

Université de Montréal

Modulation du cytochrome P450 dans un modèle murin d'insuffisance
rénale chronique

par

Caroline Boisvert

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Avril, 2009

© Caroline Boisvert, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Modulation du cytochrome P450 dans un modèle murin d'insuffisance
rénale chronique

Présenté par :
Caroline Boisvert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Patrick DuSouich
Président Rapporteur
Dr. Vincent Pichette
Directeur de Recherche
Dr. Pierre Beaulieu
Membre du Jury

Résumé

Introduction : Les modèles murins sont grandement utilisés dans l'étude des maladies rénales et des pathologies associées. La concentration de la créatinine sérique est un bon indicateur de la filtration glomérulaire et en présence d'insuffisance rénale chronique (IRC), les concentrations de créatinine sérique (et la clairance) reflètent la sévérité de l'IRC. De plus, il a été démontré que l'IRC modifie le métabolisme des médicaments en diminuant l'activité et l'expression des enzymes hépatiques du cytochrome P450 (CYP450). Afin d'étudier la modulation du P450 par l'IRC avec un modèle murin et de confirmer nos résultats chez le rat, nous devons 1) développer un modèle d'IRC chez la souris, 2) mettre au point une technique de dosage des marqueurs de l'IRC et, 3) évaluer l'expression protéique du CYP450 en présence IRC.

Matériel et Méthode : Trois modèles chirurgicaux d'IRC chez la souris ont été développés. Une méthode du dosage de la créatinine par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) a été mise au point chez la souris et l'expression protéique du P450 a été mesurée par immunobuvardage de type Western.

Résultats : Plusieurs paramètres de CLHP comme le pH, la concentration et le débit de la phase mobile modifient le pic d'élution et le temps de rétention de la créatinine. Concernant le modèle expérimental, on observe une perte de poids et une augmentation de la concentration plasmatique de la créatinine chez les souris avec une IRC. De plus, l'expression protéique de plusieurs isoformes du cytochrome P450 est modulée par l'IRC. Nous observons une diminution du CYP 2D de 42% ($p < 0,01$), du CYP 3A11 de 60% et du CYP 1A de 37% ($p < 0,01$) par rapport aux souris témoins. On ne dénote aucun changement significatif au niveau de l'isoforme 2E1.

Conclusion : Il est possible d'induire une insuffisance rénale chronique chez la souris suite à une néphrectomie. La technique de dosage de la créatinine par CLHP est précise et exacte et permet de caractériser la sévérité de l'IRC chez la souris. L'expression protéique du CYP450 est régulée à la baisse dans le foie des souris atteintes d'IRC.

Mots Clés : Insuffisance Rénale Chronique, Métabolisme des Médicaments, Chromatographie Liquide Haute Performance, Créatinine, Néphrectomie, Souris, Cytochrome P450.

Abstract

Background: Mice models are widely used in renal studies. Seric creatinine concentration is used to evaluate glomerular filtration rate and is a good marker of chronic renal failure (CRF). It has been shown that CRF diminishes drug metabolism in the rat because of a downregulation of hepatic cytochrome P450 (CYP450) isoforms. To study CYP450 regulation in the mouse model, we needed to 1) develop a model of CRF in the mouse, 2) define a method of dosage of CRF markers, and 3) evaluate CYP450 protein expression in the liver of mice with CRF.

Methods: Models of CRF were tested and sub-total nephrectomy was selected because of the efficacy and reproducibility to induce CRF. A high pressure liquid chromatography (HPLC) method for the dosage of creatinine in mice sera was developed. Liver protein expression of CYP1A1, CYP3A11, CYP2D and CYP2E1 was assessed by Western Blot analysis.

Results: HPLC parameters such as pH, mobile phase concentration and flow rate modified the elution profile. Weight loss and high seric creatinine concentrations are seen in mice with CRF. Furthermore, protein expression of CYP1A, CYP3A11 and CYP2D was decreased in liver microsomes of mice with CRF by 37%, 60% and 42%, respectively ($p < 0.01$) compared to sham-operated mice. We found no significant difference in the expression of CYP2E1.

Conclusions: CRF models are reproducible in the mouse. The HPLC method for creatinine determination is precise and accurate, and can assess the severity of CRF. Hepatic protein expression of CYP450 is modulated in presence of CRF as in the rat.

Key Words: Chronic Renal Failure, Drug Metabolism, High Pressure Liquid Chromatography, Creatinine, Nephrectomy, Mouse, Cytochrome P450.

Table des Matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des Matières.....	v
Liste des Tableaux.....	viii
Liste des Figures.....	ix
Liste des Sigles et Abréviations.....	x
INTRODUCTION.....	1
L'Insuffisance Rénale Chronique.....	1
Causes	3
Pathogenèse	4
Conséquences.....	4
Traitements.....	5
La Pharmacocinétique des Médicaments.....	5
Absorption	5
Distribution	6
Métabolisme.....	8
Enzymes de Phase I.....	8
Enzymes de Phase II.....	13
Élimination	14
Modulation des Paramètres Pharmacocinétiques en Insuffisance Rénale Chronique	15
Absorption	15
Distribution	16

Élimination	17
Métabolisme	17
Métabolisme Hépatique chez l'Humain	17
Métabolisme Hépatique chez le Rat	19
Modèles d'IRC chez la souris.....	20
Marqueurs de l'IRC	21
Hypothèses et Objectifs	23
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	24
Modèle Expérimental	24
Protocole Expérimental	24
Préparation des Microsomes.....	25
Dosage des Protéines Microsomiales	26
Immunobuvardage de type Western.....	26
Dosage Biochimique des Créatinines Urinaire et Sérique	27
Courbe d'Étalonnage	27
Extraction de la Courbe d'Étalonnage	27
Extraction de la Créatinine Sérique	28
Dosage de la Créatinine Sérique par CLHP	28
Autres Dosages Biochimiques.....	29
RÉSULTATS	30
Effets des Modifications de la Phase Mobile et des Standards sur l'Élution.....	30
Détermination de la Courbe Standard de Créatinine	30
Caractéristiques et Paramètres Biochimiques.....	35
Expression Protéique des Isoformes du Cytochrome P450 Hépatique.....	36
DISCUSSION	42

Modèle d'IRC chez la souris	42
Mise au point du dosage de créatinine murine par CLHP	45
Évaluation de l'expression protéique du P450 en IRC chez la souris	47
Facteurs Sériques.....	51
CONCLUSION.....	56
Références	58

Liste des Tableaux

Tableau I	2
Stades de l'Insuffisance Rénale	
Tableau II	3
Dépenses annuelles pour un patient hémodialysé au Canada	
Tableau III	9
Distribution du P450 selon son importance relative dans le métabolisme des médicaments	
Tableau IV	10
Substrats des principaux isoenzymes du P450	
Tableau V	11
Principaux Inducteurs et Inhibiteurs du Cytochrome P450	
Tableau VI	12
Comparaison des isoformes du P450 entre l'humain, la souris et le rat	
Tableau VII	14
Les réactions de Phase II chez l'humain	
Tableau VIII	30
Effets des modifications de la phase mobile et des standards sur l'élution	
Tableau IX	35
Caractéristiques et paramètres biochimiques des souris selon les différents modèles d'IRC	
Tableau X	36
Paramètres biochimiques des souris IRC (néphrectomie subtotale 5/6)	
Tableau XI	43
Comparaison des concentrations plasmatiques de créatinine selon le modèle d'induction d'IRC	

Liste des Figures

Figure 1.....	32
Courbe standard de créatinine	
Figure 2	33
Courbe standard commerciale de créatinine	
Figure 3	34
Courbe standard de créatinine extraite	
Figure 4	37
Effet de l'insuffisance rénale chronique sur l'expression protéique de l'isoforme 3A11 dans les microsomes de foie de souris	
Figure 5	38
Effet de l'insuffisance rénale chronique sur l'expression protéique de l'isoforme 1A dans les microsomes de foie de souris	
Figure 6	39
Effet de l'insuffisance rénale chronique sur l'expression protéique de l'isoforme 2D dans les microsomes de foie de souris	
Figure 7	40
Effet de l'insuffisance rénale chronique sur l'expression protéique de l'isoforme 2E1 dans les microsomes de foie de souris	
Figure 8	41
Corrélation entre l'expression protéique du CYP3A11 et le niveau d'urée	

Liste des Sigles et Abréviations

ABC : *ATP-Binding cassette*
ADMA : *asymmetric dimethylarginine*
ARNm : acide ribonucléique messenger
BUN : *blood urea nitrogen*
CaSR : *calcium sensing receptor*
CLHP: chromatographie liquide haute performance
CoA: coenzyme A
CYP450: cytochrome P450
DFB: 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-diméthyl-4-[4-méthylsulfonylphényl]furan-2(5H)-one
EH: époxyde-hydrolases
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
EPO: érythropoïétine
FMO: flavine mono-oxygénases
HCl: chlorure d'hydrogène
IL-1 β : interleukine 1 beta
IL-6 : interleukine 6
IRA : insuffisance rénale aiguë
IRC : insuffisance rénale chronique
IRCT : insuffisance rénale chronique terminale
L-FABP : *liver-type fatty acid-binding protein*
MDRD: *modification of diet in renal disease*
MRP2: *multidrug resistance related protein* de type 2
MRP3: *multidrug resistance related protein* de type 3
NF- κ B: *nuclear factor kappa B*
NGAL: *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*
NOS: *nitric oxide synthase*
OATP: *organic-anion-transporting polypeptide*
PgP: p-glycoprotéine
pH: potentiel d'hydrogène
Pmp: par million de population
PTH: hormone parathyroïdienne
PTX: parathyroïdectomie
qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*
SA : substance active
TFG: taux de filtration glomérulaire
TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha

À mes parents, ma famille et mes amis

INTRODUCTION

L'Insuffisance Rénale Chronique

L'insuffisance rénale est caractérisée par la perte progressive de fonction rénale sur une période de plusieurs mois voire années. La maladie évolue du stade 1 au stade 5 pendant lesquels le taux de filtration glomérulaire (TFG) diminue progressivement (tableau I). Possédant plus d'un million de néphrons par rein, l'organisme est capable de maintenir la fonction rénale malgré le dommage rénal par deux moyens : l'hyperfiltration et l'hypertrophie des tissus rénaux sains. De ce fait, les niveaux plasmatiques d'urée et de créatinine sont augmentés de façon significative seulement lorsque le TFG est diminué de 50%. On parle d'insuffisance rénale chronique (IRC) principalement à partir du stade 3 et d'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) au stade 5 lorsque la fonction rénale doit être remplacée au moyen de dialyse ou d'une greffe de rein. Au Canada, il y a environ 30 000 patients traités pour l'IRCT soit une prévalence de 920 cas par million de population (pmp) [1, 2]. L'incidence de l'IRCT est de 153 pmp et ne fait qu'augmenter dû, en partie, à la population vieillissante du Canada. Les principaux marqueurs utilisés pour évaluer la fonction rénale i.e. la filtration glomérulaire, sont la clairance de la créatinine et l'urémie (concentration d'urée plasmatique).

Le remplacement de la fonction rénale requiert des modalités thérapeutiques coûteuses. L'hémodialyse en centre hospitalier, l'hémodialyse à domicile et la dialyse péritonéale coûtent respectivement 78 000\$, 38 000\$ et 44 000\$ par patient par année [2]. Les coûts associés aux greffés rénaux sont moindres, soit environ 28 000\$ par année après la première année. Le remplacement de la fonction rénale engendre également des coûts associés à l'IRC tels l'hospitalisation, la

prise de médicaments, la rémunération des médecins et les visites à l'urgence dues aux complications de l'IRC ou dans les cas de toxicité médicamenteuse (tableau II) [2].

Tableau I : Stades de l'Insuffisance Rénale

Stade	Description	TGF (mL/min/1,73m ²)
1	Domage rénal léger avec filtration normale ou augmentée	>90
2	Diminution légère de la fonction rénale	60-89
3	Diminution modérée de la fonction rénale	30-59
4	Diminution sévère de la fonction rénale	15-29
5	Insuffisance rénale requérant dialyse ou transplantation	<15

Tableau II : Dépenses annuelles pour un patient hémodialysé au Canada en 2007

Catégorie de Coûts	Dépenses Annuelles par Patient Hémodialysé (\$ Cdn)	
	Ambulatoire	En Centre
Hémodialyse	37 093	41 060
Néphrologues	6 450	6 450
Autres visites chez MD	7 401	7 943
Hospitalisations	17 592	17 592
Érythropoïétine	7 747	7 747
Autres Médicaments	4 710	5 096
Autres	3 104	4 369
Total	84 097	90 257

Causes

Les principales causes de l'IRC sont le diabète, l'hypertension et les glomérulonéphrites et à elles seuls, ces pathologies représentent 75% des cas d'IRC chez l'adulte. On peut classer les principales causes de l'IRC selon qu'elles sont : glomérulaires (diabète, lupus, glomérulosclérose), tubulo-interstitielles (maladies rénales polykystiques),

vasculaires (sténose artérielle rénale bilatérale, néphropathie ischémique) ou encore post-rénales (obstructives) [3].

Pathogenèse

Le syndrome urémique est utilisé pour décrire «l'intoxication» systémique par les produits métaboliques qui s'accumulent en IRC. Ces substances toxiques comptent l'urée, la créatinine, l'acide urique, l'hormone parathyroïdienne (PTH), les cytokines telles le TNF- α et l'IL-6, l'indoxyl sulfate, etc. Tous ces facteurs contribuent au développement du syndrome urémique.

Conséquences

En IRC, le rein n'assume plus ses fonctions principales telles que l'excrétion du potassium et du phosphate résultant en une hyperkaliémie et une hyperphosphatémie. L'expansion du volume extracellulaire par rétention d'eau et de sodium conduit à l'hypertension et l'œdème. Le rein sain produit de l'ammoniac au niveau des tubules distaux afin d'éliminer les acides sous forme d'ammonium. En IRC, le rein perd cette capacité ce qui résulte en une acidose métabolique. La diminution de la production d'érythropoïétine (EPO) par le rein provoque une anémie chez les patients atteints d'IRC et la diminution d'absorption intestinale de calcium provoque une hypocalcémie. La synthèse rénale de la 25(OH)-Vitamine D en 1,25(OH)-Vitamine D est réduite en IRC suite à la diminution de l'enzyme 1 α -hydroxylase présente seulement au niveau du rein. L'hypocalcémie, l'hyperphosphatémie et la diminution de 1,25(OH)-Vitamine D contribuent au développement de l'hyperparathyroïdie secondaire. Le métabolisme des os est alors altéré avec apparition d'ostéodystrophie si les niveaux sériques de PTH ne sont pas diminués [4].

Traitements

Il existe quatre niveaux de traitement de l'insuffisance rénale. En premier lieu, il est essentiel de traiter la cause primaire de la pathologie afin d'empêcher la progression de la maladie. En second lieu, plusieurs facteurs réversibles peuvent aggraver la fonction rénale tels les infections systémiques ou rénales, les médicaments néphro-toxiques, les obstructions urinaires, la défaillance cardiaque, l'hypercalcémie et autres. En troisième lieu, le traitement des complications de l'IRC permet le ralentissement de la progression de la maladie. On parle ici du traitement de l'hypertension avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II et un diurétique qui peut être pris en concomitance. Une restriction en protéine est également recommandée. La supplémentation en calcium, EPO, vitamine D3 et chélateurs de phosphate est souvent nécessaire. En dernier lieu, le remplacement de la fonction rénale est nécessaire pour les patients en stade 5 de la maladie et la dialyse (hémodialyse ou dialyse péritonéale) ou la greffe rénale sont inévitables [3].

La Pharmacocinétique des Médicaments

Lorsqu'un médicament est donné oralement, l'effet obtenu est directement associé à la quantité de substance active (SA) ou de métabolites qui se rend aux sites d'action. La concentration plasmatique de la SA dépend de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'élimination.

