

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Effet de l'insuffisance rénale chronique sur les enzymes de phase II

Par

Émilie Simard

Département de pharmacologie
Faculté de médecine
Université de Montréal

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Mai 2008



© Émilie Simard, Université de Montréal

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet de l'insuffisance rénale chronique sur les enzymes de phase II

Présenté par :

Émilie Simard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Patrick DuSouich

Président-rapporteur

Dr. Vincent Pichette

Directeur de recherche

Dr. Pierre Beaulieu

Membres du jury

Résumé en français

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est associée à une diminution du métabolisme des médicaments. Plusieurs études ont démontré que la maladie provoque une diminution de l'expression des enzymes du cytochrome P450 (CYP450) intestinale et hépatique. Cependant, peu d'études ont évalué l'effet de l'IRC sur les N-acétyltransférases 1 et 2 (NAT1 et NAT2). Le but de cette étude était de déterminer les répercussions de l'IRC sur l'acétylation hépatique et les mécanismes d'action impliqués. Les rats ont subi soit une laparotomie, une néphrectomie 5/6 (IRC), une parathyroïdectomie (PTX) ou une néphrectomie et une parathyroïdectomie. Les niveaux protéiques et géniques des NATs et l'activité de NAT2 ont été mesurés dans le foie et dans des hépatocytes en culture. L'expression protéique et génique de chacune des isoformes a diminuée de plus de 30% dans le foie des rats néphrectomisés par rapport aux rats témoins ($p < 0.01$), alors que l'activité de NAT2 était diminuée de 50% ($p < 0.001$). Dans les hépatocytes, l'incubation avec le sérum de rats néphrectomisés a induit une diminution de l'expression protéique et génique des NATs de 40% ($p < 0.005$) et 30% ($p < 0.01$) respectivement, suggérant l'implication d'un facteur sérique. L'ajout d'hormone parathyroïdienne (PTH) aux milieux de culture contrôlé induisait une diminution des niveaux protéiques et géniques de NAT2. Chez les rats parathyroïdectomisés et néphrectomisés, l'expression des NATs était similaire aux rats témoins. En conclusion, la diminution de l'acétylation chez le rat en IRC serait causée par une diminution de l'expression des NATs suite à une réduction de l'expression génique. La PTH semble être impliquée dans cette régulation.

Mots-clés : Acétylation, CYP450, glucuronidation, IRC, N-acétyltransférase, NF-kB parathormone.

Résumé en anglais

Chronic renal failure (CRF) is associated with a decrease in drug metabolism, particularly those mediated by the cytochrome P450. Indeed, many studies have shown a reduction in liver and intestinal P450 isoforms in CRF. However no one had evaluated the effects of CRF on N-acetyltransferase (NAT) even though several drugs cleared by acetylation accumulate in CRF. The present study describes the consequences of CRF on liver acetylation and defines the mechanism of its down-regulation. Four groups of rats were studied: control, CRF rats, parathyroidectomized (PTX), and CRF-PTX. NAT1 and NAT2 protein expressions, mRNA levels, and their metabolic activity were assessed. The effects of CRF serum on NATs expression and activities were also evaluated in hepatocytes. Compared to control, liver protein and gene expressions of Nat1 and Nat2 were reduced by more than 30%, ($p < 0.01$) in CRF rats. Nat2 activity was reduced by 50% ($p < 0.001$) in CRF rats. Incubation of hepatocytes with CRF serum induced a decrease of 40% ($p < 0.005$) and 30% ($p < 0.01$) in NATs protein and gene expression respectively, suggesting that a circulating factor is responsible for this decrease. The down-regulation of NAT expression and activity in CRF rats was not observed when they were parathyroidectomized. Adding parathyroid hormone (10^{-9} M) to cultured hepatocytes induced a decrease in NAT2 protein and gene expressions. In conclusion, liver acetylation of drugs in a rat model of CRF is reduced by a down-regulation of NAT1 and NAT2 isoforms, secondary to a decreased gene expression. Parathyroid hormone appears to be an important mediator implicated in this phenomenon.

Key words : Acetylation, CRF, CYP450, glucuronidation, n-acetyltransferase, NF-kB, parathormone.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX	I
LISTE DES FIGURES	II
SIGLES ET ABRÉVIATIONS	III
INTRODUCTION - LE REIN	1
MORPHOLOGIE	1
PHYSIOLOGIE	2
RÔLES	3
IMPORTANCE DANS L'ÉLIMINATION DES MÉDICAMENTS	3
<i>Filtration glomérulaire</i>	3
<i>Sécrétion tubulaire</i>	4
<i>Réabsorption tubulaire</i>	5
INSUFFISANCE RÉNALE	6
INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE	7
<i>Symptômes</i>	8
<i>Complications</i>	9
Complications cardiovasculaires	9
Hypertension artérielle (HTA)	9
Anémie	10
Hyperparathyroïdie secondaire	10
Rôle de la parathormone	10
Physiopathologie de l'hyperparathyroïdie secondaire	11
Voie de signalisation de la PTH	14
Ostéodystrophie rénale	14
L'ostéomalacie	14
L'os adynamique	15
L'ostéite fibreuse	15
LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS	15
ADMINISTRATION	15
ABSORPTION	15
<i>Absorption intestinale</i>	16
<i>Effet de premier passage hépatique</i>	16
<i>Biodisponibilité</i>	16
DISTRIBUTION	17
BIOTRANSFORMATION DES MÉDICAMENTS	17
<i>Les enzymes de phase I</i>	18
Isoformes	19
<i>Les enzymes de phase II</i>	20
Méthylation	22
Conjugaison par les acides aminés et le glutathion	23
Sulfonation	25
Glucuronidation	27
Famille UGT1A	30
Syndrome de Crigler-Najjar	31
Maladie de Gilbert	32
Famille UGT2B	32
Localisation des UDP-GTs	32
Principe de la réaction de glucuronidation	33
Acétylation	34

LES EFFETS DE L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE SUR LA BIOTRANSFORMATION DES MÉDICAMENTS	37
ABSORPTION ET DISTRIBUTION	38
ENZYMES DE PHASE I	39
ENZYMES DE PHASE II	41
DOWN-REGULATION OF HEPATIC DRUG ACETYLATION IN CHRONIC RENAL FAILURE.....	44
ABSTRACT.....	45
INTRODUCTION.....	46
RESULTS	47
DISCUSSION	50
MATERIALS AND METHODS.....	53
ACKNOWLEDGMENTS.....	56
REFERENCES.....	57
FIGURES	62
DISCUSSION	72
CONCLUSION	83
RÉFÉRENCES.....	84

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux transporteurs impliqués dans le transport des médicaments.....	5
Tableau II : Les différents stades de l'insuffisance rénale chronique	8
Tableau III : Co-facteurs pour réactions de conjugaison	21
Tableau IV : Exemples de substrats conjugués par sulfonation.....	27
Tableau V : Isoformes de la famille UGT1A caractérisés chez l'humain	30

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie du rein	2
Figure 2 : Transporteurs présents au niveau des cellules du tubule proximal.	4
Figure 3 : a-) Activation de la vitamine D et b-) défaut d'activation de la vitamine D causé par l'IRC (diminution hydroxylation en 1 alpha) à l'origine d'une hypocalcémie et d'une hyperparathyroïdie secondaire.	12
Figure 4 : Schéma d'un récepteur sensible au calcium, retrouvé à la surface des cellules principales des glandes parathyroïdes, ainsi que ses différents agonistes.	13
Figure 5 : Réaction d'oxydation par le cytochrome P450.....	19
Figure 6 : Isoformes du P450	20
Figure 7 : Les différentes enzymes de phase II et leur importance.....	21
Figure 8 : Exemple de réactions de méthylation avec différents substrats	22
Figure 9 : Exemples de conjugaison par les acides aminés	24
Figure 10 : Réaction de conjugaison par le glutathion.....	25
Figure 11 : Réaction de conjugaison par sulfonation.....	26
Figure 12 : Exemples de substrats conjugués par glucuronidation	29
Figure 13 : Structure du gène de la famille UGT1A.....	31
Figure 14 : Réaction de conjugaison par glucuronidation	33
Figure 15 : Exemples de substrats pour NAT1 et NAT2	35
Figure 16 : Réaction d'acétylation (a) et réaction « ping-pong bibi » (b).....	36

Sigles et abréviations

ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ACoA : Acétyl coenzyme A

Oct : *Organic-cation transporter*

ADN : Acide désoxyribonucléique

AhR : *Aryl hydrocarbon receptor*

AMPc : Adénosine 5'-monophosphate cyclique

Oat : *Organic-anion transporter*

ABC : *ATP-Binding Cassette transporter*

AP-1 : *Activating protein 1*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASA : Acide p-aminosalicylique

