduction of cytokine genes into human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1383-92.
97. Stein U, Walther W, Shoemaker RH. Modulation of *mdr1* expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance. *Br J Cancer* 1996;74:1384-91.

98. Walther W, Stein U, Eder C, Wunderlich V. RNA analysis using miniprep RNA in reverse transcription PCR, Influence of cytokines on *mdr1* expression in human colon carcinoma cell lines: increased cytotoxicity of MDR relevant drugs, Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs. *Biotechniques* 1994;17:674-5.
99. Belliard AM, Lacour B, Farinotti R, Leroy C. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells. *J Pharm Sci* 2004;93:1524-36.
100. Siewert E, Dietrich CG, Lammert F, Heinrich PC, Matern S, Gartung C, Geier A. Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:232-8.
101. Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Gartung C. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 2003;38:345-54.
102. Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Haussinger D. Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 1999;116:401-10.
103. Dietrich CG, Geier A, Salein N, Lammert F, Roeb E, Oude Elferink RP, Matern S, Gartung C. Consequences of bile duct obstruction on intestinal expression and function of multidrug resistance-associated protein 2. *Gastroenterology* 2004;126:1044-53.

104. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-3. Epub 2004 Oct 28.
105. de Francisco AL. Secondary hyperparathyroidism: review of the disease and its treatment. *Clin Ther* 2004;26:1976-93.
106. Silver J, Levi R. Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005:S8-12.
107. Silver J, Levi R. Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Clin Nephrol* 2005;63:119-26.
108. Klin M, Smogorzewski M, Khilnani H, Michnowska M, Massry SG. Mechanisms of PTH-induced rise in cytosolic calcium in adult rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1994;267:G754-63.
109. 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* 1996;97:2167-73.
110. Massry SG, Klin M, Ni Z, Tian J, Kedes L, Smogorzewski M. Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats. *Kidney Int* 1995;48:1324-31.
111. Qing DP, Ding H, Vadgama J, Wu YY, Kopple JD. Elevated myocardial cytosolic calcium impairs insulin-like growth factor-1-stimulated protein synthesis in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:84-92.