Absorption

L'absorption d'un médicament est modulée par six facteurs importants. Premièrement, la désintégration de la formule pharmaceutique permet le relâchement du médicament dans le tube gastro-intestinal. Ensuite, le médicament doit être dissout dans le milieu aqueux du suc gastrique pour

être conséquemment absorbé. Avant ceci, le médicament dissout doit se rendre au duodénum où la majorité des médicaments sont absorbés. La vidange gastrique est donc le troisième facteur modulant l'absorption. La vidange gastrique peut être accélérée par les agonistes du système parasympathique ou diminuée par les agonistes du système sympathique des dépresseurs du système nerveux central (ex. : antidépresseurs). Certaines pathologies, la grossesse et les aliments peuvent également moduler la vitesse de cette vidange. Une fois dans le duodénum, le médicament doit être en contact avec la muqueuse intestinale ce qui constitue le quatrième facteur important dans l'absorption [5].

L'absorption du médicament s'effectue via une diffusion passive ou via un transport actif. La diffusion passive est favorisée par la liposolubilité et la forme non-ionisée du médicament. Le transport actif des médicaments quant à lui est dépendant des transporteurs au niveau de la membrane de l'entérocyte. Les transporteurs peuvent être classés selon qu'ils facilitent l'entrée des médicaments dans l'entérocyte (transporteurs d'influx) ou qu'ils facilitent leur sortie (transporteurs d'efflux). On parle principalement des transporteurs de la famille des OATPs (*Organic-anion transporting polypeptide*) favorisant l'entrée des médicaments et des transporteurs de la famille des ABCs (*ATP binding cassette*) favorisant la sortie. Le sixième facteur non-négligeable modifiant l'absorption est la perfusion tissulaire. Logiquement, une perfusion accrue de la muqueuse intestinale sera favorable à l'absorption, l'inverse étant particulièrement vrai [5].

Distribution

Une fois absorbé, le médicament rejoint la circulation systémique et est distribué dans les tissus. Les propriétés physicochimiques du médicament ainsi que la présence des transporteurs dans les organes cibles détermineront sa distribution. Le poids moléculaire du médicament ainsi que sa forme ionisée (ou non) peuvent influencer le transport à travers les

cellules. De plus, un médicament lipophile aura une grande distribution au niveau du tissu adipeux. La présence de protéines plasmatiques permet la liaison du médicament à celles-ci et détermine la fraction libre du médicament dans le sang. Les médicaments acides se lient normalement à l'albumine alors que les médicaments basiques se lient principalement à l' α_1 -glycoprotéine acide. L'affinité du médicament pour la protéine plasmatique lui confère une constante d'affinité (K_{ap}). Plus celle-ci est grande, plus la liaison est forte et plus la fraction libre au niveau sanguin est réduite. Aussi, le médicament sera peu distribué à moins que la liaison du médicament pour les protéines tissulaires soit plus grande ($K_{at} > K_{ap}$).

La perfusion tissulaire n'affecte pas seulement l'absorption, mais également la distribution. Les organes grandement perfusés reçoivent une plus grande quantité de médicaments que ceux peu irrigués. Une diminution de la quantité des protéines plasmatiques ou tissulaires entraînera des modifications aux niveaux de l'équilibre entre la fraction liée et la fraction libre. Le vieillissement, entre autres, peut réduire la quantité d'albumine plasmatique ainsi que certaines pathologies telles le cancer, l'hyperthyroïdie ou l'insuffisance rénale. La protéinurie observée en insuffisance rénale elle aussi diminue la quantité d'albumine circulante. Les médicaments ayant un petit volume de distribution, une forte liaison aux protéines plasmatiques et un index thérapeutique étroit, doivent être surveillés de près lorsqu'administrés aux patients atteints d'IRC. Un changement minime de la fraction libre peut entraîner des effets indésirables voire de la toxicité. De plus, l'administration concomitante de plusieurs médicaments se liant aux mêmes protéines plasmatiques peut résulter en interactions médicamenteuses dues aux compétitions réversibles entre les différents médicaments [5].

Métabolisme

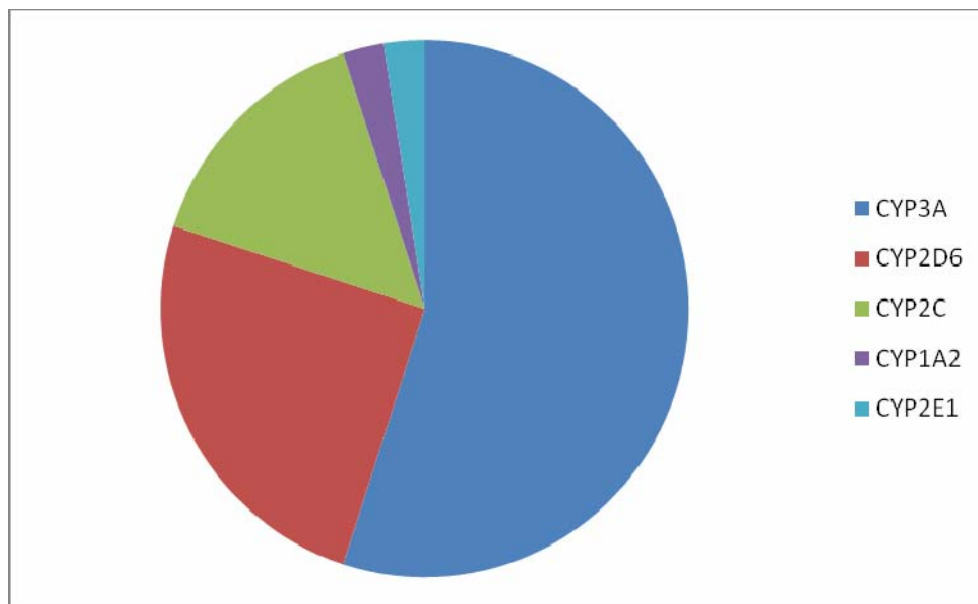
La biotransformation est un processus qui permet l'élimination des médicaments ou autres xénobiotiques en rendant ceux-ci hydrophiles. En effet, les substances lipophiles traversent bien les membranes cellulaires mais sont éliminées très difficilement. La biotransformation s'effectue via un système enzymatique qui modifie la substance mère en métabolites non, peu ou plus actifs que celle-ci. Certains métabolites peuvent même être toxiques alors que la substance mère est inactive. Les enzymes dites de Phase I et de Phase II sont responsables de cette biotransformation. Les xénobiotiques sont métabolisés soit par 1) les enzymes de phases I, 2) les enzymes de phases II, ou 3) les deux [5].

Enzymes de Phase I

Les enzymes de phase I regroupent trois familles principales : le cytochrome P450 (CYP450), les flavine-mono-oxygénases (FMO) et les époxyde-hydrolases (EH). Le CYP450 est responsable du métabolisme de nombreux médicaments, mais également de substances endogènes telles les hormones stéroïdiennes (vitamine D), les acides gras, les prostaglandines, etc [6]. La famille d'hémoprotéines du CYP450 est divisée en sous-familles selon l'homologie des acides aminés codant pour les protéines. Le CYP450 contient plus de 60 isoformes chez l'humain qui se localisent au niveau du réticulum endoplasmique permettant ainsi son isolation dans les microsomes [7]. Les enzymes du CYP450 sont exprimés dans plusieurs tissus comme le foie, le rein, l'intestin, le cerveau, le poumon, l'endothélium, le cœur, la peau, le sang, les testicules, la rate et autres. Le foie (l'intestin à un degré moindre) contient la plus grande variété et quantité d'isoformes lui conférant le rôle principal dans le métabolisme des médicaments. À l'exception de l'intestin, les tissus extra-hépatiques participent à la biotransformation des xénobiotiques mais leur effet est plutôt local que systémique [7]. Si l'on s'attarde au métabolisme des médicaments chez l'humain, les isoformes

CYP1A1/2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 et 3A4 sont les plus importantes (Tableau III).

Tableau III : Distribution des enzymes du CYP450 selon leurs importance relative dans le métabolisme des médicaments [8]



La famille CYP3A est responsable à elle seule de la biotransformation de 60% des médicaments actuellement prescrits. Le CYP3A est exprimé majoritairement dans le foie et l'intestin. L'isoforme CYP3A4 est la plus importante chez l'humain et correspond au CYP3A2 chez le rat et au CYP3A11 chez la souris. Ses substrats principaux sont les hormones (testostérone, progestérone, stéroïdes), les antiviraux (indinavir, amprénavir), le vérapamil, le midazolam, etc. Le tableau IV résume les principaux substrats des différentes isoformes du CYP450.

Tableau IV : Substrats des principaux isoenzymes du CYP450

CYP1A2	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
Amitriptyline	Ibuprofène	Carvédiol	Erythromycine
Caféine	Naproxène	Métoprolol	Alprazolam
Halopéridol	Diclofénac	Tramadol	Carbamazépine
Propranolol	Fluoxétine	Désipramine	Midazolam
Tamoxifène	Tamoxifène	Paroxétine	Indinavir
Vérapamil	Phénytoïne	Risperidone	Amprenavir
Théophylline	Tolbutamine	Codéine	Vérapamil
	Célécoxib	Encainide	Atorvastatine
	Warfarine		Testostérone
	Diazépam		Progestérone
			Carbamazépine

La famille CYP2C est la deuxième famille d'importance en ce qui a trait au métabolisme des médicaments. Ses isoformes CYP2C9 et 2C19 permettent la biotransformation de plus de 20% des médicaments. Les hypoglycémisants oraux, les anti-inflammatoires nonstéroïdiens et les anticoagulants sont des substrats du CYP2C9 (CYP2C11 chez le rat, CYP2C29 chez la souris). Le CYP2C19 est impliqué dans le métabolisme de l'oméprazole, du diazépam, du naproxène et de la S-méphénytoïne entre autres.

La famille CYP2D participe au métabolisme des antidépresseurs tricycliques, de la codéine, du tamoxifène et du métoprolol, alors que la famille CYP1A biotransforme la caféine, la théophylline et l'aminopyrine.

Les CYP450 peuvent être facilement induits ou inhibés par des médicaments, certains aliments ou encore des conditions pathologiques tel que résumé dans le tableau V.

Tableau V : Principaux Inducteurs et Inhibiteurs du CYP450

Inducteurs du CYP450	Inhibiteurs du CYP450
<ul style="list-style-type: none"> • Éthanol • Phénobarbital • Tabac • Hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) • Stéroïdes 	<ul style="list-style-type: none"> • Médicaments (antifongiques, antiviraux, antibiotiques) • Jus de pamplemousse • Produits Naturels (Échinacée) • Inflammation • IRC

Il existe une variation génétique dans l'expression du CYP450 chez l'humain. Ces polymorphismes se traduisent par des différences d'expression enzymatique, de sélectivité des substrats et d'activité. Il est estimé que ces polymorphismes affectent de 20 à 30% des thérapies médicamenteuses résultant en des échecs thérapeutiques ou encore des effets indésirables [9]. Les différences ethniques dans l'activité du CYP450 peuvent être expliquées par le bagage génétique différent. Les causes des polymorphismes sont multiples, en passant par les mutations dans les régions codantes ou non, des délétions de gènes ou encore des multiplications de gènes [9]. Suite à des observations de variations individuelles de profils pharmacocinétiques, on a caractérisé ces phénotypes selon quatre catégories : métaboliseurs pauvres, intermédiaires, extensifs ou ultra rapides. Il existe également des

différences inter espèces malgré le fait que le cytochrome CYP450 est un gène ancestral. Le tableau VI compare les différences des isoformes chez l'humain, la souris et le rat.

Tableau VI : Comparaison des isoformes du CYP450 entre l'humain, la souris et le rat

Sous-famille	Humain	Souris	Rat
CYP1A	1A1, 1A2	1a1, 1a2	1a1, 1a2
CYP1B	1B1	1b1	1b1
CYP2A	2A6, 2A7, 2A13	2a4, 2a5, 2a12, 2a22	2a1, 2a2, 2a3
CYP2B	2B6	2b9, 2b10, 2b13, 2b19, 2b23	2b1, 2b2, 2b3, 2b12, 2b15, 2b21, 2b31
CYP2C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2c29, 2c37-40, 2c44, 2c50, 2c54-55, 2c65- 70	2c6-7, 2c11-13, 2c22-24, 2c79- 81
CYP2D	2D6	2d9-13, 2d22, 2d26, 2d34, 2d40	2d1-5
CYP2E	2E1	2e1	2e1
CYP3A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3a11, 3a13, 3a16, 3a25, 3a41, 3a44, 3a57, 3a59	3a1, 3a2, 3a9, 3a18, 3a62, 3a73

Enzymes de Phase II

Les enzymes de Phase II se différencient du CYP450 sur plusieurs aspects comme leur localisation et leur action. Celles-ci nécessitent la présence d'un cofacteur pour former une liaison covalente avec le substrat puis il y a conjugaison. Les réactions des enzymes de phase II incluent la glucuronidation, la sulfonation, l'acétylation, la méthylation, la conjugaison au glutathion et la conjugaison avec un acide aminé. Quant à leur localisation cellulaire, les enzymes de Phase II sont principalement cytosoliques mais aussi dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Des molécules très lipophiles auront tendance à être métabolisées par les enzymes de Phase I en premier puis par les enzymes de Phase II par la suite. Par contre, les molécules moins lipophiles peuvent être métabolisées directement par les enzymes de Phase II sans passer par les enzymes de Phase I. La glucuronidation est possible grâce à la UDP (uridine diphosphate) glucuronosyl transférase (GT) et la spécificité de l'enzyme lui est conférée par l'épissage alternatif du gène encodant pour le UGT. La sulfonation nécessite de l'ATP et les enzymes sulfotransférases permettent l'ajout de groupe d'acide sulfonique. L'acétylation est différente des autres réactions du fait qu'elle requiert la présence d'un cofacteur, la Coenzyme A (CoA). La méthylation permet l'ajout d'un groupe méthyl par les méthyltransférases. La conjugaison du glutathione par la glutathione transférase permet son excrétion mais le glutathione peut également être transformé en acide mercaptorique [5]. Les réactions de phase II sont résumées dans le tableau VII.

Tableau VII : Les réactions de Phase II chez l'humain

Les Réactions de Phase II	Enzymes	Localisation Cellulaire
Glucuronidation	UDP-glucuronyl transférase (UDP-GT)	Réticulum endoplasmique
Sulfonation	Sulfotransférase	Cytosol
Acétylation	Arylamine-N-Acétyltransférase	Cytosol et Mitochondrie
Méthylation	Méthyltransférase	Cytosol, Réticulum endoplasmique
Conjugaison avec Glutathion	Glutathion-S-transférase (GST)	Cytosol et Réticulum endoplasmique
Conjugaison avec Acide Aminé	Acyl CoA (acide aminé) transférase	Mitochondrie et Réticulum endoplasmique

Élimination

Il existe plusieurs voies d'élimination des médicaments. Les deux principales sont rénale et hépatique, mais également intestinale, salivaire, pulmonaire et prostatique dans certains cas. La clairance rénale (Cl_R), aussi appelée clairance urinaire, est possible lorsque le médicament atteint le rein en vue de son élimination. Ceci est possible grâce à trois processus. Le médicament libre (f_p) atteint le rein par l'artériole afférente et 1) passe à travers le glomérule par filtration et est éliminé, 2) n'est pas filtré mais est sécrété au niveau du tubule (sécrétion tubulaire (ST)), 3) une fois dans le tubule, le médicament peut retourner au niveau systémique grâce à la réabsorption tubulaire (RT). De ce fait, la formule $Cl_R = VFG f_p + ST - RT$ où VFG est la vitesse de filtration glomérulaire, permet d'estimer la clairance rénale d'un médicament. Un médicament peut également être éliminé par biotransformation (principalement

hépatique et rénal) et le terme clairance métabolique (Cl_M) est utilisé. La biotransformation des médicaments permet leur élimination par voie biliaire ou urinaire. Ainsi, certains médicaments peuvent être éliminés à la fois par biotransformation et par le rein (sous forme inchangée ou biotransformés). La clairance totale (Cl_T) fait référence à l'addition de toutes les clairances impliquées dans l'épuration du médicament hors de l'organisme [5]. La liaison du médicament (substrat) aux enzymes de biotransformation est définie par la constante d'affinité du système enzymatique (K_E). Seule la f_p peut se lier aux enzymes et ainsi être métabolisée. L'induction ou l'inhibition des enzymes peut également modifier la Cl_M .