BCRP : *Breast cancer resistance protein*

CaSR : récepteur sensible au calcium

CN-1 : Crigler-Najjar de type 1

CN-2 : Crigler-Najjar de type 2

CoA : Coenzyme A

CYP450 : Cytochrome P450

DMABP : 3,2'-diméthyl-4-aminobiphényl

DMT: *Divalent-metal ion transporter*

EPO : Érythropoïétine

GSH : Gluthation

GST : Gluthation-S-transférase

HPO₄²⁻ : Phosphate

HRE : *Hormone response element*

HTA: Hypertension artérielle

ICIS : Institut Canadien d'Information sur la Santé

IFN- γ : Interféron- γ

IGF-1 : *Insulin-like growth factor*

IL-1 : Interleukine-1

IL-6 : Interleukine-6

IRA: Insuffisance rénale aiguë

IRC: Insuffisance rénale chronique

kDa : Kilo Dalton

Mdr : *Multidrug resistant protein*

MFO : *Mixed function oxidases*

Mrp : *Multi-resistant drug protein*

MT : Méthyltransférase

NADPH : Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate

NAT : N-acétyltransférase

NF- κ B : *Nuclear factor κ B*

Nt: *Nucleotide transporter*

Oatp : *Organic-anion transporting polypeptide*

octn2 : *Organic cation transporter*

PABA : Acide para-aminobenzoïque

PAPS : 5'-phosphoadénosine-3'-phosphosulfate

PEP2 : *Peptide transporter 2*

PEPT: *Peptide transporter*

PKA : Protéine kinase A

PTH : Parathormone

PTX : Parathyroïdectomie

RXR : *Retinoic acid receptor*

PXR : *Pregnane X receptor*

SAM : S-adénosyl-L-méthionine

SMZ : Sulphaméthazine

STIR : Stade terminal d'insuffisance rénale

TFG : Taux de filtration glomérulaire

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

UDPGA : Acide UDP-glucuronique

UDP-GT : Uridine-diphosphate glucuronosyltransférase

UGT : Uridine diphosphate glucuronosyltransférase

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

XRE : *Xenobiotic response element*

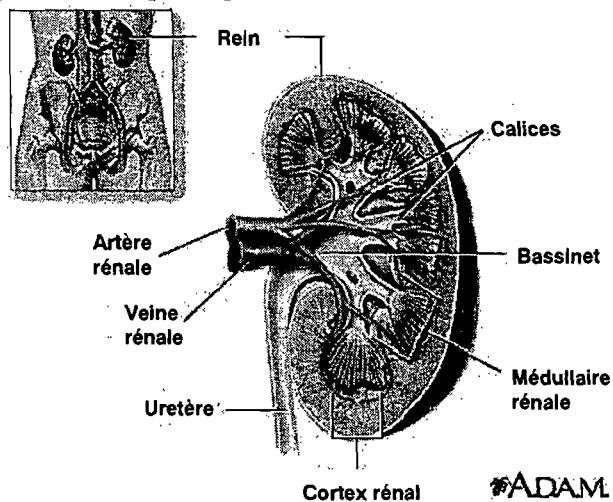
Introduction - Le rein

Morphologie

Situés dans le rétro-péritoine, les reins occupent un espace entre la dernière vertèbre thoracique et la troisième vertèbre lombaire (Figure 1). Pesant entre 135 et 150 g, le rein adulte peut mesurer de 10 à 12 cm de longueur, 5 à 7 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur. C'est par le hile rénal que l'uretère, les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les nerfs quittent les reins. Chacun des reins est entouré de 3 couches de tissus. C'est la couche la plus superficielle, le fascia rénal, qui permet la fixation des reins au diaphragme et à la paroi abdominale. La couche intermédiaire, la capsule adipeuse, est une couche formée de tissus adipeux qui maintient le rein fermement en place et le protège des traumatismes. Enfin, la couche la plus profonde, la capsule fibreuse, est celle qui, en plus de protéger le rein, maintient sa forme (1).

On retrouve deux régions à l'intérieur du rein: la médullaire et le cortex. Le cortex est la zone la plus superficielle alors que la médullaire est la zone plus profonde et qui est constituée des pyramides rénales ou pyramides de Malpighi. Entre ces dernières, on retrouve les prolongements du cortex appelés colonnes de Bertin. C'est dans le parenchyme rénal, formé du cortex et des pyramides rénales, que l'on va retrouver des millions de structures microscopiques nommées néphrons : les unités fonctionnelles du rein (1).

Figure 1 : Morphologie du rein



Traduction de : <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/1101.jpg>

Physiologie

Les néphrons remplissent trois fonctions : la filtration, la sécrétion et la réabsorption des nutriments. La filtration a lieu dans le glomérule alors que la sécrétion et la réabsorption ont lieu dans le tubule rénal. Le sang arrive au rein par l'artériole glomérulaire afférente et est filtré par le glomérule. C'est dans la capsule rénale (ou capsule de Bowman), qui entoure le glomérule, que le sang filtré aura accès au tubule rénal. Ce dernier est formé de quatre parties qui sont : le tubule contourné proximal, l'anse de Henlé, le tubule distal et le tubule rénal collecteur. C'est au fur et à mesure que le filtrat glomérulaire (une partie de l'eau et la plupart des solutés du plasma) s'écoulera dans ces tubules, que la réabsorption et la sécrétion auront lieu. La majeure partie de l'eau et des substances filtrées seront réabsorbées, c'est-à-dire qu'elles passeront du tubule à la circulation sanguine. La sécrétion permettra de faire passer du sang au tubule les déchets qui n'auront pas été filtrés au niveau du glomérule (1, 2).

À la suite du tubule distal, se trouve le tubule collecteur, les tubules connecteurs, les calices et finalement le bassinet. Le drainage de l'urine se termine dans l'uretère pour finalement aboutir dans la vessie (1, 2).

Rôles

Puisqu'ils permettent la filtration du sang, et par le fait même l'élimination des produits terminaux du métabolisme (ammoniaque, urée, bilirubine, créatinine, acide urique), les reins jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du corps humain. En effet, les reins remplissent plusieurs fonctions autres que la filtration du sang. Par exemple, ils sont responsables de la régulation de la composition ionique du sang puisque la concentration sanguine de plusieurs ions (sodium (Na^+), potassium (K^+), calcium (Ca^{2+}), chlorure (Cl^-), phosphate (HPO_4^{2-})) est régulée entre autres par les reins. De plus, en excréant des quantités variables de protons (H^+) et en retenant les ions bicarbonates (HCO_3^-), ils permettent l'ajustement du pH sanguin (1-3).

Les reins maintiennent l'osmolarité sanguine en réglant la perte d'eau et des solutés séparément, ce qui permet de garder une osmolarité sanguine de 290 milliosmoles par litre (mOsm/L). En plus, les reins influencent la pression artérielle par l'ajustement du volume sanguin et par la sécrétion de la rénine, hormone importante dans l'activation du système rénine angiotensine aldostérone. D'autres hormones, telles que le calcitriol et l'érythropoïétine, sont synthétisées au niveau des reins et contribuent à l'homéostasie du calcium et à la production des globules rouges. (1-3).

Importance dans l'élimination des médicaments

L'excrétion des médicaments peut aussi se faire par le foie (bile), mais le rein (urine) reste l'organe le plus important pour ce qui est de l'élimination des médicaments et de leurs métabolites (1, 4). La filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire sont les deux étapes importantes dans l'élimination des médicaments.

Filtration glomérulaire

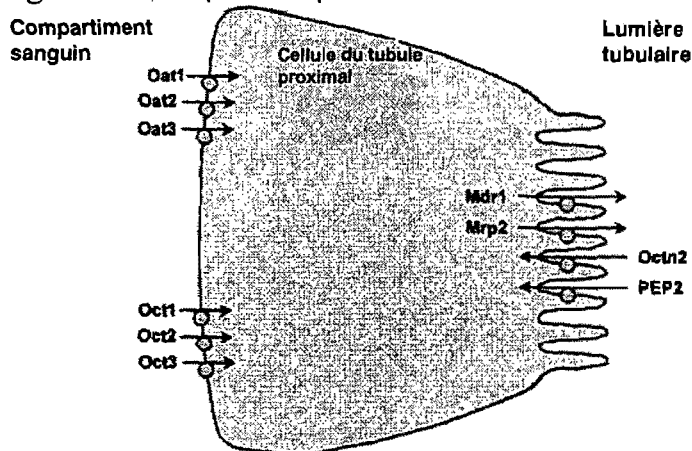
La filtration glomérulaire, phénomène passif, permet d'éliminer les médicaments qui sont caractérisés par un poids moléculaire de moins de 68 kDa et dont le groupement fonctionnel est ionisé à pH physiologique. Les ions et les médicaments polaires sont, par exemple, éliminés dans l'urine (2, 5). Par contre, puisque le glomérule ne laisse pas

passer les protéines, plus un médicament est lié aux protéines plasmatiques, moins il sera filtré.