Modulation des Paramètres Pharmacocinétiques en Insuffisance Rénale Chronique

Absorption

Il est démontré qu'en insuffisance rénale, la vitesse d'absorption des médicaments peut être réduite due à la physiologie altérée du tube gastro-intestinal mais que la quantité absorbée n'est toutefois pas modifiée. Ceci est d'une grande importance lorsqu'on administre un médicament en dose unique et que l'on veut une réponse rapide (Ex. analgésique). Par contre, cette diminution de vitesse d'absorption est peu ressentie lors de l'administration de médicaments en doses répétées puisqu'il y aura équilibre. De plus, les médicaments prescrits aux gens souffrants d'IRC sont souvent administrés pour traiter des conditions chroniques telles le diabète, l'hypertension ou l'hyperparathyroïdie secondaire. Des concentrations élevées d'urée telles qu'observées en IRC peuvent mener à une transformation de l'urée en ammoniac par l'uréase gastrique conduisant à un pH élevé pouvant modifier la biodisponibilité des médicaments [10, 11].

Les transporteurs jouent également un rôle primordial dans la biodisponibilité des médicaments en IRC. Il a été démontré que l'activité de la Pgp (P-glycoprotéine) intestinale, mesurée selon le transport de la rhodamine 123, était réduite chez le rat atteint d'IRC [12]. De plus, une étude subséquente de notre laboratoire a confirmé la réduction de l'activité de la Pgp de plus de 60% au niveau intestinal chez les rats souffrants d'IRC tout en démontrant une diminution de l'expression protéique de la Pgp de 65% [13]. Ces travaux ont également démontré une réduction de l'expression des transporteurs MRP2 (*multidrug resistance related protein* de type 2) et MRP3 de 60% et 35%, respectivement, suggérant fortement que le transport d'extrusion des médicaments est grandement réduit en IRC chez le rat. Plusieurs évidences de l'altération de la pharmacocinétique clinique des médicaments transportés par la Pgp et les MRPs ont été mises à jour chez les patients atteints d'IRC. Dans tous les cas, les sujets IRC ont démontré une SSC (surface sous la courbe) accrue et une demi-vie allongée pour plusieurs substrats des transporteurs d'efflux tels que la cérivastatine, l'érythromycine, la repaglinide, la télithromycine, etc [14-17].

Distribution

À certains stades d'IRC, on observe une protéinurie où l'albumine, entre autres, est diminuée de façon à causer une réelle hypoalbumine. Cette condition mène donc à une réduction de liaison protéique entre l'albumine et son substrat et ceci entraîne une augmentation de la fraction libre une augmentation de la distribution, ceci peut provoquer de la toxicité. Cette modification de liaison peut également être attribuée à des changements de conformation de l'albumine en présence de substances endogènes telles les toxines urémiques [11].

Élimination

L'élimination rénale du médicament et/ou ses métabolites est affectée par l'IRC autant au niveau de la filtration glomérulaire que de la sécrétion tubulaire. Ceci mène à une augmentation de la concentration plasmatique du médicament résultant en un effet accru voire même une toxicité. Il est essentiel d'ajuster les doses des médicaments éliminés par le rein chez les patients souffrant d'IRC en se basant sur leur TFG. Par contre, il a été démontré que malgré les ajustements de doses chez les gens souffrant d'IRC, plusieurs d'entre eux présentent des réactions indésirables [18, 19]. Également, les patients atteints d'IRC consomment en moyenne sept médicaments de façon concomitante afin de traiter la maladie rénale ainsi que ses complications [20]. Il est donc fréquent d'observer des interactions médicamenteuses et même des surdosages. Toutefois, les réactions indésirables observées chez les patients atteints d'IRC peuvent être expliquées en partie par les modifications dans l'élimination non-rénale des médicaments, soit la clairance métabolique.

Métabolisme

Métabolisme Hépatique chez l'Humain

Il existe plusieurs études à ce jour démontrant la diminution de la clairance métabolique chez les patients souffrants d'IRC. En 1991, Touchette et Slaughter [21] ont fait le sommaire de plusieurs études quant à l'effet de l'IRC sur la clairance hépatique des médicaments effectuée par les enzymes de phases I et II. Les auteurs concluent que les médicaments métabolisés par oxydation (CYP450) et/ou par conjugaison (Phase II) sont « prédisposés » à une diminution de clairance hépatique. Des études subséquentes ont démontrés que ce sont en fait les enzymes du métabolisme hépatique qui sont modifiés en IRC.

Si l'on s'attarde au métabolisme hépatique *in vivo* chez l'humain atteint d'IRC, l'étude de Kevorkian *et al.* [22] suggère que l'activité du CYP2D6

est réduite chez les patients souffrant de différents degrés d'insuffisance rénale. Cependant, cette étude comporte certaines faiblesses car l'activité métabolique a été mesurée indirectement (clairance métabolique estimée à partir de la clairance urinaire) et l'un des substrats utilisés n'est pas spécifique au CYP2D6.

La même année, Matzke *et al.* [23] ont démontré que l'activité *in vivo* de CYP2D6 et de CYP2E1 n'étaient pas modifiés en IRC. La divergence de ces résultats pour ce qui a trait au CYP2D6 peut être expliquée en partie par l'utilisation de substrats différents. En revanche, l'étude de Frye a démontré que l'activité métabolique du CYP2C19 est diminuée de 25% chez les patients atteints d'IRC lorsqu'on mesure la présence de 4-hydroxyméphénytoïne urinaire suite à l'administration de la méphénytoïne.

Des études plus récentes ont démontré que l'activité du CYP2C9, responsable du métabolisme de la S-warfarine, était diminuée lorsqu'on mesurait le ratio S/R warfarine sanguin [24]. Une technique plus spécifique dans l'évaluation de l'activité métabolique des CYP450 est l'utilisation de sondes marquées radioactivement. Le ¹⁴C-érythromycine est souvent utilisé pour mesurer l'activité du CYP3A4 à l'aide de *Breath Tests* qui consistent à mesurer la production de CO₂ marquée dans la respiration. Dowling *et al.* [25] ont montré que chez des patients en IRCT, l'activité du CYP3A4 était réduite de 28% par rapport aux sujets sains.

Il est maintenant clair que l'activité *in vivo* de certaines isoformes du CYP450 hépatique est modulée par l'IRC chez l'humain, mais qu'en est-il des enzymes de Phase II? Il existe beaucoup moins d'évidence de l'effet de l'IRC chez les Phases II, mais une étude de pharmacocinétique sur la zidovudine en 1989 a démontré que les patients atteints d'IRC avaient des concentrations plasmatiques plus élevées du médicament que les sujets sains. Les auteurs concluent que cette augmentation de SSC

pourrait être expliquée par un métabolisme réduit suite à une diminution de glucuronidation hépatique [26]. Kim *et al.* [27] ont décrit une situation semblable avec l'isoniazide et une demi-vie allongée chez les patients souffrant d'IRC. Ils ont remarqué que la $t_{1/2}$ de l'isoniazide revenait quasi à la normal suite à la transplantation rénale alors que la clairance de l'isoniazide est en partie due à la clairance rénale mais principalement au métabolisme hépatique par les NATs (N-acétyltransférase). Ces données suggèrent que les NATs hépatiques sont régulées à la baisse chez les patients atteints d'IRC.

Toutes ces études convergent vers une diminution des enzymes de biotransformation au niveau hépatique chez les patients atteints d'IRC.

Métabolisme Hépatique chez le Rat

Grâce au développement vers la fin des années 60 de modèles de néphrectomies sub-totales chez le rat [28], plusieurs chercheurs ont adopté le modèle animal pour étudier l'effet de l'IRC sur le métabolisme des médicaments [29-32]. Leber *et al.* [29] ont montré que le contenu protéique microsomial du CYP450 total était diminué de 51% dans le foie des rats urémiques versus les rats témoins. De plus, l'activité spécifique de la *p*-hydroxylation, de la *O*-deméthylation et de la *N*-deméthylation étaient diminuées d'environ 65% en IRC. Quelques années plus tard, le même groupe a démontré que l'activité du CYP450 total était réduite de 43% chez les rats urémiques versus les rats témoins [31]. Patterson et Cohn ont confirmé ces résultats en observant une diminution de 26% d'oxydation par les CYP450 chez les rats urémiques [32]. Les différences au niveau de l'importance de la diminution de la vitesse de biotransformation peuvent être expliquées par le niveau variable d'urémie de ces rats. Patterson *et al.* ont également démontré que l'activité de l'éthylmorphine-N-deméthylase était inversement proportionnelle à la concentration d'urée dans le sang ($r^2=0,51$, $p < 0,05$). Toutes ces

expériences *in vitro* réaffirment les observations de diminution d'activité du CYP450 *in vivo* chez l'homme présentant de l'IRC.

Les travaux d'Uchida *et al.* sont les premiers à rapporter que l'expression protéique au niveau hépatique des CYP2C6, CYP2C11 et CYP3A2 était diminuée en IRC chez le rat [33]. Toutefois, l'équipe ne quantifie pas cette régulation à la baisse et aucune hypothèse n'est mise de l'avant afin d'expliquer le mécanisme potentiel de cette observation. Leblond *et al.* sont les premiers à démontrer que l'expression protéique hépatique des CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2 est diminuée respectivement de 45%, 75% et 65% chez les rats souffrants d'IRC versus les rats témoins [34]. De plus, l'expression génique de ces mêmes isoformes était clairement diminuée par immunobuvardage de type Northern. Cette étude est la première à démontrer une régulation à la baisse d'enzymes clés du métabolisme des médicaments secondaire à une réduction génique chez des rats en IRC. Par la suite, il a été montré que des facteurs sériques étaient impliqués dans cette régulation à la baisse du CYP450 [35]. De ce fait, l'utilisation d'un modèle de souris afin de confirmer ces résultats serait intéressante puisqu'il existe des souris mutantes pour ces facteurs sériques.

Modèles d'IRC chez la souris

Afin d'étudier l'effet de l'IRC dans la régulation du CYP450 chez la souris, l'utilisation d'une méthode d'induction d'IRC fiable et reproductible est nécessaire et nous permettra de confirmer les résultats obtenus chez le rat. Plusieurs modèles d'IRC existent chez le rat mais le plus utilisé reste la néphrectomie subtotale 5/6 telle que décrite dans un article de notre laboratoire [34]. Brièvement, le rat subi une néphrectomie 2/3 du rein gauche suivie d'une néphrectomie totale du rein droit 7 jours plus tard.

Ce modèle a également été développé chez la souris mais il n'est pas aussi bien caractérisé que celui du rat [36]. Outre les données

biochimiques de créatinine et d'urémie, aucune information n'est détaillée quant aux autres paramètres ou la survie. Trois techniques principales d'induction d'insuffisance rénale chez la souris sont rapportées dans la littérature. La première consiste à brûler le cortex rénal droit à l'aide d'un électrocautère en évitant le hile suivi d'une néphrectomie totale gauche [37]. La seconde méthode est une variante de la première; l'insuffisance rénale est induite par néphrectomie bilatérale par électrocautérisation [38]. La troisième méthode consiste à effectuer une néphrectomie totale unilatérale, suivie par un infarctus partiel des artères rénales du rein restant suite à une ligature [39].

L'utilisation d'un modèle murin d'IRC devient forte intéressante puisque plusieurs modèles de souris mutantes pour les gènes associés au CYP450 existent. Ainsi, des souris mutantes pour les molécules potentiellement impliquées dans la régulation à la baisse du CYP450 en IRC pourront être utilisées.

Marqueurs de l'IRC

Comme mentionné précédemment, la mesure de la filtration glomérulaire est utilisée couramment en clinique pour évaluer la fonction rénale. Celle-ci est classiquement déterminée par la clairance de la créatinine. La créatinine est un produit de dégradation du phosphate de créatine qui provient du métabolisme des muscles squelettiques et est quasi entièrement éliminée par le rein ce qui facilite le dosage urinaire. La créatinine est à la fois filtrée et sécrétée et la quantité produite de jour en jour est sensiblement constante. En IRC, la quantité de créatinine produite par l'organisme est inchangée, mais le rein est incapable de l'éliminer aussi bien. La clairance de la créatinine est évaluée en mesurant les concentrations plasmatiques et urinaires de la créatinine et consiste à collecter l'urine pour une période de 24 heures [40]. Le taux de filtration glomérulaire peut être estimé à partir de la concentration

plasmatique de créatinine seulement grâce à des formules mathématiques [40]. Les formules de Cockcroft et du MDRD (*modification of diet in renal disease*) sont les plus utilisées. [41] [42]

Par contre, ces techniques possèdent plusieurs limites. Il est démontré que la cimétidine, un antagoniste de l'histamine de type 2, peut inhiber la sécrétion tubulaire de la créatinine [43] alors que le fénofibrate augmente sa sécrétion [44]. Une autre limite est que la production de créatinine est variable selon la masse musculaire et le TFG peut être surestimé chez les maigres ou sous-estimé chez les culturistes [45]. La technique de dosage de la créatinine couramment employée en biologie clinique comporte elle aussi des lacunes. En fait, la méthode de Jaffé est reconnue pour interférer avec le glucose, les protéines, l'acide urique, la bilirubine, etc. [40].

D'autres méthodes plus précises existent pour déterminer la filtration glomérulaire et elles sont basées sur la décroissance plasmatique de molécules marquées mais elles sont lourdes et coûteuses [40]. Plusieurs nouveaux biomarqueurs ont été développés au cours des dernières années et leur sensibilité semble prometteuse. Pour en nommer quelques uns : le dosage urinaire et sanguin de NGAL (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), dosage plasmatique de l'ADMA (*asymmetric dimethylarginine*) et le dosage urinaire de L-FABP (*liver-type fatty acid-binding protein*). Toutes ces protéines sont détectées à l'aide de l'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) et leur dosage urinaire ou sanguin est corrélé avec celui de la créatinine [46]. La cystatine C, protéine produite de manière constante dans toutes les cellules nucléées, est démontré aussi efficace que le dosage de la créatinine mais son avantage est qu'elle n'est pas dépendante de la masse musculaire. Son utilisation en clinique demeure spécifique à certaines populations puisqu'elle est très coûteuse [40].

Les modèles animaux d'IRC sont souvent caractérisés selon leur concentration plasmatique de créatinine ou sa clairance. Certains mesurent les concentrations sériques d'urée afin d'obtenir l'indice BUN (*blood urea nitrogen*). Les méthodes avancées sont peu utilisées dues à leurs coûts associés élevés et leur utilisation chez l'humain peu courante.

Hypothèses et Objectifs

Suite à la revue de la littérature et plusieurs recherches effectuées dans notre laboratoire, nous croyons que le cytochrome P450 chez la souris sera modulé en IRC comme démontré chez le rat. Afin de prouver cette hypothèse, il faut :

- 1) Développer un modèle d'IRC chez la souris représentant la pathologie humaine
- 2) Mettre au point des techniques de dosage des marqueurs de l'IRC chez la souris
- 3) Évaluer l'expression protéique de certaines isoformes du cytochrome P450 au niveau hépatique chez la souris IRC

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Modèle Expérimental

Des souris mâles C57Bl/6 (Charles River, Californie, USA) âgées entre 35 et 40 jours, ont été hébergées dans l'animalerie du Centre de Recherche. Elles ont été nourries au Purina Mice Chow et elles avaient accès à l'eau *ad libitum*. Une période d'acclimatation d'une semaine a été permise avant le début des chirurgies. Les expériences ont été menées selon les lignes directrices du Conseil Canadien de la Protection des Animaux et en accord avec le comité d'éthique.