Sécrétion tubulaire

Par opposition à la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire est un phénomène actif qui requiert la présence de transporteurs. Deux familles de transporteurs sont présentes dans la membrane basolatérale des cellules tubulaires : les familles de transporteurs d'anions organiques (oat) et de cations organiques (oct). Ces transporteurs sont responsables de faire entrer les acides faibles et les bases faibles à l'intérieur de la cellule. Une fois à l'intérieur, ce sont d'autres transporteurs, les « ATP-binding-cassette transporters » (ABC), situés au niveau de la membrane apicale qui permettent l'extrusion des médicaments vers la lumière tubulaire. On appelle ces transporteurs les « multi-drug resistant protein » (Mdr ou p-glycoprotéines) et les « multi-resistant drug protein » (Mrp). Cependant, on retrouve aussi, dans la membrane apicale, deux autres transporteurs qui, contrairement aux Mdr et Mrp, réabsorbent les molécules de la lumière tubulaire vers l'intérieur de la cellule. Ce sont les « organic cation transporter » (octn2) et les « peptide transporter » (PEP2). (Voir tableau I et Figure 2)

Figure 2 : Transporteurs présents au niveau des cellules du tubule proximal.



Traduit et tiré de: Klaassen, C.D., *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison*. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing, chapitre 5.

Tableau I : Principaux transporteurs impliqués dans le transport des médicaments.

Nom	Abréviation	Fonction
<i>Multi-drug-resistant protein</i> ou P-glycoprotéine	Mdr	Diminue l'absorption intestinale Barrière hémato-encéphalique Excrétion biliaire Barrière placentaire
<i>Multi-resistant drug protein</i>	Mrp	Excrétion urinaire et biliaire
<i>Organic-anion transporting polypeptide</i>	oatp	Réabsorption hépatique
<i>Organic-anion transporter</i>	oat	Réabsorption rénale
<i>Organic-cation transporter</i>	oct	Réabsorption rénale et hépatique Barrière placentaire
<i>Nucleotide transporter</i>	nt	Absorption gastro-intestinale
<i>Divalent-metal ion transporter</i>	dmt	Absorption gastro-intestinale
<i>Peptide transporter</i>	pept	Absorption gastro-intestinale

Traduit et tiré de: Klaassen, C.D., Casarett & Doull's *Toxicology: The basic science of poison*. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing, chapitre 5.

Contrairement à la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire permet d'excréter les protéines qui sont fixées aux protéines plasmatiques puisque les complexes médicaments-protéines plasmatiques ne sont pas filtrés. Par contre, la sécrétion peut être saturable. En effet, plus la concentration d'un médicament augmente, plus sa sécrétion augmente jusqu'à ce qu'elle atteigne un seuil. Ce seuil étant atteint, la sécrétion devient constante. Les sites de fixation du médicament sur les transporteurs étant occupés, le transport devient saturé et la sécrétion limitée. De plus, plus d'un médicament peut emprunter un même transporteur. Lorsque les deux molécules se présentent simultanément, elles entrent automatiquement en compétition pour ce transporteur commun. Un exemple est l'utilisation du probénécide et de la pénicilline. Le probénécide, entre autres, permet l'inhibition compétitive de la sécrétion de la pénicilline, ce qui permet, entre autre, d'augmenter sa demi-vie (5).

Réabsorption tubulaire

La réabsorption peut se faire de façon active ou passive. La plupart du temps, les médicaments seront réabsorbés de façon passive. Pour ce faire, ils doivent être non chargés et liposolubles, ceci leur permettant de traverser la membrane cellulaire. Tout dépendra alors de leurs caractéristiques physico-chimiques et du pH urinaire. Un pH alcalin favorisera l'élimination des acides alors qu'un pH acide favorisera l'élimination

des bases. Par exemple, l'administration de bicarbonate de sodium rend l'urine plus alcaline et facilite l'élimination de l'aspirine (6, 7). Les médicaments dont la structure se rapproche de celle des acides aminés pourront être éliminés de façon active.

Insuffisance rénale

L'insuffisance rénale est caractérisée par une diminution du taux de filtration glomérulaire suite à la perte de fonction de néphrons (2, 6). Si cet arrêt est brutal, complet ou presque, on parle alors d'insuffisance rénale aiguë (IRA). Par contre, lorsque la perte de fonction se fait de façon graduelle, on parle d'insuffisance rénale chronique (IRC). Les reins ne peuvent donc plus filtrer adéquatement le sang et, par conséquent, ne peuvent plus éliminer les déchets métaboliques du corps (6). En plus des problèmes d'élimination, le rein n'est plus en mesure de contrôler la balance de l'eau et des électrolytes dans le corps. Des désordres au niveau de la pression artérielle peuvent survenir par après.

La population vieillissante est plus durement atteinte par l'IRC. Cependant, la maladie peut atteindre les moins de 20 ans (6). En 2004, selon l'Institut canadien d'information sur la santé (ICIS), le registre des patients au stade terminal d'insuffisance rénale (STIR) comptait au Québec 13 nouveaux patients âgés entre 0 et 17 ans, alors que les 18-44 et 45-64 ans en comptaient respectivement 98 et 338. La catégorie des 65 ans et plus comptait au-delà de 500 nouveaux cas cette année là.

Dans les dernières années, l'incidence de l'IRC a beaucoup augmenté. Par exemple, entre 1995 et 2004, le nombre de nouveaux patients au stade terminal d'IRC est passé de 750 à 982 toujours au Québec. Au total, au 31 décembre 2004, plus de 6 000 patients étaient traités pour insuffisance rénale terminale, tout traitement confondu (hémodialyse, dialyse péritonéale, greffe).

Insuffisance rénale chronique

Contrairement à l'insuffisance rénale aiguë, l'insuffisance rénale chronique se développe progressivement au fil du temps. La perte de néphrons est irréversible. Cela peut prendre des mois, voire des années avant que la perte de fonction rénale devienne symptomatique (6), les premiers symptômes graves apparaissant seulement lorsqu'il ne reste que 30% des néphrons (2). En fait, l'homéostasie du corps est maintenue tant et aussi longtemps qu'au moins de 20 à 30% des néphrons restent en fonction.

De nombreuses maladies peuvent entraîner une IRC, mais toutes aboutissent au même résultat, c'est-à-dire une diminution du nombre de néphrons fonctionnels. Les causes les plus fréquentes de l'IRC sont le diabète, l'hypertension artérielle et les glomérulonéphrites (2, 6).

L'IRC est classifiée en stades (tableau II). Lorsque les patients présentent un taux de filtration glomérulaire (TFG) supérieur à 90 mL/minute, on considère que l'insuffisance rénale est absente. C'est le stade 1, où on parle de néphropathie chronique sans insuffisance rénale. Les patients n'ont pas symptômes. Lorsque le TFG se situe entre 60 et 90 mL/minute, on dit que l'insuffisance rénale chronique est débutante (stade 2) et passe à modérée lorsque les valeurs du TFG est entre 30 et 60 mL/ minute (stade 3). Lorsque le TFG se situe entre 15 et 30 mL/minute, l'insuffisance rénale est considérée comme sévère (stade 4). Au fur et à mesure que les différents stades sont franchis, les patients perdent 50% de leurs néphrons restants. Les patients démontrent une incapacité à concentrer ou diluer l'urine alors que la concentration sanguine de créatinine et de déchets azotés tels que l'urée est augmentée. Lorsque le TFG est inférieur à 15 mL/minute (stade 5), les patients ont atteint le stade terminal et ont besoin d'être traités par dialyse ou d'avoir une transplantation rénale.

En insuffisance rénale, la compensation par les néphrons restants qui sont encore fonctionnels (phase d'hypertrophie) permet de conserver aux valeurs physiologiques l'excrétion d'eau et d'électrolytes. Cependant, après un certain temps, ces changements

peuvent mener à des lésions au niveau des néphrons, particulièrement au niveau des glomérules (2). L'augmentation de la pression et de la distension de façon chronique au niveau des petites artérioles et des glomérules causent la sclérose de ces vaisseaux. C'est ce tissu, en se cicatrisant, qui entraîne une obturation du glomérule, ce dernier devenant non fonctionnel et un autre étant obligé de travailler pour deux. C'est un cercle vicieux qui mène à la progression de l'insuffisance rénale. Le moyen le plus efficace de ralentir la destruction est de faire diminuer la pression artérielle et la pression hydrostatique au niveau des glomérules. Des antagonistes de l'angiotensine II et d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont alors administrés aux patients (2).

Tableau II : Les différents stades de l'insuffisance rénale chronique

Stades	Description	Taux de filtration glomérulaire (TGF) (mL/min/1,73m ²)
1	Dommages aux reins avec TFG normal	= 90
2	Dommages aux reins avec faible diminution du TFG	60-89
3	Diminution modérée du TFG	30-59
4	Sévère diminution du TFG	15-29
5	Insuffisance rénale	<15 (ou dialyse)

Symptômes

On parle d'urémie pour désigner l'ensemble des manifestations cliniques et biologiques qui sont reliées à l'IRC terminale. Ces manifestations surviennent généralement lorsque le TFG est inférieur à 25 mL/min. La majorité des patients ne démontrent que peu ou pas de symptômes avant ce stade (8).

Cependant, il est fréquent que les patients souffrent de polyurie nocturne (nycturie) due à un défaut de concentration de l'urine. Au fur et à mesure que la maladie progresse, le sang accumule les déchets métaboliques et devient de plus en plus acide. Les patients ressentent de la fatigue, une perte d'appétit et de l'essoufflement. Cette accumulation est aussi responsable des nausées et des vomissements qui mènent à une malnutrition et finalement à une perte de poids. À un stade plus avancé, les patients peuvent souffrir

d'encéphalopathie, les menant à un état de confusion, de léthargie. En phase terminale, des saignements et des ulcères gastro-intestinaux peuvent se développer (6).

Complications

Complications cardiovasculaires

Dans 40% des cas, les problèmes cardiovasculaires sont la cause du décès des patients souffrant d'IRC. Les patients développent une cardiopathie ischémique ainsi qu'une insuffisance cardiaque congestive. Plusieurs facteurs tels que l'hypertension artérielle, la rétention hydrosodée, l'hypercholestérolémie, l'hypertrophie ventriculaire gauche et l'anémie sont impliqués dans le développement de ces pathologies cardiaques (8).

Hypertension artérielle (HTA)

80% des patients souffrant d'IRC et qui sont à un stade avancé souffrent d'hypertension artérielle. Le principal mécanisme de développement de l'HTA est la rétention hydrosodée qui mène à l'augmentation du volume intra-vasculaire. Cette rétention est, entre autres, reliée à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Chez les personnes sans problèmes rénaux, ce système est activé lorsque la pression artérielle et le volume sanguin diminuent. Les reins sécrètent alors la rénine qui permet la conversion de l'angiotensinogène (produit au niveau du foie) en angiotensine I. Cette dernière est par la suite convertie en angiotensine II (forme active) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'angiotensine favorise l'augmentation du volume sanguin par la réabsorption de Na^+ , de Cl^- et de l'eau. De plus, elle stimule la libération de l'aldostérone, qui elle aussi favorise l'augmentation du volume sanguin grâce à la réabsorption de Na^+ et de Cl^- . L'effet de l'angiotensine II serait atténué par la PTH, donnant ainsi à la PTH un rôle de vasodilatateur (9, 10). En insuffisance rénale chronique, le système rénine-angiotensine-aldostérone est inadéquatement supprimé. L'augmentation de la rétention hydrosodée et du volume sanguin cause ainsi à la longue une hypertension artérielle (1, 2, 8). La PTH pourrait y jouer un rôle de part son implication dans la relâche de la rénine (9, 11).

Anémie

La diminution de la fonction rénale est souvent accompagnée d'une baisse du taux d'hémoglobine. Cette anémie est causée par la diminution de la synthèse de l'érythropoïétine (EPO) et l'on corrige ce déficit par l'administration d'érythropoïétine recombinante. Cependant, une augmentation trop rapide d'hémoglobine sous l'administration de l'érythropoïétine recombinante peut provoquer de une hypertension artérielle ou l'aggraver si elle est déjà présente. La physiopathologie de cette hypertension artérielle est complexe mais on pense qu'elle pourrait être liée à l'augmentation de la masse globulaire (8).

Hyperparathyroïdie secondaire

Les désordres squelettiques les plus fréquents en insuffisance rénale chronique sont reliés à l'hyperparathyroïdie secondaire. Les concentrations circulantes de parathormone (PTH) sont très élevées, causant des problèmes au niveau de la résorption osseuse. En plus des problèmes osseux, l'hyperparathyroïdie entraîne aussi des problèmes de calcification vasculaire et tissulaire.

Rôle de la parathormone

La PTH est sécrétée par les cellules principales des glandes parathyroïdes. Cette hormone permet l'augmentation des concentrations sanguines de Ca^{2+} lorsque celles-ci sont faibles (normalement aux alentours de 1,2 mM) (2, 12, 13). Elle stimule la production d'ostéoclastes ainsi que leur activité. Il en résulte une augmentation de la résorption osseuse, libérant ainsi dans le sang des ions Ca^{2+} et HPO_4^{2-} (1). Sur les reins, son action permet la rétention de Ca^{2+} et de magnésium (Mg^{2+}) et augmente l'excrétion des ions HPO_4^{2-} dans l'urine. Globalement, la PTH permet d'augmenter les concentrations sanguines de Ca^{2+} et de faire diminuer celles de HPO_4^{2-} . La PTH permet aussi la synthèse de 1,25-dihydroxyvitamine D, la forme active de la vitamine D₃, aussi appelé calcitriol. Elle stimule, toujours au niveau du rein, l'activation d'une 1 α -hydroxylase, enzyme responsable de l'activation de la vitamine D₃ (25-hydroxycholecalciférol) en calcitriol par son hydroxylation en 1 α (2, 13). Le calcitriol

pourra à son tour augmenter la vitesse de réabsorption de Ca^{2+} au niveau de l'intestin et son passage dans le sang (1, 2).

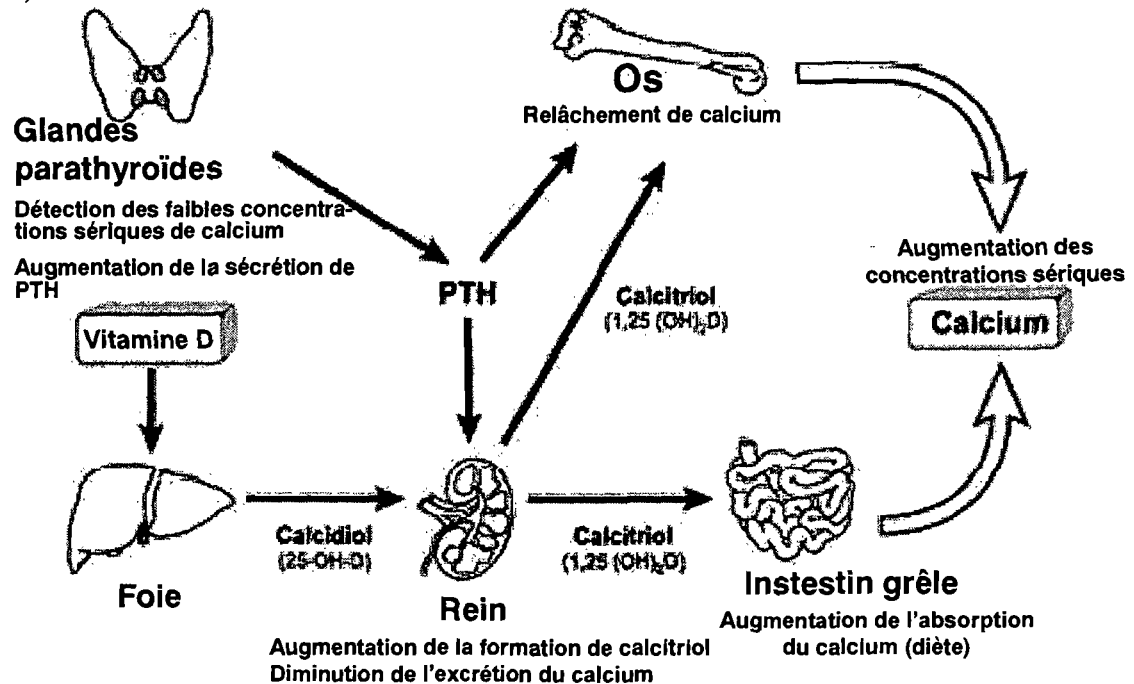
Physiopathologie de l'hyperparathyroïdie secondaire