Protocole Expérimental

Les souris ont été divisées en quatre groupes expérimentaux : Groupe **A,B,C** IRC et Groupe **D** Témoin. Pour le groupe **A**, l'IRC a été induite par néphrectomie sub-totale (5/6). En fait, les souris du groupe A ont subi une néphrectomie (2/3) du rein droit au jour 0 (par une incision lombaire, les pôles du rein droit ont été coupés à l'aide d'un scalpel). Au jour 8, les souris ont subi une néphrectomie totale gauche. Le protocole utilisé a été basé sur celui développé chez le rat et publié antérieurement [34].

Les souris du groupe **B** ont subi une néphrectomie partielle du rein droit par électrocautère et une néphrectomie totale du rein gauche. En bref, par une incision dorsale du côté droit, le rein a été extériorisé et brûlé à l'aide d'un électrocautère à intervalle de 2 mm sur le cortex en évitant le hile [38]. La profondeur de la brûlure était d'environ 1 mm et la capsule rénale droite a été enlevée préalablement. Sept jours plus tard, par une incision équivalente collatérale, le rein gauche a été enlevé [37].

Les souris du groupe **C** ont subi des néphrectomies partielles du rein droit (jour 0) et gauche (jour 8) par électrocautérisation, la même procédure que pour le rein droit du groupe B [38]. Par contre, la capsule rénale fut

gardée intacte tel qu'indiqué dans le protocole de Gagnon et Duguid, 1983.

Les souris du groupe **D** étaient les souris témoins, donc elles ont subi des laparotomies au jour 0 et jour 8, et elles ont reçu la même analgésie postopératoire.

Les souris ont toutes été anesthésiées avec de l'isoflurane et le butorphanol a été utilisé pour l'analgésie post-chirurgie. L'incision du muscle a été suturée et la peau a été refermée à l'aide d'agrafes chirurgicales. Les saignements ont été arrêtés par pression et cautérisation. Les souris IRC des groupes A, B et C ont été nourries avec le Purina Mice Chow et de l'eau *ad libitum*. Les souris témoins du groupe D mangeaient la quantité moyenne de ce que les souris IRC avaient mangé la veille (*paired-fed*). Au jour 41, les souris ont été mises dans des cages métaboliques pour recueillir l'urine sur une période de 24 heures afin de déterminer la clairance de la créatinine. Au jour 42, elles ont été sacrifiées par décapitation. Le sérum récolté a été utilisé pour mesurer la créatinine sérique.

Préparation des Microsomes

Les foies de souris ont été excisés après la décapitation, pesés, découpés en morceaux et plongés dans l'azote liquide, puis congelés à -80°C jusqu'à la préparation des microsomes. Les microsomes ont été isolés par centrifugation différentielle. En résumé, 0,5 g de foie a été pesé, 2,5 ml de solution de sucrose 0,25 M a été ajoutée et le tout a été homogénéisé à l'aide d'un potter teflon-verre. La première centrifugation s'est fait à 600 x g pendant 8 minutes. Le surnageant a été centrifugé à 12 000 x g pendant 10 minutes. Le nouveau surnageant a été ajouté à 225µl de CaCl₂·2H₂O 1 M puis centrifugé de nouveau à 27 000 x g pendant 15 minutes. Cette fois-ci, le culot fut gardé et un total de 2,5 ml de KCl 1,15% a été ajouté à celui-ci et homogénéisé à l'aide du potter

téflon-verre. Puis, le tout a été centrifugé de nouveau à 27 000 x g pendant 15 minutes et le culot a été gardé, recouvert de solution D et congelé à -80°C jusqu'à l'analyse.

Dosage des Protéines Microsomiales

Le contenu des protéines des microsomes a été analysé selon la méthode de Micro BCA utilisant de l'albumine bovine sérique comme protéine standard [47].

Immunobuvardage de type Western

Cinq isoformes impliquées dans le métabolisme des médicaments ont été analysées par immunobuvardage de type Western (Western blot). Ces isoformes en ordre alphabétique sont : CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E1 et CYP3A11 (équivalent du CYP3A4 chez l'humain). Un échantillon de 25 µg de protéines microsomiales a été séparé par électrophorèse sur un gel 9% d'acrylamide puis transféré sur une membrane PVDF (fluorure de polyvinylidène). Cinq gels ont été transférés de façon à obtenir cinq membranes dans le but de les incuber avec les anticorps spécifiques aux cinq isoformes étudiées. Les membranes ont ensuite été saturées 60 minutes dans une solution 5% de lait écrémé dans *du phosphate-buffered saline* (PBS). Les anticorps des cinq isoformes ont été dilués dans une solution (0,5% de lait écrémé dans du PBS), incubés toute la nuit à 4°C puis lavés avec une solution de 0,1% Tween 20 dans du PBS. Les anticorps utilisés sont : chèvre anti-rat pour les isoformes CYP1A, 3A11 et 2E1, et lapin anti-rat type 2C6 et lapin anti-2D6 humain pour les isoformes CYP 2C6 et 2D. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire (anti-IgG de chèvre provenant de souris et anti-IgG de lapin provenant de chèvre) couplé à la peroxidase. La présence de complexes immuns a été mise en évidence grâce à une réaction chemiluminescence en utilisant le réactif Lumilight de Roche. La

chemiluminescence a été numérisée et analysée grâce à un appareil Fuji LS 3200.

Dosage Biochimique des Créatinines Urinaire et Sérique

La créatinine urinaire et sérique ont été dosées selon une adaptation de la méthode de CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) décrite dans l'article de Yuen *et al.* [48].

Courbe d'Étalonnage

Deux courbes d'étalonnage de créatinine ont été faites à partir de créatinine en poudre et à partir d'un standard commercial. La première courbe a été faite en dissolvant de la créatinine pure (*Creatinine anhydrous*, $C_4H_7N_3O$, Sigma, St-Louis, MO) afin d'obtenir une solution de 5 $\mu\text{g/ml}$ à partir de laquelle les concentrations 10, 20, 30, 40 et 60 ng par 25 μl ont été diluées dans la phase mobile. La courbe d'étalonnage à partir d'une solution commerciale (Creatinine standard solution, 0,03 mg/ml, 0,02 N HCl, Sigma, St-Louis, MO) a été préparée comme la précédente. En bref, la solution commerciale a été diluée obtenant une concentration 5 $\mu\text{g/ml}$ et les concentrations 10, 20, 30, 40 et 60 ng par 25 μl ont été diluées dans la phase mobile.

Extraction de la Courbe d'Étalonnage

Une troisième courbe d'étalonnage a été préparée afin de vérifier le pourcentage d'extraction par rapport aux standards de la section précédente. La méthode consistait à ajouter une solution d'albumine bovine 40 mg/ml aux standards de créatinine puis l'extraire afin d'éliminer l'albumine et garder seulement la créatinine. Une quantité connue (soit 1, 2, 3, 4 et 6 μl) de la solution 5 $\mu\text{g/ml}$ de créatinine a été ajouté à 5 μl de solution d'albumine bovine 40 mg/ml et 500 μl d'acétonitrile a été ajouté afin de précipiter les protéines (déprotéinisation). Le tout a été mélangé à l'aide d'un vortex et centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le

surnageant a été récolté et évaporé à sec par azote gazeux. Le culot a été remis en suspension dans 125 µl de phase mobile.

Extraction de la Créatinine Sérique

Le protocole d'extraction de la créatinine des sérums de souris est sensiblement le même que celui de la courbe d'étalonnage. Cinq microlitres de solution 5 µg/ml de créatinine ont été ajoutés à 5 µl de sérum. En ajoutant une quantité connue de créatinine au sérum, le tracé CLHP est détecté plus facilement et sa valeur se situe dans la courbe standard. Les étapes suivantes sont les mêmes que dans la section précédente.

Dosage de la Créatinine Sérique par CLHP

La créatinine sérique a été dosée selon la méthode de CLHP décrite dans l'article de Yuen *et al.*, 2004 avec quelques modifications facilitant son optimisation. La phase mobile a été préparée à partir d'acétate de sodium trihydrate (Fisher Chemical, HPLC Grade, New Jersey) et filtrée avant chaque utilisation. Le pH a été ajusté avec de l'acide acétique. Le volume injecté était de 25 µl et chaque échantillon a été dosé en triplicata. L'appareil de CLHP utilisée est le Beckman System Gold muni d'une colonne échangeuse de cations 150 x 4,1 mm PRP-X200 (Hamilton, Reno, NV) et la créatinine a été détectée aux ultraviolets à 234 nm. L'élution isocratique de la créatinine a été observée entre 5 et 15 minutes, dépendant des caractéristiques de la phase mobile et du débit. Voici les paramètres qui ont été testés :

a) Changement de concentration de la phase mobile

La solution d'acétate de sodium était initialement à 5 mM puis la concentration a été augmentée à 10 mM.

b) Changement du pH de la phase mobile

Le pH de la phase mobile a été testé à 4,5 et 5,1.

c) Ajout de chlorure d'hydrogène (HCl) aux standards

Les standards faits à partir de la poudre ont été acidifiés.

d) Changement du débit d'élution

Le débit initial était de 1,0 ml/min et celui-ci a été augmenté à 1,5 ml/min.

Autres Dosages Biochimiques

Un autre marqueur utilisé en clinique pour évaluer le degré d'IRC a été testé chez la souris. La concentration sérique d'urée et conséquemment de BUN (blood urea nitrogen) a été déterminée dans certains échantillons à l'aide de l'appareil auto-analyseur Advia 1650 (Bayer Diagnostic, Toronto, Ontario, Canada)

RÉSULTATS

Effets des Modifications de la Phase Mobile et des Standards sur l'Élution

Le temps de rétention de la créatinine dans la colonne est modulé par plusieurs facteurs. Comme observé dans le tableau VIII, la diminution du potentiel d'hydrogène (pH) augmente le temps de rétention de l'échantillon, alors que doubler la concentration de sodium acétate écourte le temps d'élution (temps de rétention diminué). On observe également qu'une augmentation du débit diminue le temps de rétention de l'échantillon. Par contre, l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl) aux standards n'a aucun effet sur le pic d'élution et le temps de rétention.

Tableau VIII : Effets des modifications de la phase mobile et des standards sur l'élution.

Paramètres	Effets
Augmentation de la concentration de la phase mobile (de 5 mM à 10 mM)	Élution plus rapide
Diminution du pH de la phase mobile (de 5,1 à 4,5)	Élution plus lente
Changement du débit d'élution (de 1,0 à 1,5 ml/min)	Élution plus rapide
Acidifications des standards	Aucun effet sur la courbe et le temps d'élution

Détermination de la Courbe Standard de Créatinine

En comparant la courbe d'étalonnage de la créatinine commerciale (figure 2) avec celle diluée à partir de la poudre (figure 1), le standard commercial est plus précis ($R^2 = 0.9934$ versus $R^2 = 0.9891$). Lorsque la créatinine est extraite, une certaine quantité est perdue dans le processus. L'extraction de la courbe d'étalonnage permet de vérifier le

pourcentage d'extraction de la créatinine. La courbe d'étalonnage de la créatinine extraite est présentée à la figure 3. Celle-ci a une extraction respectivement de 72.3% et 76.7% avec la courbe d'étalonnage diluée à partir de créatinine et avec la courbe d'étalonnage commerciale. Cela suggère que l'extraction de la créatinine des sérums murins sera d'environ 75%.

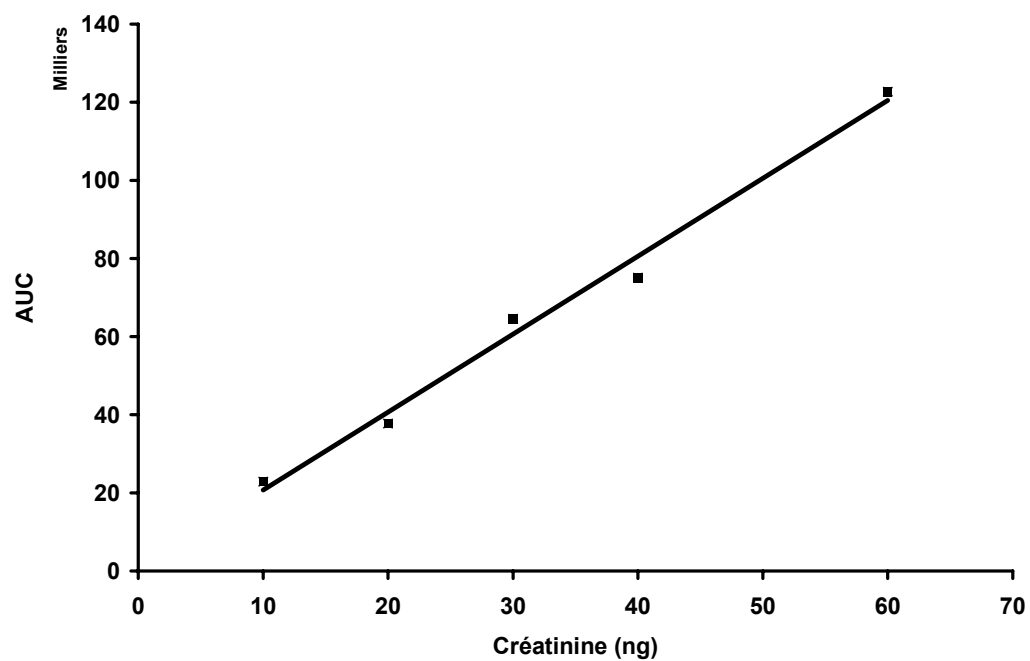


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la créatinine. Concentrations 10, 20, 30, 40 et 60 ng faites à partir de créatinine pure en poudre diluée dans une solution de sodium acétate 10 mM, pH=5,11. $R^2 = 0,9891$. N=3 pour chaque concentration. AUC= surface sous la courbe

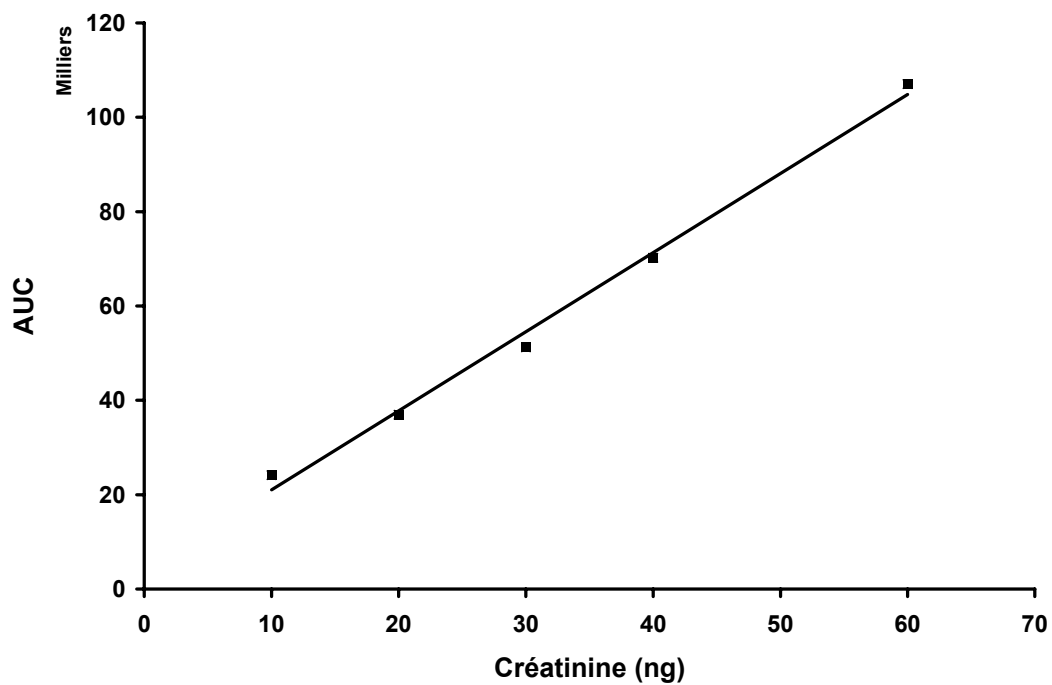


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de créatinine commerciale. Concentrations 10, 20, 30, 40 et 60 ng faites à partir de solution de créatinine commerciale diluée dans une solution de sodium acétate 10 mM, pH=5,11. $R^2 = 0,9934$. N=3. AUC= surface sous la courbe