Les deux principaux facteurs responsables de l'hyperparathyroïdie secondaire en insuffisance rénale chronique sont l'hyperphosphatémie ainsi que la diminution de la synthèse de calcitriol. Le rein insuffisant est incapable d'excréter de façon suffisante les quantités excédentes de phosphore. L'hyperphosphatémie stimule alors la sécrétion de la PTH par différents moyens. En effet, elle favorise 1-) la diminution de la synthèse de calcitriol, 2-) la résistance des glandes parathyroïdes au calcitriol, 3-) la résistance des os à la parathormone et 4-) elle a un effet direct sur la parathyroïde en augmentant la sécrétion de la PTH. La réabsorption du phosphore est inhibée au niveau des tubules proximaux par la PTH et l'augmentation de sa sécrétion permet donc de rétablir les taux de phosphate aux valeurs physiologiques normales (soit environ 4mM). Cependant, plus le nombre de néphrons diminue, plus grande est la quantité de PTH nécessaire pour maintenir les concentrations de phosphate. Lorsque la fonction rénale est pratiquement nulle, les effets néfastes de l'hyperparathyroïdie sont de plus en plus présents. Effectivement, l'augmentation de la sécrétion de PTH provoque une forte hyperplasie des glandes parathyroïdes et continue d'alimenter la résorption osseuse par les ostéoclastes, contribuant à l'altération de l'état des os (14).

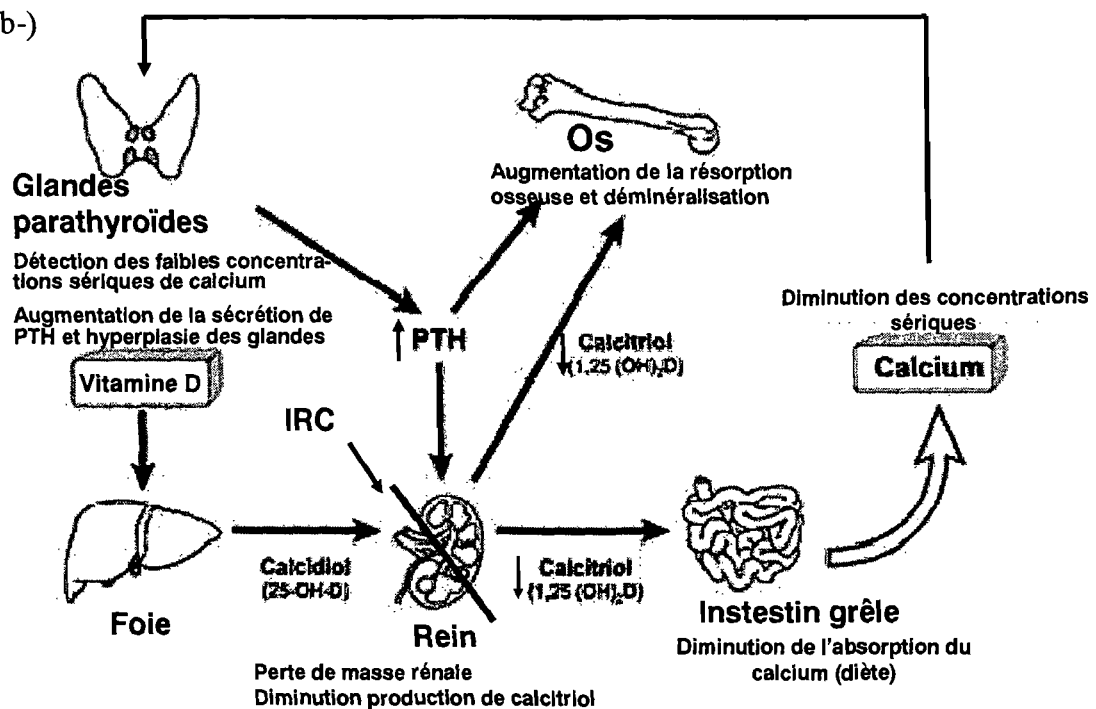
La conversion de la 25-dihydroxyvitamine D en sa forme active 1,25-dihydroxyvitamine D (calcitriol) par la 1- α -hydroxylase se fait au niveau du rein. La perte de masse rénale entraîne une diminution de l'activité de la 1- α -hydroxylase et, par le fait même, une diminution de la production de calcitriol (hypocalcitrémie) (figure 3). L'absorption du calcium au niveau de l'intestin ainsi que ses concentrations sériques en sont diminuées. L'hypocalcitrémie, combinée à la diminution du nombre de récepteurs du calcitriol présents sur les glandes parathyroïdes, contribue à diminuer l'inhibition de la synthèse de la PTH par les cellules parathyroïdiennes. En bref, l'hypocalcémie, l'hypocalcitrémie et l'hyperphosphatémie sont responsables de l'augmentation de la sécrétion de PTH (15, 16).

Figure 3 : a-) Activation de la vitamine D et b-) défaut d'activation de la vitamine D causé par l'IRC (diminution hydroxylation en 1 alpha) à l'origine d'une hypocalcémie et d'une hyperparathyroïdie secondaire.

a-)



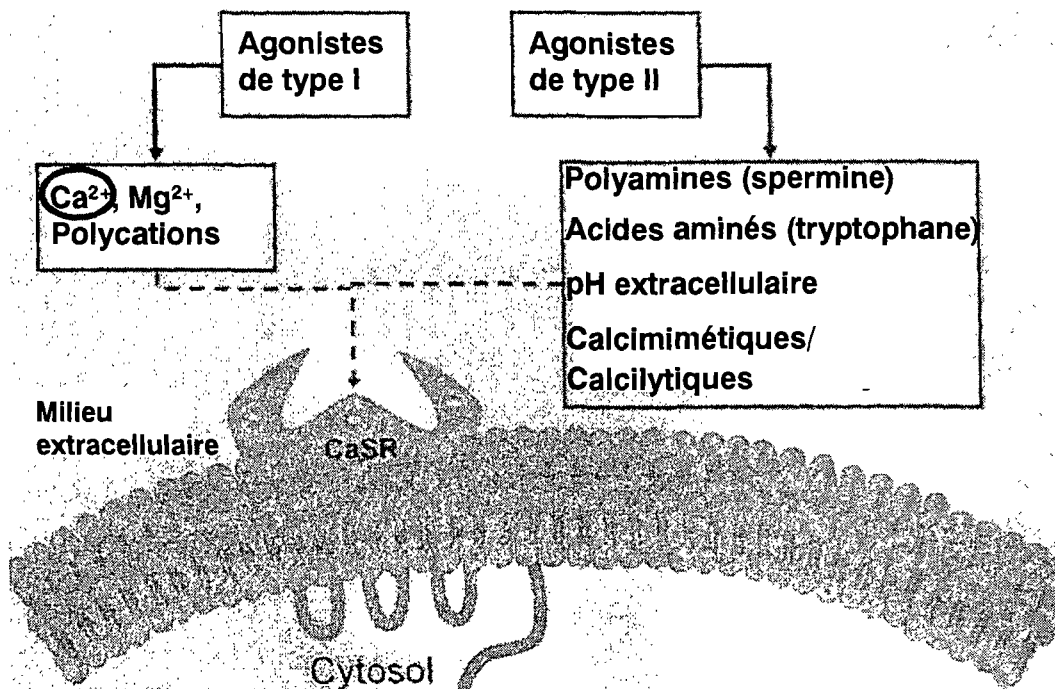
b-)



Tirée et traduite de : <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminD/vitdendo.jpg>

Comment est-il possible que les concentrations sériques de calcium aient un effet sur la sécrétion de PTH? C'est grâce à un type de récepteur couplé à une protéine G sensible aux concentrations extracellulaires de calcium (CaSR) que l'on retrouve à la surface des cellules principales des glandes parathyroïdes (12)(Figure 4). Ce récepteur est capable de déceler des changements minimes au niveau des concentrations sériques de calcium (12). Lorsque le récepteur est activé par le Ca^{2+} , la sécrétion de PTH par les cellules principales est supprimée. Cependant, des concentrations sériques de calcium très faibles inactivent le récepteur, enlevant ainsi l'inhibition sur la sécrétion de la PTH, ce qui stimule les cellules à sécréter de la PTH afin de normaliser la quantité de calcium dans le sang (15). C'est ce qui se passe dans le cas de l'insuffisance rénale. Cependant, puisque la réabsorption de calcium tant au niveau des reins que de l'intestin est diminuée, les niveaux de calcium sérique restent toujours faibles et les cellules continuent de sécréter de la PTH (15).

Figure 4 : Schéma d'un récepteur sensible au calcium, retrouvé à la surface des cellules principales des glandes parathyroïdes, ainsi que ses différents agonistes.



Légende: CaSR: récepteur sensible au calcium, Ca^{2+} : calcium, Mg^{2+} : magnésium.

Figure traduite et tirée de: Hebert, S.C., *Therapeutic use of calcimimetics*. Annu Rev Med, 2006. 57: p. 349-64.

Afin de rétablir les taux de PTH, les traitements habituels consistent à inhiber l'hypocalcémie par l'administration soit de suppléments de calcium, d'agents chélateur du phosphate ou d'analogues de la vitamine D (15). Par contre, ces traitements ont pour effet d'empirer l'état du patient en provoquant une hypercalcémie, une hyperphosphatémie et une augmentation des concentrations de produits phosphocalciques, situation qui augmente les risques de calcification des tissus mous et des vaisseaux sanguins alors que les taux de PTH ne sont toujours pas rétablis (15). L'ablation des glandes parathyroïdes ou l'administration de calcimimétiques ont pour effet de rectifier les taux de PTH sans risque de calcification (12, 15, 17).

Voie de signalisation de la PTH

Les différents effets de la PTH peuvent être reliés à différents mécanismes : une augmentation de l'AMPc et/ou une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium (19) ainsi qu'une activation d'une protéine kinase C (PKC). L'augmentation de l'AMPc mènerait à la phosphorylation de protéines via l'activation d'une protéine kinase A (PKA) (20). Une troisième voie de signalisation serait via le NF- κ B. NF- κ B est un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans la régulation de plusieurs réactions physiologiques telles que la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose. De plus, il a aussi été démontré que la PTH pouvait agir sur l'expression du CYP450 via la voie du NF- κ B (21).

Ostéodystrophie rénale

L'ostéodystrophie rénale regroupe les problèmes reliés aux anomalies du métabolisme osseux suite au débalancement des niveaux de phosphore, de calcium et des hormones les régulant : la PTH et la vitamine D. On retrouve parmi ces anomalies, l'ostéomalacie, l'os adynamique ou l'ostéite fibreuse.

L'ostéomalacie

L'ostéomalacie est un défaut de la minéralisation de la matrice osseuse suite à une carence en vitamine D. Elle est caractérisée par des douleurs osseuses fracturaires et de la myopathie proximale et est peu sensible au traitement par les analogues de la vitamine D (8).

L'os adynamique

L'os adynamique est une anomalie que l'on observe suite à une diminution importante des concentrations de PTH. Il est caractérisé par un ralentissement excessif de la résorption et de la formation osseuse (8).

L'ostéite fibreuse

Finalement, l'ostéite fibreuse se traduit par une prolifération des ostéoclastes et des ostéoblastes lors d'une exposition prolongée à des taux de PTH extrêmement élevés. Les symptômes sont une faiblesse musculaire, des douleurs osseuses et du prurit. Ce dernier est causé par l'hyperphosphorémie prolongée qui provoque un dépôt de cristaux de phosphore dans la peau (2, 18).

Le métabolisme des médicaments

Administration

Il existe plusieurs voies d'administration des médicaments: orale, intraveineuse, intramusculaire, intrapéritonéale, sous-cutanée, etc... La voie sera déterminée par les propriétés du médicament (4), de même qu'en fonction de l'effet désiré. La voie orale est la plus pratique et la plus souvent utilisée pour la plupart des médicaments. Cependant, on pourra favoriser une autre voie afin, par exemple, de maximiser l'effet à un endroit précis et d'éviter des effets ailleurs dans le corps (topique), ou de prolonger le dit effet (timbres transdermiques), ou tout simplement afin d'éviter l'effet de premier passage hépatique (voie sublinguale) (22).

Absorption

L'absorption est le mécanisme par lequel le médicament entre dans le système sanguin (5). Le tractus gastro-intestinal est l'endroit où a lieu la majorité de l'absorption suivi des poumons et de la peau. Bien sûr, l'absorption peut se faire à d'autres endroits, comme au niveau du péritoine ou des muscles, tout dépendant de la voie d'administration.

Absorption intestinale

Lors de l'absorption, les xénobiotiques pénètrent dans les membranes biologiques de la même manière que les autres substances dont le corps a besoin, comme les nutriments par exemple. Les ions ainsi que les molécules sous forme ionisées, liposolubles et possédant un petit poids moléculaire seront plus facilement absorbées par diffusion passive (5, 7). Le pH intestinal influence grandement ce phénomène, puisqu'il détermine si le médicament, acide ou basique, sera sous sa forme ionisée ou non. Par contre, il arrive parfois que certains composés utilisent un transporteur déjà présent, tels que ceux utilisés pour le transport de nutriments (5, 7). Par exemple, le 5-fluorouracil empruntera le système de transport nécessaire à l'absorption de la pyrimidine (23), alors que le thallium sera absorbé par le système de transport du fer (24). On retrouve aussi au niveau des entérocytes, quelques transporteurs qui font partie des « ABC transporters »; MDR1 (p-gp) et MRP2. Ces transporteurs sont situés dans la membrane apicale des entérocytes où leur fonction est de rejeter les médicaments vers la lumière intestinale. C'est la raison pour laquelle certains médicaments tels que la cyclosporine, le paclitaxel, la colchicine ainsi que la vincristine, ne sont pas bien absorbés au niveau intestinal (5, 25).

Effet de premier passage hépatique

Lorsqu'il est absorbé par l'intestin, le médicament entre dans la circulation sanguine pour se rendre jusqu'à la veine porte (5, 7, 22). Lors du passage dans l'intestin et le foie, les substances sont métabolisées une première fois, contribuant ainsi à diminuer leur concentration sanguine avant d'atteindre la circulation pulmonaire puis la circulation générale. C'est le phénomène de premier passage hépatique (4, 5, 22, 25).

Biodisponibilité

La biodisponibilité est définie comme étant la fraction du médicament qui, après son absorption, réussit à atteindre la circulation systémique (5, 22, 25). L'effet de premier passage hépatique ainsi que l'activité des différents transporteurs influenceront grandement la biodisponibilité d'un médicament (5, 22, 25).

Distribution

Une fois entré dans la circulation sanguine, le médicament se distribue assez rapidement. En premier lieu, ce sont le taux de perfusion des organes et le taux de diffusion à travers la membrane capillaire qui vont jouer sur la distribution. Les premiers organes à être en contact avec le médicament seront donc ceux qui sont les mieux perfusés : le cœur, le foie, les reins et le cerveau (5, 25). Cela prendra quelques minutes, voire quelques heures, avant que l'état d'équilibre ne soit atteint dans les autres compartiments, soit les muscles, la majorité des viscères, la peau et le tissu graisseux (25). Par la suite, l'affinité de la molécule entrera en compte. Les petites molécules hydrosolubles ainsi que les ions peuvent passer de l'autre côté de la membrane grâce à des canaux ou des pores présents dans la membrane, alors que les molécules liposolubles diffusent librement à travers la membrane (4, 5). De plus, si une molécule est très liposoluble, le volume de distribution paraîtra plus grand puisque le médicament s'accumulera dans les tissus graisseux et y sera confiné. Par contre, le temps d'élimination de ce médicament sera plus long (4, 25). D'autre part, si le médicament n'est que faiblement soluble dans les graisses, il se retrouvera généralement en plus grande concentration au niveau de son site d'action (25). La liaison aux protéines plasmatiques, l'albumine pour les médicaments acides et l' α -1-glycoprotéine pour les médicaments basiques, peut limiter la distribution d'un médicament. En effet, seule la fraction libre d'un médicament peut traverser les membranes cellulaires. Alors plus le taux de liaison d'un médicament est élevé, plus sa fraction libre est faible, diminuant ainsi sa concentration dans les tissus et aux sites d'action (4, 25).

Biotransformation des médicaments

Certains médicaments, qui ne possèdent qu'un petit poids moléculaire ou qui sont très polaires, sont facilement excrétés par les reins. Cependant, la majorité des médicaments sont liposolubles et faiblement ou non ionisés. Le métabolisme permet donc d'inactiver ces molécules et d'augmenter leur hydrosolubilité, ce qui favorisera leur élimination du corps (4, 5, 7, 22, 25). Dans la plupart des cas, la réaction rendra le xénobiotique moins

actif que la molécule mère ou l'inactivera totalement. Cependant, il arrive parfois que le produit de la réaction soit plus actif ou plus toxique que la molécule mère (4, 5, 22, 25).