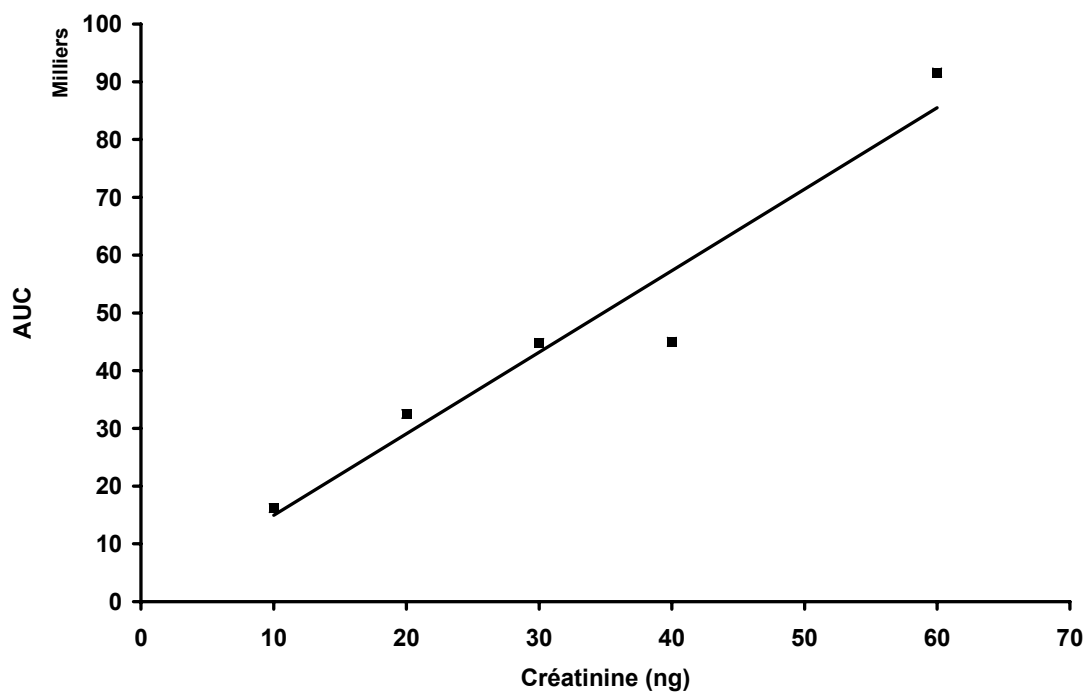


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de créatinine extraite. Concentrations 10, 20, 30, 40 et 60 ng faites à partir de créatinine pure en poudre diluée dans une solution de sodium acétate 10 mM, pH=5,11. Cinq microlitres de solution d'albumine bovine 40 mg/ml ont été ajoutés aux standards et l'extraction de ceux-ci s'est fait part déprotéinisation à l'acétonitrile et évaporation à l'azote (N₂). R² = 0,9353. N=3. AUC= surface sous la courbe.

Caractéristiques et Paramètres Biochimiques

Les paramètres biochimiques et les données concernant le poids et l'alimentation des souris sont représentés dans le tableau IX. Ce tableau compare les trois groupes de souris IRC (A,B,C) par rapport au groupe témoin (D). On dénote une perte de poids de 15% et 13% respectivement pour le groupe A et B. En comparaison avec les souris témoins (100%), la créatinine sanguine des souris IRC des groupes A, B et C est augmentée, soit respectivement 318, 204 et 172%. De plus, la clairance rénale (taux de filtration glomérulaire $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{min}$) est diminuée pour les groupes A, B et C par rapport au groupe D, soit respectivement 60, 52 et 52 %. Le taux de mortalité observé chez les groupes A, B, C et D sont respectivement de 67, 0, 0 et 33 %.

Tableau IX : Caractéristiques et paramètres biochimiques des souris selon les différents modèles d'IRC.

PARAMÈTRES	GROUPE			
	IRC*			CTL*
	A*	B*	C*	D*
Moyenne Poids Départ (g)	21,93 ± 0,55	23,65 ± 0,35	22,90 ± 0,30	22,20 ± 0,46
Moyenne Poids Final (g)	18,70 ± 1,10	20,45 ± 1,91	22,40 ± 0,80	20,15 ± 0,50
% Perte de Poids	15	13	2	9
Moyenne Nourriture 0-21 jrs (g)	3,3 ± 0,4	3,6 ± 0,6	3,4 ± 0,5	3,6 ± 0,3
Moyenne Nourriture 22-42 jrs (g)	3,1 ± 0,5	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,6	3,4 ± 0,4
Volume Urinaire à 42 jr (ml)	2,0 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,5
Créatinine Urinaire (mmol/L)	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,4
Créatinine Sanguine (mg/dL)	4,60 ± 0,33	2,94 ± 0,26	2,14 ± 0,22	1,45 ± 0,31
% du CTL (créatinine sanguine)	317%	203%	148%	100,0
Clairance Urinaire (ul/100g/min)	1413,3	1712,7	1720,9	3561,0
% du CTL (clairance urinaire)	39,7	48,1	48,3	100,0

* IRC : souris insuffisantes rénales. CTL : souris témoins (paired-fed). Groupe A : Néphrectomie (Nx) sub-totale (5/6). Groupe B : Nx partielle droite (électrocautère), Nx totale gauche. Groupe C : Nxs partielles droite et gauche. Groupe D : laparotomie

Suite à l'essai des trois modèles, nous avons préconisé la chirurgie subtotale pour les souris subséquentes. Les données concernant les concentrations de créatinine, d'urée et conséquemment de BUN sont représentées dans le tableau X pour les souris ayant subi une néphrectomie subtotale (5/6).

Tableau X : Paramètres biochimiques des souris IRC (néphrectomie subtotale 5/6)

Souris	Créatinine ($\mu\text{mol/L}$)	Urée (mmol/L)	BUN (mg/dL)	Poids (g)
IRC	90,5 \pm 8,9*	38,7 \pm 2,4*	108,3 \pm 6,7*	23,6 \pm 0,8
Contrôle	58,4 \pm 2,2	10,7 \pm 0,7	29,9 \pm 2,0	27,1 \pm 1,4

N=8

* p< 0,01 comparé avec contrôle

Donc, une fois le modèle d'IRC validé selon les marqueurs d'IRC, nous avons évalué le CYP450.

Expression Protéique des Isoformes du Cytochrome P450 Hépatique

Chez les souris avec une IRC, l'expression protéique de trois isoformes est diminuée significativement par rapport aux souris témoins; les isoformes CYP3A11, 1A et 2D sont réduits respectivement de 60, 37 et 42% (Figure 4, 5 et 6). Il n'y a cependant aucun changement significatif au niveau de l'isoforme 2E1 (Figure 7) par rapport aux souris témoins. On observe également une corrélation négative entre l'expression protéique du CYP3A11 et l'urémie (figure 8).

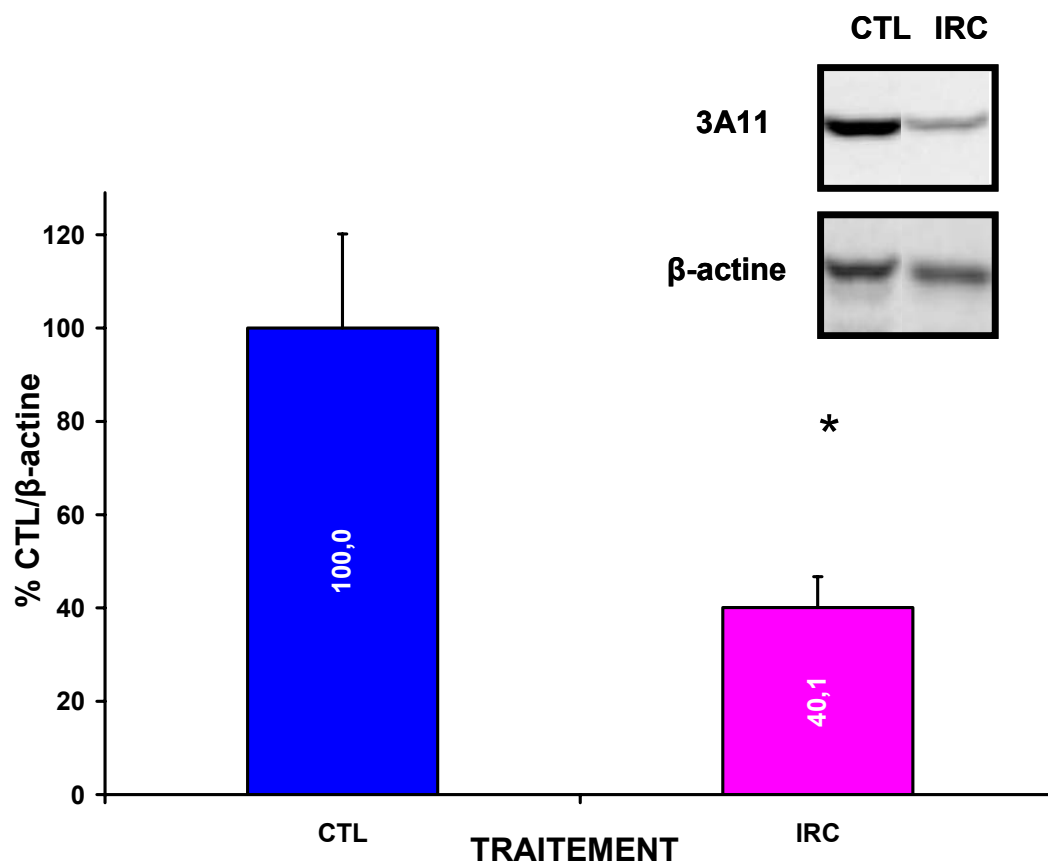


Figure 4 : Effet de l'insuffisance rénale chronique (IRC) sur l'expression protéique de l'isoforme 3A11 dans les microsomes de foie de souris. Un homogénat de microsomes de foie de souris (25 μ g) et un contrôle positif commercial ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Des anticorps spécifiques pour l'isoforme 3A2 de rat (analogue du CYP3A11 chez la souris) et pour une protéine constitutive, la β -actine, ont été utilisés. L'intensité des bandes protéiques est exprimée en unités densitométriques normalisées. * $p < 0,05$ par rapport aux souris témoins (CTL). Les données sont des moyennes \pm SEM (erreur-type), $n = 6$.

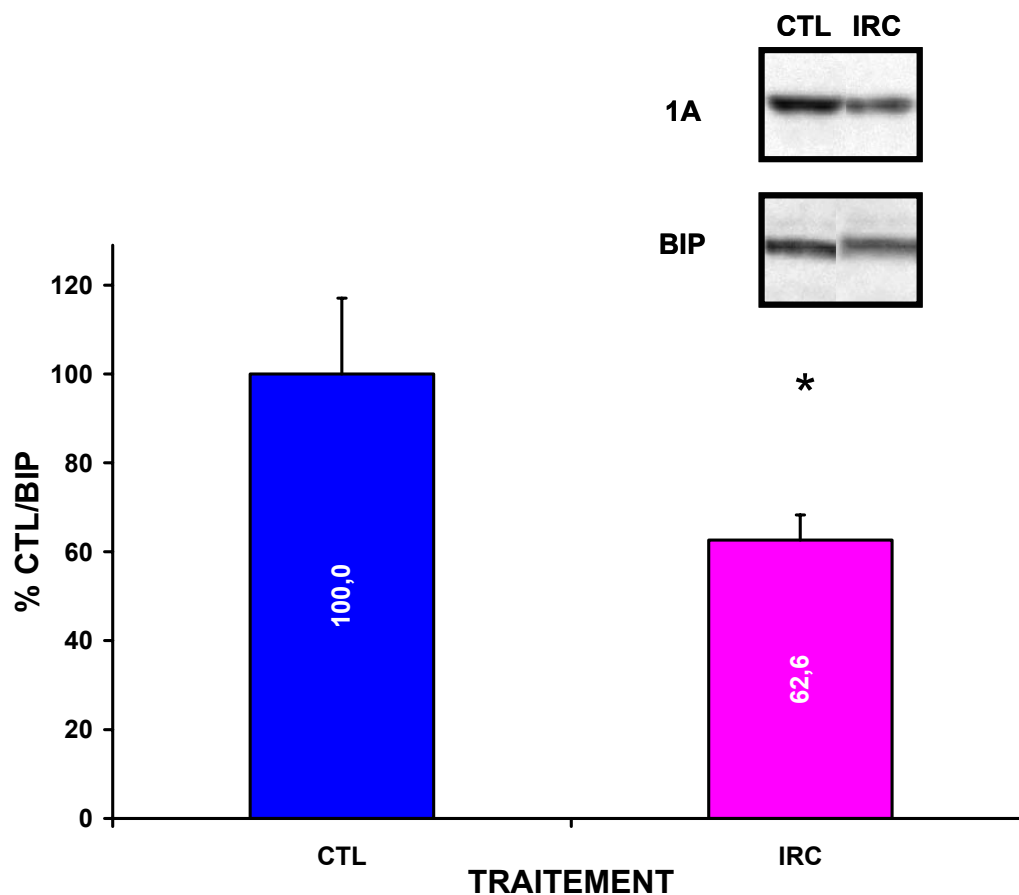


Figure 5 : Effet de l'insuffisance rénale chronique (IRC) sur l'expression protéique de l'isoforme 1A dans les microsomes de foie de souris. Un homogénat de microsomes de foie de souris (25 µg) et un contrôle positif commercial ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Des anticorps spécifiques pour l'isoforme 1A1/2 de rat et pour une protéine constitutive, la BiP, ont été utilisés. L'intensité des bandes protéiques est exprimée en unités normalisées densitométriques. *p < 0,01 par rapport aux souris témoins (CTL). Les données sont des moyennes ± SEM, n = 6

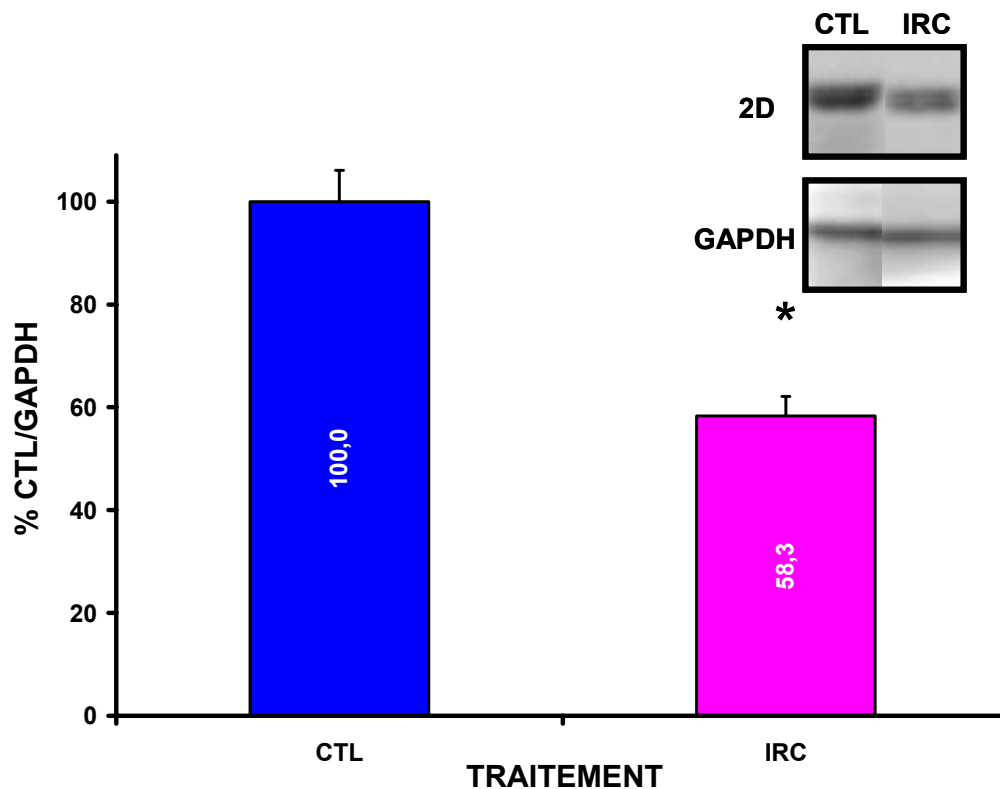


Figure 6 : Effet de l'insuffisance rénale chronique (IRC) sur l'expression protéique de l'isoforme 2D dans les microsomes de foie de souris. Un homogénat de microsomes de foie de souris (25 μ g) et un contrôle positif commercial ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Des anticorps spécifiques pour l'isoforme 2D6 humain et pour une protéine constitutive, la GAPDH, ont été utilisés. L'intensité des bandes protéiques est exprimée en unités normalisées densitométriques. * $p < 0,01$ par rapport aux souris témoins (CTL). Les données sont des moyennes \pm SEM, $n = 6$.

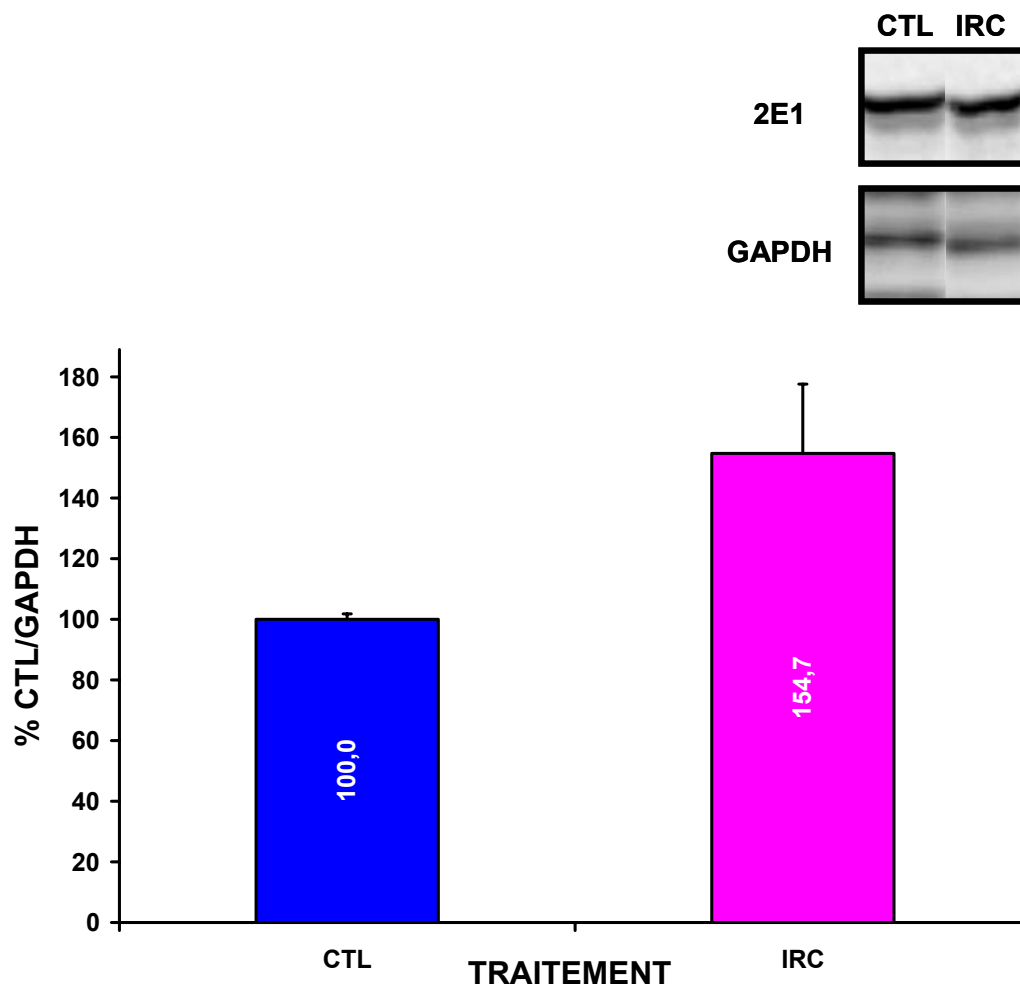


Figure 7 : Effet de l'insuffisance rénale chronique (IRC) sur l'expression protéique de l'isoforme 2E1 dans les microsomes de foie de souris. Un homogénat de microsomes de foie de souris (25 μ g) et un contrôle positif commercial ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Des anticorps spécifiques pour l'isoforme 2E1 de rat et pour une protéine constitutive, la GAPDH, ont été utilisés. L'intensité des bandes protéiques est exprimée en unités normalisées densitométriques. Les données sont des moyennes \pm SEM, n = 6.

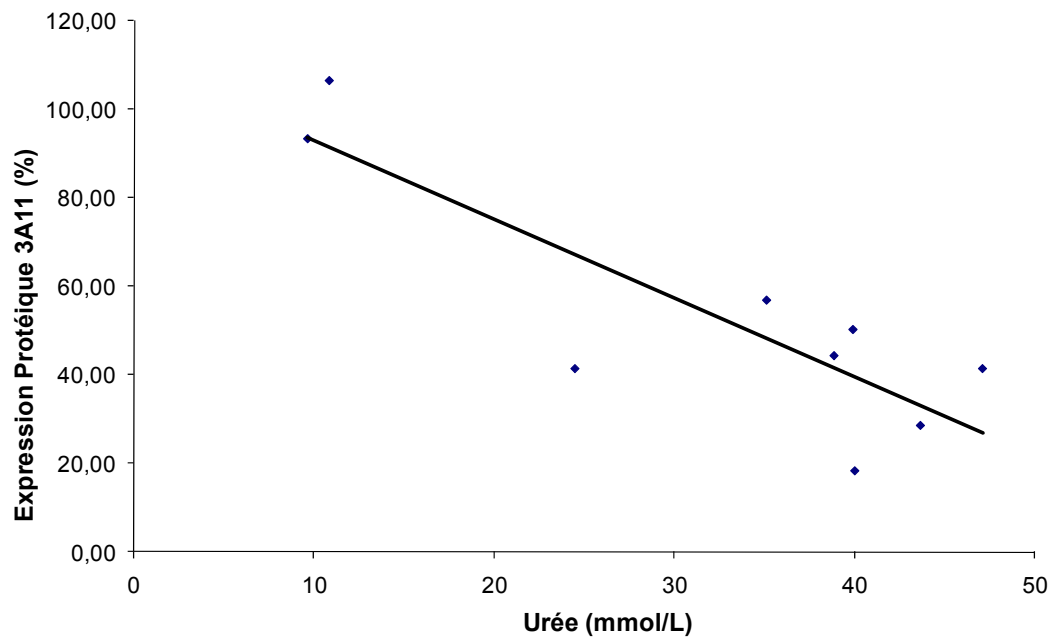


Figure 8 : Corrélation entre l'expression protéique du CYP3A11 et le niveau d'urée. $y = -1,7778x + 110,59$. $R^2 = 0,7349$

DISCUSSION

Modèle d'IRC chez la souris

Cette étude visait en premier temps à établir un modèle d'IRC chez la souris. Pour ce faire, nous avons testé trois modèles en se basant sur la concentration sérique de la créatinine et d'urée, la perte de poids, le volume urinaire et l'albuminurie. Cette étude démontre qu'il est effectivement possible de créer un modèle d'IRC par néphrectomie sub-totale chez la souris.

Les souris en IRC des modèles A, B et C ont une concentration plasmatique de créatinine plus élevée que celle des souris témoins et une clairance de créatinine diminuée. Malgré l'augmentation plasmatique de la créatinine chez les souris atteintes d'IRC, plusieurs auteurs utilisent aussi la concentration d'urée sanguine pour caractériser le niveau d'atteinte rénale chez cet animal. En fait, les concentrations sériques de créatinine, d'urée et de cystatine c sont augmentées dans les modèles de néphrectomies 5/6 chez la souris [49]. Mais les concentrations d'urée et cystatine c sont beaucoup plus élevées et s'élèvent plus tôt dans le développement de l'insuffisance rénale par rapport au groupe témoin suggérant que la créatinine n'est peut-être pas le meilleur marqueur à utiliser chez la souris. Le tableau XI résume les concentrations de créatinine sanguine selon le modèle d'insuffisance rénale et on remarque que les concentrations sont fortement augmentées en insuffisance rénale aiguë (IRA) par rapport aux modèles d'IRC. La créatinine pourrait donc être préconisée dans les modèles d'IRA et l'urée et autres biomarqueurs tels la cystatine c ou la N-GAL dans les modèles d'IRC.

Tableau XI : Comparaison des concentrations plasmatiques de créatinine selon le modèle d'induction d'IRC

Articles	Modèle d'IRC	Créatinine Plasmatique (mg/dL)			Méthode Dosage
		IRC	SHAM	CTL	
Gagnon et al. 1983	électro bilatérale	0,55 à 0,90	0,10 à 0,25	n/a	Jaffé
Gabizon et al. 1985	électro + Nx totale	Utilise BUN comme marqueur			n/a
Gagnon et al. 1988	électro + Nx totale	0,9 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	Jaffé
Kren et al. 1999	ligature + Nx totale	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	n/a	Jaffe
Yuen et al. 2004	*ligature + ponction caecale (IRA)	0,566 à 0,942	0,207 ± 0,012	0,223 ± 0,008	CLHP

* Miyaji et al. 2003 [50]

Nx : Néphrectomie

IRA : Insuffisance Rénale Aiguë

On observe une perte de poids importante chez les souris IRC par rapport aux souris témoins, même si les souris témoins recevaient la quantité moyenne de la nourriture ingérée par les souris IRC (*paired-fed*). Donc, la quantité de nourriture ingérée n'était pas le seul facteur dans la perte de poids plus grande des souris du groupe A (néphrectomie 5/6) et B (néphrectomie partielle électrocautère) par comparaison avec les souris témoins. Par contre, la restriction alimentaire imposée aux souris témoins explique leur perte de poids; elles ont mangé moins que voulu, mais elles ont soutenu les mêmes activités (taux métabolique inchangé). Il est important de noter que la néphrectomie elle-même (retrait de tissu rénal) peut affecter le poids de la souris [51]. Par contre, le poids moyen d'un rein de souris est de 0,2 g, donc ceci a peu d'effet sur le poids total de la souris. La perte de poids observée post-néphrectomie totale est généralement rétablie sept jours suivant l'opération [46, 52]. Cependant, on remarque que la croissance est retardée chez les souris IRC par rapport aux souris témoins [51]. Cette perturbation est probablement due aux effets des toxines urémiques sur le métabolisme.

Il a été également démontré que d'autres paramètres biochimiques sont modifiés en IRC, aussi on observe une hyperkaliémie, une hyperphosphatémie, une acidose, une anémie et une hyperparathyroïdie [52]. Ces changements de paramètres sanguins reflètent la pathologie humaine ce qui fait de la souris un modèle intéressant.

Un fait intéressant observé chez les souris IRC du groupe A de cette étude est que celles-ci sont polyuriques. Chez l'humain en IRC, le rein est confronté à la diminution du nombre de néphrons tentant de maintenir la fonction rénale. Cependant, ceci entraîne une perte de la faculté à concentrer les urines menant à la polyurie. Puisque l'IRC des souris est induite par chirurgies invasives qui enlèvent des unités fonctionnelles du rein (néphrons), le rein est incapable de concentrer l'urine. Donc, le modèle d'IRC par néphrectomie subtotala développé chez la souris mime la pathologie humaine au niveau de la polyurie.

Nous n'avons décelé aucune trace d'albuminurie (données non présentées) ce qui est une différence majeure avec la pathologie humaine. Des études ont démontré que le bagage génétique de la souris est un facteur important dans la susceptibilité au développement de la glomérulosclérose [53], de l'hypertension et de la protéinurie [54]. En fait, les souris de souche C57BL/6 telles qu'utilisées dans cette étude, pourraient être relativement résistantes aux perturbations rénales induites par la néphrectomie subtotala. Cette résistance serait conférée à des différences génétiques au niveau du chromosome 8 [54].

En considérant les données biochimiques, le modèle A semble induire une plus grande IRC que les modèles B et C, mais le taux de mortalité est très élevé. Le modèle B n'a engendré aucune mortalité mais l'IRC est moins sévère que dans le modèle A. Le modèle C a induit une IRC beaucoup moins sévère et la chirurgie est beaucoup plus facile à effectuer. Donc, le choix d'un modèle d'IRC chez la souris dépendra du

degré d'insuffisance rénale chronique recherché et de la technique favorisée, puisque les trois modèles développés d'IRC chez la souris fonctionnent. Nous avons décidé de retenir le modèle A de néphrectomie subtotale 5/6 puisque l'IRC était plus sévère que les autres modèles se traduisant principalement par une augmentation accrue de créatinine sérique et de l'urée. L'étude de l'IRC et ses complications se prête donc plus à notre modèle A. De plus, le modèle A ressemble au modèle d'IRC de rat utilisé dans notre laboratoire ce qui facilite la comparaison lors de l'évaluation de l'expression du P450.

Mise au point du dosage de créatinine murine par CLHP

Un des défis de cette étude était de mettre au point une technique efficace pour mesurer la créatinine chez la souris. En fait, la méthode conventionnelle utilisée chez le rat et l'humain, la méthode de Jaffé, présentait trois problèmes majeurs pour notre étude chez la souris. La méthode de Jaffé (acide picrique) présente un manque de spécificité ainsi qu'une faible reproductibilité. Également, les volumes nécessaires pour le dosage sont irréalistes pour un modèle murin.

L'interférence des chromagènes présents dans le sérum et le plasma lors du dosage de la créatinine par la méthode avec l'acide picrique est connue depuis plusieurs années [48]. Les méthodes alternatives développées à ce jour impliquent le CLHP ou l'ELISA et sont bien décrites pour la mesure de la créatinine dans des échantillons humains [55]. Toutefois, même les dosages de la créatinine par CLHP d'échantillons humains comportent certains problèmes d'interférence où une co-élution d'une ou de plusieurs protéines surestime les concentrations de créatinine. Il a été démontré que des médicaments couramment utilisés chez les greffés rénaux tels la cyclosporine A, la cefotaxime et la

prednisolone peuvent interférer avec la méthode de dosage par CLHP [56]. De ce fait, un ajustement des paramètres tels le débit, la concentration et le pH de la phase mobile permettent d'obtenir un tracé clair et mesurable. Johns *et al.* ont décrit une méthode par CLHP pour doser la créatinine sérique chez le singe utilisant seulement 50 μ l grâce à une colonne échangeuse d'ions [57]. Chez la souris, l'équipe de Dunn *et al.* a été la première à développer une méthode de dosage utilisant aussi peu que 25 μ l de plasma [58]. Leur étude montre que la méthode de Jaffé surestime les concentrations plasmatique et urinaire de créatinine respectivement de 300% et 10%.