De nombreux facteurs peuvent influencer le métabolisme des xénobiotiques. Par exemple, l'âge, la génétique, le sexe, l'alimentation, les maladies ou la prise simultanée d'un ou plusieurs autres médicaments pouvant avoir un effet inducteur ou inhibiteur sur les enzymes (26).

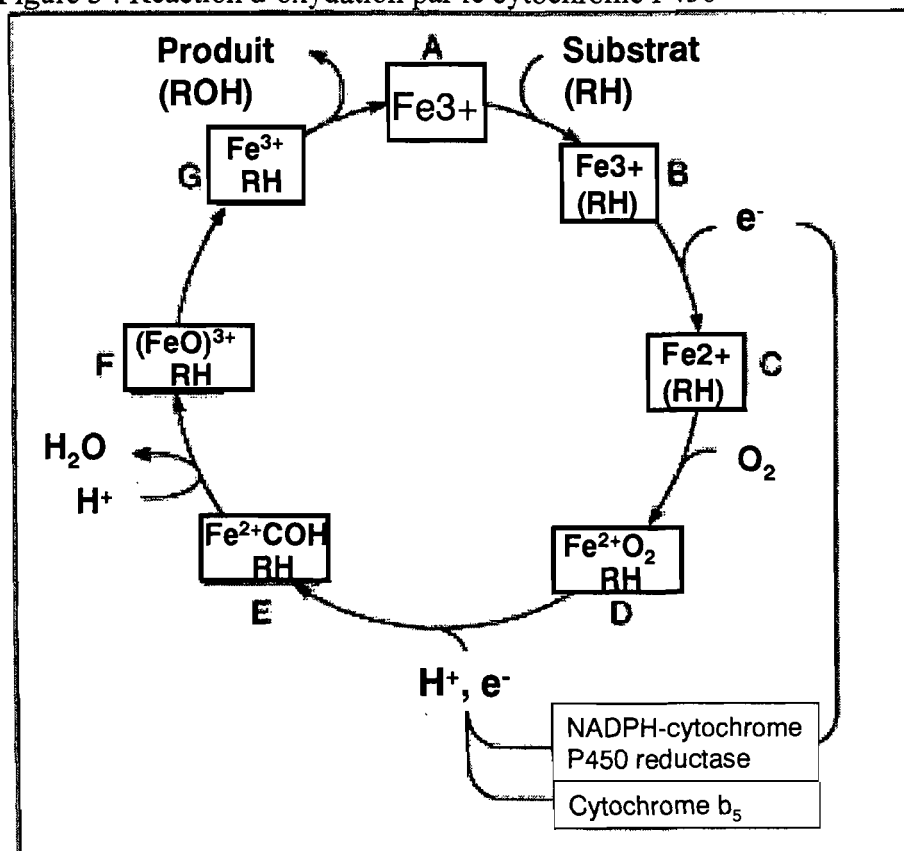
Plusieurs organes, dont l'intestin, les reins ou les poumons, expriment des enzymes pouvant métaboliser les xénobiotiques. Cependant, l'organe le plus important en ce qui concerne le métabolisme des médicaments reste le foie (7). En général, le processus de biotransformation se fera par les enzymes de phase I et de phase II (4, 5, 22, 25).

Les enzymes de phase I

Les enzymes de phase I catalysent des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. La plupart du temps, ces réactions permettent d'augmenter la polarité des molécules par l'ajout de groupements -OH, -NH₂, -SH ou -COOH, ou d'exposer ceux qui sont déjà présents sur le xénobiotique (22). Beaucoup d'enzymes du métabolisme sont situées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le réticulum endoplasmique rugueux se consacrant plutôt à la synthèse de protéines, le réticulum endoplasmique lisse, quant à lui, est plus riche en enzymes du métabolisme. Entre autres, on y retrouve une classe d'enzymes appelées MFO (*mixed function oxidases*), qui sont en fait des mono-oxygénases dont la plus connue est une hémoprotéine, le cytochrome P450 (CYP450) (5, 7, 22, 25).

Pour que la réaction d'oxydo-réduction ait lieu, deux facteurs sont nécessaires : l'oxygène et la nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate (NADPH), un agent réducteur (7, 22). (figure 5)

Figure 5 : Réaction d'oxydation par le cytochrome P450



Autres réactions

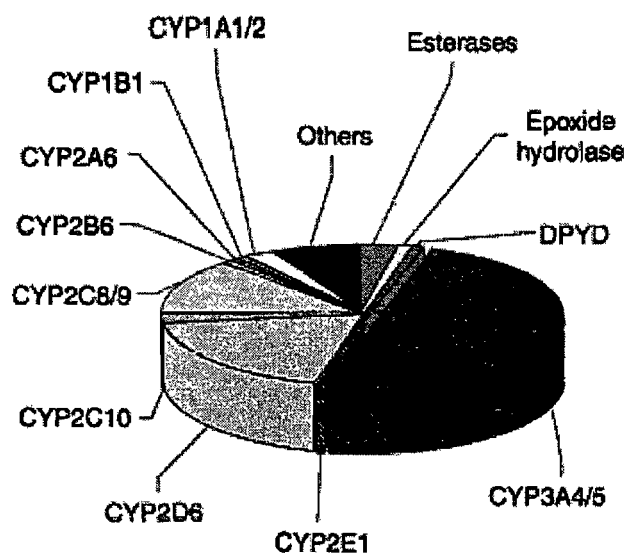
Réduction d'un électron	C (Fe ²⁺ RH)	→	A Fe ³⁺ + RH ⁻
Production d'un anion superoxyde	D (Fe ²⁺ O ₂ RH)	→	B (Fe ³⁺ RH) + O ₂ ⁻
Production de peroxyde d'hydrogène	E (Fe ²⁺ OOH RH) + H ⁺	→	B (Fe ³⁺ RH) + H ₂ O ₂
Peroxyde «Shunt»	B (Fe ³⁺ RH) + XOOH	→	F (FeO) ³⁺ RH + XOH

Tirée et traduite de : Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing, chapitre 6.

Isoformes

Il existe de nombreuses isoformes du P450. Entre autres, les isoformes 3A4/5 chez l'humain et 3A1/2 chez le rat sont responsables du métabolisme de la majorité des médicaments (figure 6). De plus, chaque isoforme peut métaboliser plus d'un substrat, mais le contraire est également vrai puisqu'un substrat peut aussi être métabolisé par plus d'une isoforme (25).

Figure 6 : Isoformes du P450



Tirée et traduite de: Brunton, L., *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. 2006: McGraw-Hill Professional Publishing.

Même si ces réactions visent à favoriser l'élimination des xénobiotiques dans l'urine, il arrive parfois que le produit formé ne peut toujours pas être éliminé. Il doit alors passer par une deuxième réaction qui peut être catalysée encore une fois par les enzymes de phase I ou par les enzymes de phase II (4, 22).

Les enzymes de phase II

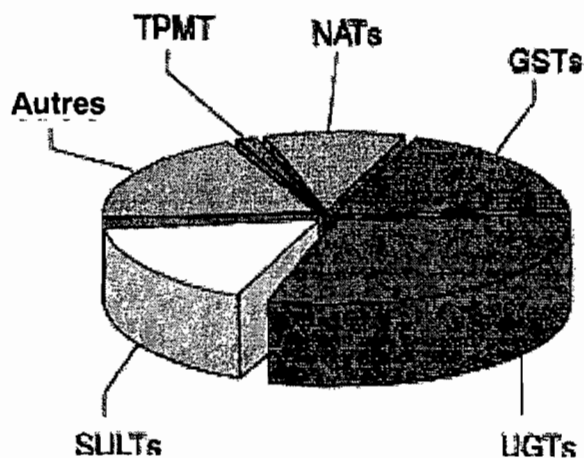
Les enzymes de phase II sont des enzymes qui catalysent des réactions de conjugaison (Figure 7). Ces réactions permettent la formation de liens covalents entre le xénobiotique à conjuguer et un groupement polaire. La présence d'un co-facteur est donc nécessaire (tableau III). C'est à partir de ce co-facteur que se fera le transfert du groupement polaire sur le xénobiotique. Ce dernier étant plus polaire (excepté après acétylation et méthylation, voir plus loin), il sera plus facilement excrété dans l'urine ou par la bile (4, 5, 25). Cependant, il arrive que la réaction de conjugaison rende encore plus actif le xénobiotique, augmentant ainsi les risques de toxicité (27).