Lors du développement du modèle chirurgical chez la souris dans notre laboratoire, il devenait essentiel d'utiliser une méthode de dosage précise, simple et reproductible. Le protocole tel que décrit dans l'article de Yuen *et al.* a été notre point de départ pour développer la méthode telle que décrite dans la section Matériels et Méthodes [48]. Outre la précision, l'avantage d'utiliser une méthode par CLHP pour détecter la créatinine chez la souris est bien sûr la petite quantité de sérum que demande la technique. Avec seulement 15 μ l de sérum, il est possible de doser en triplicata alors que la méthode de Jaffé demande un minimum 150 μ l de sérum pour doser en simplicata. Lors du sacrifice des souris par décapitation, nous récoltons environ 250-500 μ l de sang soit 100-200 μ l de sérum. La méthode de Jaffé nous oblige donc à diluer nos échantillons dans la plupart des cas résultant en des valeurs d'incertitudes augmentées. Comme présenté dans la section Résultats, l'extraction de la créatinine à partir du sérum engendre une perte de protéines ce qui sous-estime d'environ 25% le dosage de la créatinine. Afin d'optimiser la méthode de dosage, nous avons modifié plusieurs paramètres tels le débit, le pH et la concentration de la phase mobile ainsi que l'acidification des standards. Le protocole idéal serait donc une phase mobile d'acétate de sodium à 10 mM à pH 4,5 ainsi qu'un débit d'élution de 1,5ml/min.

Nos souris néphrectomisées présentent une créatinine sérique de 2 à 3 fois plus élevée que les souris témoins (tableau X). Yuen *et al.* ont démontré que les souris atteintes d'IRA avaient une créatinine sérique accrue de 2.5 fois [48]. La méthode par CLHP est donc précise et exacte et constitue un outil essentiel dans la caractérisation d'un modèle d'insuffisance rénale.

Comme mentionné précédemment, le dosage de l'urée sérique est un autre marqueur utilisé pour caractériser l'atteinte rénale. Le dosage de l'urée chez les souris ayant subi une néphrectomie subtotala (5/6) a démontré des niveaux accrus de plus de 300%, suggérant qu'il s'agit également d'un marqueur intéressant lors d'un développement d'un modèle d'IRC (tableau VIII). De plus, le dosage de l'urée sérique est très rapide puisqu'il fait partie de la routine de tout laboratoire de biochimie. Encore une fois, la faiblesse est dans la quantité de sérum qu'utilise l'appareil de dosage soit sensiblement la même que le dosage de biochimie. De ce fait, la créatinine reste donc le marqueur le plus intéressant chez la souris, mais l'urée est un bon indice permettant de confirmer nos résultats lorsque les volumes sanguins nous le permettent.

Évaluation de l'expression protéique du P450 en IRC chez la souris

Les études antérieures ont démontré que plusieurs isoformes du CYP450 étaient modulées au niveau du foie chez le rat en IRC [34, 59]. Les travaux présents démontrent que l'expression protéique des isoformes CYP3A11, 1A et 2D est diminuée au niveau hépatique chez la souris en IRC.

Chez le rat en IRC, une diminution de 65% de l'isoforme 3A dans le foie a déjà été démontrée [34]. Chez la souris, cette diminution est de 60%. Tel que mentionné auparavant, l'isoforme 3A est le plus important en terme d'activité puisqu'elle biotransforme la majorité des médicaments présentement sur le marché [60]. L'isoforme 3A11 chez la souris a 76% d'homologie avec le CYP 3A4 humain.

Pour l'isoforme 1A, les études avec des foies de rat en IRC n'avaient décelé aucun changement significatif [34]. Par contre, chez les souris en IRC, cette étude démontre une diminution significative de 37,4% de l'expression protéique de l'isoforme 1A. Cette divergence entre le rat et la souris quant à la modulation du CYP1A au niveau hépatique en IRC reflète les différences entre espèces comme entre le rat et l'humain. La famille des CYP450 est reconnue pour être conservée d'une espèce à l'autre puisqu'elle dérive d'un seul gène ancestral il y a plus de 3,6 milliards d'années [61]. Par contre, il y a des différences au niveau des séquences d'acides aminés résultant en de grandes différences au niveau de la spécificité pour un substrat ou au niveau de l'activité catalytique de l'enzyme [60]. Ceci dit, l'isoforme 1A autant chez l'humain, le rat et la souris n'est pas fortement exprimé dans foie et n'est pas impliquée dans le métabolisme de plusieurs médicaments mais plutôt dans le métabolisme des carcinogènes [60]. Donc, cette diminution au niveau hépatique chez la souris atteinte d'IRC risque d'avoir peu d'impact clinique comme tel.

Pour l'isoforme 2D, il y a une diminution de l'expression protéique dans les foies de souris en IRC de 41,7%. Les études chez le rat décelaient une diminution, mais non significative [34]. L'isoforme 2D présente le plus de polymorphisme. Pour cette raison, beaucoup d'études ont été faites chez l'humain et on peut classifier la population selon leur niveau d'activité : métaboliseurs lents, intermédiaires, extensifs ou ultra rapides

[60]. Puisque que celle-ci est très polymorphique et qu'il existe des évidences de différences au niveau des profils d'inhibition entre les espèces, les résultats obtenus chez la souris souffrante d'IRC confirment ces données.

En raison de la très grande homologie entre les isoformes de la famille 2C, les anticorps disponibles ne reconnaissent pas une isoforme en particulier. Donc les données quant à l'isoforme 2C sont peu concluantes et le développement d'un anticorps spécifique permettra de mieux connaître l'effet de l'IRC sur l'expression protéique de la famille 2C. Des études subséquentes devront être réalisées afin de confirmer la modulation observée sur les différentes isoformes chez la souris en IRC.

Il est à noter que cette étude reste exploratoire, mais nous sommes les premiers à démontrer une régulation à la baisse de l'expression protéique du 3A11, 2D et 1A dans un modèle murin d'IRC.

L'étape suivante du projet était donc de vérifier si la régulation à la baisse du CYP450 au niveau de l'expression protéique avait réellement un impact sur le métabolisme des médicaments. Mesurer l'activité des isoformes du P450 reste la façon la plus directe d'évaluer l'effet de l'IRC sur le P450. Il existe plusieurs façons de mesurer l'activité du CYP3A chez l'humain mais comme mentionné précédemment, la spécificité des substrats peut être différente entre espèces.

Chez le rat, on mesure l'activité du 3A2 à l'aide de la sonde fluorescente DFB (3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-diméthyl-4-[4-méthylsulfonylphényl]furan-2(5H)-one). Le DFB est métabolisé en DFH et on mesure ce produit par cytofluorimétrie afin d'évaluer l'activité du CYP3A2. Cette technique a été développée dans notre laboratoire suite à des essais sur des microsomes de rats [62]. Il a été démontré que cette sonde est spécifique aux isoformes CYP3A1-3A2 chez le rat. Il était donc logique d'essayer cette méthode pour mesurer l'activité du CYP3A11 chez la souris atteinte

d'IRC. Plusieurs essais ont été faits mais nous n'avons obtenu aucun résultat concluant, malgré maintes mises au point laissant croire que le DFB n'est pas un bon substrat chez la souris.

D'autres substrats plus connus sont utilisés *in vitro* pour mesurer l'activité du CYP3A principalement chez l'humain tels la testostérone et l'érythromycine. La testostérone étant un produit contrôlé, le protocole utilisant l'érythromycine était plus réaliste. L'ajout d'érythromycine dans des microsomes permet de mesurer l'activité de l'érythromycine N-déméthylase en quantifiant la production de formaldéhyde utilisant la réaction de NASH [63, 64]. Encore une fois, aucun résultat concluant n'a été obtenu malgré des ajustements de paramètres et de multiples essais.

L'utilisation du midazolam comme substrat est très favorisée dans l'industrie pharmaceutique puisqu'il est très spécifique à l'isoforme CYP3A. L'activité du CYP3A11 est mesurée en mesurant les métabolites α -midazolam et 4-OH-midazolam par CLHP suite à l'incubation de microsomes de souris avec du midazolam [65, 66]. L'obtention du midazolam et de ses métabolites (afin de produire une courbe d'étalonnage) est très difficile étant donné que la vente de ces produits est contrôlée au Canada. Suite à une invitation spéciale par la compagnie Merck Frosst pour un stage, je me suis rendue à leur laboratoire afin de mesurer l'activité du CYP3A11 dans les microsomes des souris atteintes d'IRC. Encore une fois, les niveaux d'activité mesurés étaient très faibles soit au dessous du plus petit standard. Nous nous sommes donc questionnés quant à la stabilité de nos échantillons de foie de souris. Les échantillons utilisés étaient à la fois des microsomes fraîchement extraits et des échantillons congelés à -80°C ce qui explique mal la théorie de la dégradation de nos échantillons. Peut-être que notre technique d'isolation de microsomes interfère avec le dosage. Il est évident qu'une mise au point sera nécessaire afin d'obtenir des valeurs détectables par CLHP.

Une autre façon de confirmer nos résultats de diminution de l'expression protéique du P450 en IRC serait d'évaluer l'expression génique. L'ARNm peut être quantifié par *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) utilisant des sondes liées à des marqueurs fluorescents spécifiques pour les différentes isoformes. Le design d'amorces et de sondes spécifiques pour chaque isoforme demeure une tâche difficile et requiert l'utilisation d'interface telle *Primer 3* [67]. Des études préliminaires ont permis de tester quelques amorces et sondes afin de déterminer leur capacité à quantifier l'ARNm dans des foies de souris témoins. Le protocole permet de doser de l'ARNm au niveau hépatique chez la souris.

Facteurs Sériques

Notre laboratoire a démontré que l'expression protéique et génique du CYP450 dans les hépatocytes de rat, lorsqu'incubés 24 heures avec le sérum de patients atteints d'IRC, est diminuée en moyenne de 45% pour les isoformes CYP1A2, 2C6, 2C11, 2D1/2, 3A2 et 4A1/3 [35]. Également, l'activité enzymatique des CYP3A et CYP1A est diminuée respectivement de 51% et 59%. Aussi, l'effet inhibiteur du sérum IRC était présent même chez les patients ayant débuté la dialyse. Par contre, le remplacement de la fonction rénale par la transplantation rénale chez ces patients a freiné l'effet inhibiteur de leur sérum, suggérant fortement que des médiateurs sériques sont responsables de la régulation à la baisse du P450 en IRC [35]. Des études mesurant l'activité hépatique du CYP3A4 pré- et post-hémodialyse chez l'humain à l'aide de *Breath Tests* ont démontré que l'amélioration de l'activité du CYP3A4 post-hémodialyse était possible, et ce grâce à l'élimination de médiateurs urémiques dans le dialysat [68]. Notre laboratoire a montré que l'expression protéique et génique du CYP3A4 était normale (complètement au niveau protéique et partiellement

au niveau génique) dans les hépatocytes incubés avec du sérum de patient post-hémodialyse [69]. Par contre, l'arrêt de l'effet inhibiteur est temporaire puisque les niveaux d'expression redeviennent bas dès la prochaine session d'hémodialyse du patient alors que la transplantation rénale corrige l'effet inhibiteur [69].

De ce fait, notre laboratoire s'est intéressé aux facteurs sériques potentiellement impliqués dans la régulation du CYP450. Nos études démontrent que la fraction du sérum inhibiteur contient des protéines de poids moléculaire entre 10 et 15 kDa suggérant que les cytokines et la PTH pourraient être les médiateurs responsables de la modulation de l'expression et de l'activité du CYP450 en IRC [35].

Reproduire de telles études chez la souris est difficile dans la mesure où les volumes de sérum ne permettent pas les études *in vitro* d'incubation avec des hépatocytes. Donc, il était impossible de confirmer ces résultats chez la souris *in vitro*.

Notre laboratoire a ensuite démontré que la PTH était un médiateur sérique majeur responsable de la diminution du CYP450 dans le foie. Le sérum de rat souffrant d'IRC déplété en PTH à l'aide d'un anticorps anti-PTH, ainsi que le sérum de rat ayant subi une parathyroïdectomie (PTX), perdent tous deux leur capacité d'inhiber le CYP450 dans les hépatocytes de rat en culture [70]. La PTH est reconnue étant capable de diminuer l'ARNm de nombreuses protéines hépatiques, mais également celles d'autres tissus. Par exemple, l'activité, la production et la libération de la lipase hépatique sont altérées en présence hyperparathyroïdie secondaire chez les rats atteints d'IRC [71]. L'activité du transporteur Na^+/H^+ échangeur de cations est elle aussi modifiée au niveau du foie et du rein chez le rat souffrant d'IRC [72]. L'activité de la *nitric oxide synthase* (NOS) est aussi diminuée en IRC dans un modèle d'IRC chez le rat ainsi que l'expression protéique de eNOS et iNOS [73]. Le meilleur modèle pour

étudier le rôle de la PTH serait donc un modèle transgénique. Il existe un modèle de souris mutantes pour la PTH développé par l'équipe du Dr. Goldman à l'Université de McGill qui nous permettrait de confirmer nos hypothèses [74].

Ces observations nous permettent d'émettre l'hypothèse que le traitement de l'hyperparathyroïdie secondaire chez le patient pourrait améliorer l'activité des isoformes impliquées dans le métabolisme de la majorité des médicaments comme le CYP3A4 et le CYP2C9. La normalisation de concentration de la PTH pourrait alors réduire la toxicité associée aux accumulations de médicaments dans le sang. Les calcimimétiques tels le cinacalcet sont utilisés afin d'augmenter l'affinité du calcium au *calcium sensing receptor* (CaSR) ce qui mène à une réduction plasmatique de la PTH, du calcium et du phosphate. On devrait s'attendre à une normalisation de la fraction du CYP450 chez les patients atteints d'IRC à qui on administre du cinacalcet. Il serait également possible de vérifier cette théorie en administrant du cinacalcet à des rats et des souris atteints d'IRC et d'évaluer l'expression protéique et génique ainsi que l'activité des P450.

Comme mentionné précédemment, l'IRC est un état inflammatoire constant où il y a une accumulation de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-6, le TNF- α et l'IL-1 β . Tout récemment, une étude a démontré que le facteur de transcription NF-kappaB (NF- κ B) était impliqué dans la régulation du CYP450 [75]. En fait, les médiateurs de l'inflammation et du stress oxydatif conduisent à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Leur étude précise que le NF- κ B peut se lie au promoteur des gènes du P450 et réguler l'expression de ceux-ci. Également, il peut réguler la transcription en réprimant les récepteurs nucléaires du CYP450 dont CAR et PXR. Aussi, NF- κ B peut réguler l'activité post-transcriptionnelle du CYP450 en induisant l'hème oxygénase [75]. Donc, la diminution de

l'expression du CYP450 dans notre modèle murin d'IRC pourrait être expliquée en partie par le rôle du NF- κ B, gardant en tête que l'IRC est une pathologie avec un volet inflammatoire.

Les cytokines IL-6, TNF- α et IL-1 β sont les plus importants médiateurs de la synthèse protéique en inflammation et il a été démontré qu'elles diminuent l'expression des isoformes du CYP450 dans les cultures d'hépatocytes ainsi que *in vivo*. Cette diminution de l'activité et de l'expression des isoformes du CYP450 peut mener à des réactions indésirables si ces isoformes sont impliquées dans le métabolisme des médicaments [76]. En fait, les médicaments à index thérapeutique étroit pourraient s'accumuler causant de la toxicité si la diminution de l'activité des enzymes est importante [76]. Un groupe a montré que l'expression protéique et génique ainsi que l'activité du CYP3A11 hépatique étaient diminués de façon significative dans un modèle de souris souffrant d'arthrite rhumatoïde. L'injection d'un anticorps anti-IL-6 renverse la diminution du CYP450 suggérant que l'inflammation module le CYP450 à un certain niveau [77]. Par contre, d'autres isoformes peuvent être induites lors de l'inflammation réaffirmant le fait que la régulation est différente selon l'isoforme, la pathologie et la sévérité de l'inflammation [78]. De plus, tel que mentionné plus haut, les stimuli inflammatoires peuvent antagoniser l'action du PXR via la liaison de la sous-unité p65 du NK- κ B au RXR [79].

Est-il possible que la diminution du CYP450 ait un rôle physiologique? Une hypothèse expliquant la modulation à la baisse du CYP450 lors d'un état inflammatoire, donc possiblement en IRC, est que ces enzymes sont diminuées afin de réduire le stress oxydatif [80]. D'autres ont démontré que certaines isoformes responsables de la formation de molécules anti-inflammatoires ou vasodilatatrices [81] sont réduites lors de l'inflammation de façon à permettre l'exécution de la réponse inflammatoire initiale [82].

De ce fait, l'état inflammatoire en IRC pourrait expliquer en partie les résultats obtenus dans cette étude et celles précédentes quant à la diminution de certaines isoformes du CYP450 hépatique. Par contre, d'autres facteurs sériques comme la PTH jouent un rôle certain dans la modulation du CYP450 en IRC.

CONCLUSION

À la lumière des résultats obtenus dans cette étude, la souris semble être un bon modèle pour étudier l'IRC et ses répercussions sur la biotransformation des médicaments. D'un point de vue chirurgical, la technique d'induction d'IRC est relativement facile à réaliser spécialement dans un laboratoire où le modèle de rat est établi depuis plusieurs années. Par contre, la minutie est de mise et il faut allouer du temps au « chirurgien » pour parfaire la technique. Le développement du modèle a pris plusieurs mois au sein de notre laboratoire malgré l'expérience acquise chez le rat. Également, les souris sont plus fragiles que le rat quant à la portion de tissu rénal enlevé et des différences de quelques millimètres lors de la néphrectomie subtotale affectent la sévérité de l'IRC grandement, phénomène qui n'est pas observé chez le rat.

Pour ce qui est des biomarqueurs, malgré la faible masse musculaire d'une souris, la créatinine semble être assez précise pour déceler un niveau d'IRC comparativement à une souris témoin. De plus, la méthode par CLHP mise au point dans notre laboratoire permet de contrer les surestimations du dosage de la créatinine par la méthode de Jaffé telle qu'utilisée en clinique chez l'homme. Aussi, les quantités de sérum requises pour le dosage par CHLP sont beaucoup plus réalistes dans un modèle murin étant donné leur faible volume sanguin. Par contre, la méthode de dosage par CLHP est très longue et ne permet pas d'avoir des résultats rapidement. Si on considère utiliser un modèle murin d'IRC, il est important de considérer tous ces aspects. Dans les autres cas, le modèle murin était justifié afin de vérifier la modulation du cytochrome P450 par l'IRC pour confirmer nos résultats obtenus chez le rat. Le modèle d'IRC du rat peut être favorisé dans certains cas puisqu'il est bien établi et les techniques de dosages des marqueurs d'IRC sont faciles et rapides.

Nous avons démontré une réduction de l'expression des protéines des isoformes 3A11, 2D et 1A ce qui confirme notre hypothèse initiale. L'étape suivante sera d'aller mesurer l'expression génique en utilisant des sondes spécifiques pour chaque isoforme. Ensuite, afin de déterminer si la diminution du CYP450 a vraiment des répercussions cliniques, il faudrait mettre au point la méthode de dosage de l'activité enzymatique du 3A11 hépatique. Bien sûr, l'évaluation de l'expression du CYP450 extra-hépatique soit au niveau intestinal ou rénal serait intéressante afin de corroborer nos résultats obtenus chez le rat.

L'avantage ultime d'utiliser un modèle de souris versus le modèle de rat est évidemment la possibilité d'utiliser des souris transgéniques. Il existe un modèle de souris mutantes pour la PTH viable, qui pourrait être très utile dans notre laboratoire afin de valider le rôle de la PTH dans la diminution du CYP450 [74]. Il existe également des modèles de souris mutantes pour plusieurs cytokines dont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α [83-85].

Nous pouvons confirmer notre hypothèse que le cytochrome P450 chez la souris est modulé de façon similaire au rat en IRC. Le développement d'un modèle d'IRC par néphrectomie subtotale (5/6) chez la souris est possible et mime la pathologie humaine à plusieurs niveaux comme l'augmentation de la créatinine sérique et la diminution de la clairance rénale, la perte de poids et la polyurie. Le dosage de la créatinine par CLHP reste la méthode la plus précise et exacte dans le sérum murin.

Références

1. CIHI, *Treatment of end-stage renal disease care in Canada*. 2005: Ottawa.
2. Manns, B.J., D.C. Mendelssohn, and K.J. Taub, *The economics of end-stage renal disease care in Canada: incentives and impact on delivery of care*. *Int J Health Care Finance Econ*, 2007. **7**(2-3): p. 149-69.
3. Levin, A., Hemmelgarn, B., Culeton, B., Tobe S., McFarlane P., Ruzicka M., Burns K., Manns B., White C., Madore F., Moist L., Klarenbach S., Barrett B., Foley R., Jindal K., Senior P., Pannu N., Shurraw S., Akbari A., Cohn A., Reslerova M., Deved V., Mendelssohn D., Nesrallah G., Kappel J. and Tonelli M., *Guidelines for the management of chronic kidney disease*. *CMAJ*, 2008. **179**(11): p. 1154-62.
4. Silver, J. and R. Levi, *Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease*. *Kidney Int Suppl*, 2005(95): p. S8-12.
5. Katzung, B.G., ed. *Basic and Clinical Pharmacology*. 8th ed. 2000, Appleton and Lange. 1217.
6. Hardwick, J.P., *Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **75**(12): p. 2263-75.
7. Archakov, A.I. and K.N. Degtyarenko, *Structural classification of the P450 superfamily based on consensus sequence comparison*. *Biochem Mol Biol Int*, 1993. **31**(6): p. 1071-80.
8. Shimada, T., et al., *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(1): p. 414-23.
9. Kramer, S.D. and B. Testa, *The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 6. Inter-individual factors affecting drug metabolism*. *Chem Biodivers*, 2008. **5**(12): p. 2465-578.
10. Nolin, T.D., R.F. Frye, and G.R. Matzke, *Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease*. *Am J Kidney Dis*, 2003. **42**(5): p. 906-25.
11. Dreisbach, A.W. and J.J. Lertora, *The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008. **4**(8): p. 1065-74.
12. Veau, C., et al., *Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion*. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. **16**(8): p. 1607-14.
13. Naud, J., et al., *Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **320**(3): p. 978-85.
14. Vormfelde, S.V., et al., *Pharmacokinetics of cerivastatin in renal impairment are predicted by low serum albumin concentration rather than by low creatinine clearance*. *J Clin Pharmacol*, 1999. **39**(2): p. 147-54.
15. Kanfer, A., et al., *Changes in erythromycin pharmacokinetics induced by renal failure*. *Clin Nephrol*, 1987. **27**(3): p. 147-50.

16. Marbury, T.C., et al., *Pharmacokinetics of repaglinide in subjects with renal impairment*. Clin Pharmacol Ther, 2000. **67**(1): p. 7-15.
17. Shi, J., et al., *Pharmacokinetics and safety of the ketolide telithromycin in patients with renal impairment*. J Clin Pharmacol, 2004. **44**(3): p. 234-44.
18. Matzke, G.R. and R.F. Frye, *Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity*. Drug Saf, 1997. **16**(3): p. 205-31.
19. Pichette, V.a.L., FA., *Metabolism of drugs in chronic renal failure*. Recent Res. Devel. Drug Metabol. Disposition, 2002. **1**: p. 43-56.
20. Talbert, R.L., *Drug dosing in renal insufficiency*. J Clin Pharmacol, 1994. **34**(2): p. 99-110.
21. Touchette, M.A. and R.L. Slaughter, *The effect of renal failure on hepatic drug clearance*. DICP, 1991. **25**(11): p. 1214-24.
22. Kevorkian, J.P., et al., *Assessment of individual CYP2D6 activity in extensive metabolizers with renal failure: comparison of sparteine and dextromethorphan*. Clin Pharmacol Ther, 1996. **59**(5): p. 583-92.
23. Matzke, G.R., et al., *The effect of renal insufficiency and hemodialysis on the pharmacokinetics of nalmefene*. J Clin Pharmacol, 1996. **36**(2): p. 144-51.
24. Dreisbach, A.W., et al., *Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(5): p. 475-7.
25. Dowling, T.C., et al., *Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(5): p. 427-34.
26. Singlas, E., et al., *Zidovudine disposition in patients with severe renal impairment: influence of hemodialysis*. Clin Pharmacol Ther, 1989. **46**(2): p. 190-7.
27. Kim, Y.G., et al., *Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure*. Clin Pharmacol Ther, 1993. **54**(6): p. 612-20.
28. Hayslett, J.P., M. Kashgarian, and F.H. Epstein, *Mechanism of change in the excretion of sodium per nephron when renal mass is reduced*. J Clin Invest, 1969. **48**(6): p. 1002-6.
29. Leber, H.W. and G. Schutterle, *Oxidative drug metabolism in liver microsomes from uremic rats*. Kidney Int, 1972. **2**(3): p. 152-8.
30. Van Peer, A.P. and F.M. Belpaire, *Hepatic oxidative drug metabolism in rats with experimental renal failure*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977. **228**(2): p. 180-3.
31. Leber, H.W., L. Gleumes, and G. Schutterle, *Enzyme induction in the uremic liver*. Kidney Int Suppl, 1978(8): p. S43-8.
32. Patterson, S.E. and V.H. Cohn, *Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure*. Biochem Pharmacol, 1984. **33**(5): p. 711-6.
33. Uchida, N., et al., *Changes of hepatic microsomal oxidative drug metabolizing enzymes in chronic renal failure (CRF) rats by partial nephrectomy*. Jpn J Pharmacol, 1995. **68**(4): p. 431-9.
34. Leblond, F., et al., *Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(2): p. 326-32.
35. Michaud, J., et al., *Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(8): p. 1067-77.

36. Bro, S., et al., *Chronic renal failure accelerates atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2466-74.
37. Gabizon, D., et al., *Induction of chronic renal failure in the mouse: a new model*. Nephron, 1985. **40**(3): p. 349-52.
38. Gagnon, R.F. and W.P. Duguid, *A reproducible model for chronic renal failure in the mouse*. Urol Res, 1983. **11**(1): p. 11-4.
39. Kren, S. and T.H. Hostetter, *The course of the remnant kidney model in mice*. Kidney Int, 1999. **56**(1): p. 333-7.
40. Delanaye, P., et al., *[Cystatin C in the evaluation of renal function]*. Nephrologie, 2003. **24**(8): p. 457-68.
41. Cockcroft, D.W. and M.H. Gault, *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron, 1976. **16**(1): p. 31-41.
42. Levey, A.S., et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group*. Ann Intern Med, 1999. **130**(6): p. 461-70.
43. van Acker, B.A., et al., *Creatinine clearance during cimetidine administration for measurement of glomerular filtration rate*. Lancet, 1992. **340**(8831): p. 1326-9.
44. Hottelart, C., et al., *[Fenofibrate increases blood creatinine, but does not change the glomerular filtration rate in patients with mild renal insufficiency]*. Nephrologie, 1999. **20**(1): p. 41-4.
45. National Kidney, F., *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2 Suppl 1): p. S1-266.
46. Nickolas, T.L., J. Barasch, and P. Devarajan, *Biomarkers in acute and chronic kidney disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2008. **17**(2): p. 127-32.
47. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
48. Yuen, P.S., et al., *A simplified method for HPLC determination of creatinine in mouse serum*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(6): p. F1116-9.
49. Song, S., et al., *Serum cystatin C in mouse models: a reliable and precise marker for renal function and superior to serum creatinine*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(4): p. 1157-61.
50. Miyaji, T., et al., *Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice*. Kidney Int, 2003. **64**(5): p. 1620-31.
51. Gagnon, R.F. and M. Ansari, *Development and progression of uremic changes in the mouse with surgically induced renal failure*. Nephron, 1990. **54**(1): p. 70-6.
52. Gagnon, R.F. and B. Gallimore, *Characterization of a mouse model of chronic uremia*. Urol Res, 1988. **16**(2): p. 119-26.
53. Ma, L.J. and A.B. Fogo, *Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 350-5.
54. Salzler, H.R., et al., *Hypertension and albuminuria in chronic kidney disease mapped to a mouse chromosome 11 locus*. Kidney Int, 2007. **72**(10): p. 1226-32.
55. Huang, S.M. and Y.C. Huang, *Chromatography and electrophoresis of creatinine and other guanidino compounds*. J Chromatogr, 1988. **429**: p. 235-53.
56. Ginman, R.F. and J.S. Colliss, *Modified liquid-chromatographic method for creatinine determinations*. Clin Chem, 1985. **31**(2): p. 331-2.

57. Johns, B.A., et al., *Simple high-performance liquid chromatographic method to analyze serum creatinine has several advantages over the Jaffe picric acid reaction as demonstrated with a cimetidine dose response in rhesus monkeys*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. **759**(2): p. 343-8.
58. Dunn, S.R., et al., *Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice*. Kidney Int, 2004. **65**(5): p. 1959-67.
59. Leblond, F.A., et al., *Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure*. Drug Metab Dispos, 2000. **28**(11): p. 1317-20.
60. Martignoni, M., G.M. Groothuis, and R. de Kanter, *Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2006. **2**(6): p. 875-94.
61. Lin, J.H., *Species similarities and differences in pharmacokinetics*. Drug Metab Dispos, 1995. **23**(10): p. 1008-21.
62. Michaud, J., et al., *Use of a fluorescent substrate for the selective quantification of rat CYP3A in the liver and the intestine*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007. **55**(2): p. 209-13.
63. Wang, R.W., et al., *Human cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 beta-hydroxylation and erythromycin N-demethylation. Competition during catalysis*. Drug Metab Dispos, 1997. **25**(4): p. 502-7.
64. Nash, T., *The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction*. Biochem J, 1953. **55**(3): p. 416-21.
65. Perloff, M.D., et al., *Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: relative contribution of CYP3A and CYP2C isoforms*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(2): p. 618-28.
66. Perloff, M.D., L.L. Von Moltke, and D.J. Greenblatt, *Differential metabolism of midazolam in mouse liver and intestine microsomes: a comparison of cytochrome P450 activity and expression*. Xenobiotica, 2003. **33**(4): p. 365-77.
67. Rozen S, S.H. *Primer3*. 2000; Available from: <http://primer3.sourceforge.net/>.
68. Nolin, T.D., et al., *Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2363-7.
69. Michaud, J., et al., *Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression*. J Pharmacol Sci, 2008. **108**(2): p. 157-63.
70. Michaud, J., et al., *Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(11): p. 3041-8.
71. Klin, M., et al., *Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone*. J Clin Invest, 1996. **97**(10): p. 2167-73.
72. Michnowska, M., M. Smogorzewski, and S.G. Massry, *Impaired Na(+)-H+ exchanger activity of hepatocytes in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(6): p. 929-34.
73. Vaziri, N.D., et al., *Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 2): p. F642-9.
74. Miao, D., et al., *Skeletal abnormalities in Pth-null mice are influenced by dietary calcium*. Endocrinology, 2004. **145**(4): p. 2046-53.
75. Zordoky, B.N. and A.O. El-Kadi, *Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome p450 enzymes*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(2): p. 164-78.

76. Morgan, E.T., *Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome p450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(4): p. 434-8.
77. Ashino, T., et al., *Effect of interleukin-6 neutralization on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expressions in arthritic mouse liver*. Eur J Pharmacol, 2007. **558**(1-3): p. 199-207.
78. Chaluvadi, M.R., et al., *Regulation of hepatic cytochrome P450 expression in mice with intestinal or systemic infections of citrobacter rodentium*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(2): p. 366-74.
79. Gu, X., et al., *Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 17882-9.
80. Balk, R.A., *Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock*. Crit Care Clin, 2000. **16**(2): p. 337-52, vii.
81. Fleming, I., *Cytochrome p450 and vascular homeostasis*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 753-62.
82. Aitken, A.E., T.A. Richardson, and E.T. Morgan, *Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 123-49.
83. Horai, R., et al., *Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion*. J Exp Med, 1998. **187**(9): p. 1463-75.
84. Graciano, A.L., et al., *Targeted disruption of ICAM-1, P-selectin genes improves cardiac function and survival in TNF-alpha transgenic mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(4): p. H1464-71.
85. Boe, A., et al., *Interleukin 6 knock-out mice are resistant to antigen-induced experimental arthritis*. Cytokine, 1999. **11**(12): p. 1057-64.