Tableau III : Co-facteurs pour réactions de conjugaison

Enzymes	Réactions	Co-Facteurs	Source d'énergie
UDP-glucuronosyltransférases	Glucuronidation	Acide glucuronique (UDPGA)	UTP + glucose 1-phosphate
N-acétyltransférases	Acétylation	Acétyl CoA	ATP
Sulfotransférases	Sulfonation	3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS)	2 ATP + SO ₄
Méthyltransférases	Méthylation	S-adenosylméthionine (SAM)	ATP-méthionine
Gluthatione S-transférases	Conjugaison par le glutathion	Gluthation (GSH)	Acides aminés + 2 ATP
	Conjugaison par les acides aminés	Dérivés de l'Acyl CoA	ATP

On retrouve parmi les réactions de phase II la glucuronidation, l'acétylation, la sulfonation, la méthylation, la conjugaison par le glutathion et par les acides aminés (25). Chacune de ces réactions sont effectuées par des familles d'enzymes qui contiennent une ou plusieurs sous-familles, dans lesquelles on retrouve de nombreuses isoformes ayant une spécificité propre à chacun. Ces enzymes sont localisées au niveau du cytosol, à l'exception des UDP-glucuronosyltransférases (UDP-GT, UGT), qui sont microsomiales comme les enzymes du CYP450.

Figure 7 : Les différentes enzymes de phase II et leur importance.



Légende

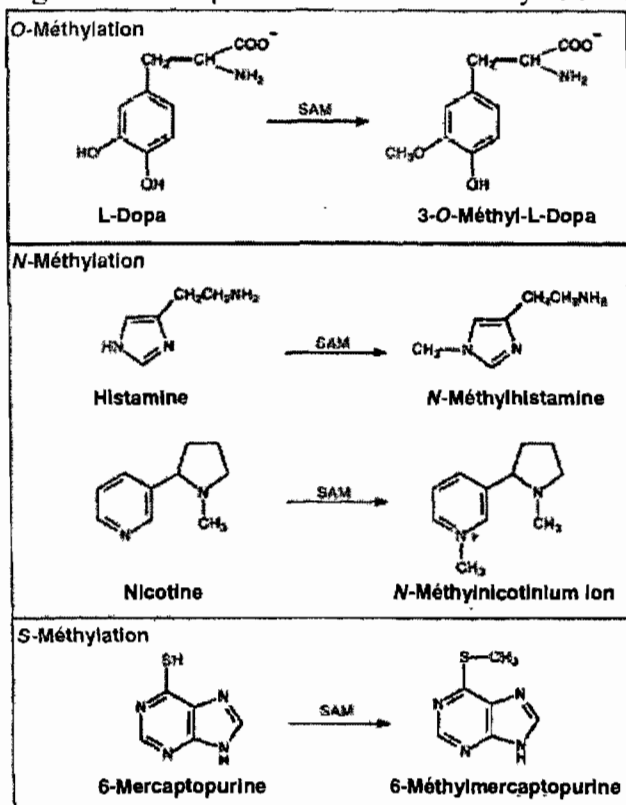
TPMT : thiopurine méthyltransférases, NATs : n-acétyltransférases, GSTs : glutathione s-transférases, UGTs : uridine diphosphate glucuronosyltransférases, SULTs : sulfotransférases.

Réf : Brunton, L., *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. 2006: McGraw-Hill Professional Publishing.

Méthylation

Bien qu'elle soit une voie assez commune, la méthylation n'est qu'une voie mineure de biotransformation des médicaments (Figure 8). En effet, cette réaction contribue plutôt à diminuer l'hydrophilicité des xénobiotiques, à quelques exceptions près (5). Parmi les substrats des méthyltransférases (MTs), on retrouve des médicaments, des hormones et des neurotransmetteurs. Le co-facteur le plus commun des méthyltransférases est la S-adénosyl-L-méthionine (SAM). C'est un groupement méthyl retrouvé sur le co-facteur qui est transféré sur un atome soit d'oxygène (O), d'azote (N) ou de soufre (S) (5, 28). Par exemple, la biotransformation de catécholamines, telles que la dopamine et la norépinéphrine, est catalysée par la catéchol-*O*-méthyltransférase. De plus, il est connu que la méthylation est une voie commune dans le métabolisme de neurotransmetteurs comme l'histamine ou dans la conversion de la norépinéphrine en épinéphrine (5, 28).

Figure 8 : Exemple de réactions de méthylation avec différents substrats

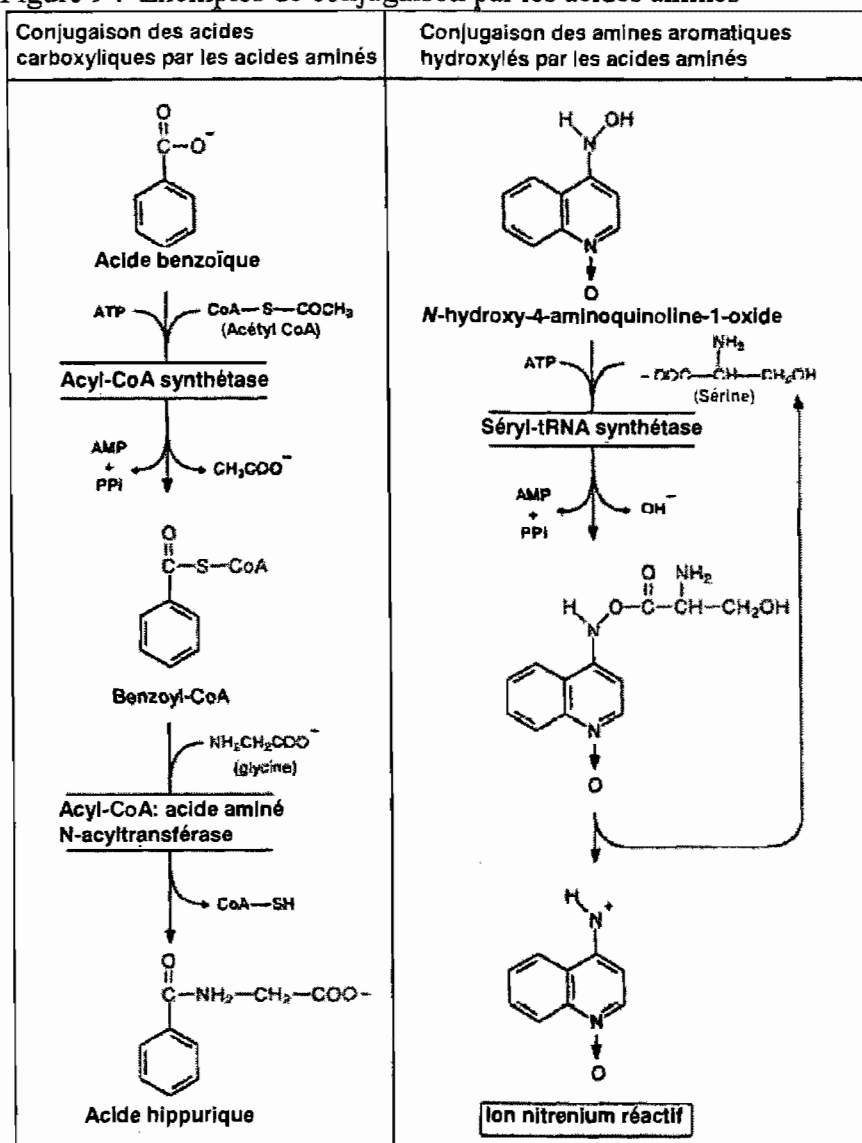


Tirée et traduite de: Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing.

Conjugaison par les acides aminés et le glutathion

La conjugaison par les acides aminés peut se faire par deux voies, selon le groupement présent sur le xénobiotique (figure 9). Les acides aminés tels que la glycine, la glutamine et la taurine réagiront avec les substances ayant un groupement acide carboxylique. La seconde voie implique les acides aminés qui sont la proline et la sérine. Ces derniers réagissent avec des xénobiotiques contenant un groupement amine aromatique hydroxylé. Dans le cas de la première voie, c'est le xénobiotique qui doit être activé par conjugaison avec une coenzyme A (CoA). Le produit, un thioéther acyl-CoA, réagira avec le groupement amine de l'acide aminé. Dans la seconde voie, c'est l'acide aminé qui doit tout d'abord être activé par une aminoacyl-ARNt-synthétase avant de réagir avec le xénobiotique. Dans certains cas, la conjugaison des acides aminés avec l'acide carboxylique peut être une voie alternative à la glucuronidation. Habituellement, cette voie permet la détoxification des xénobiotiques, alors que la voie hydroxyamines aromatiques est plutôt réputée pour l'activation des xénobiotiques. Le produit, N-esters, étant très instable peut se dégrader et former des composés tels que des ions nitrenium et carbonium, molécules très réactives avec l'ADN (5).

Figure 9 : Exemples de conjugaison par les acides aminés

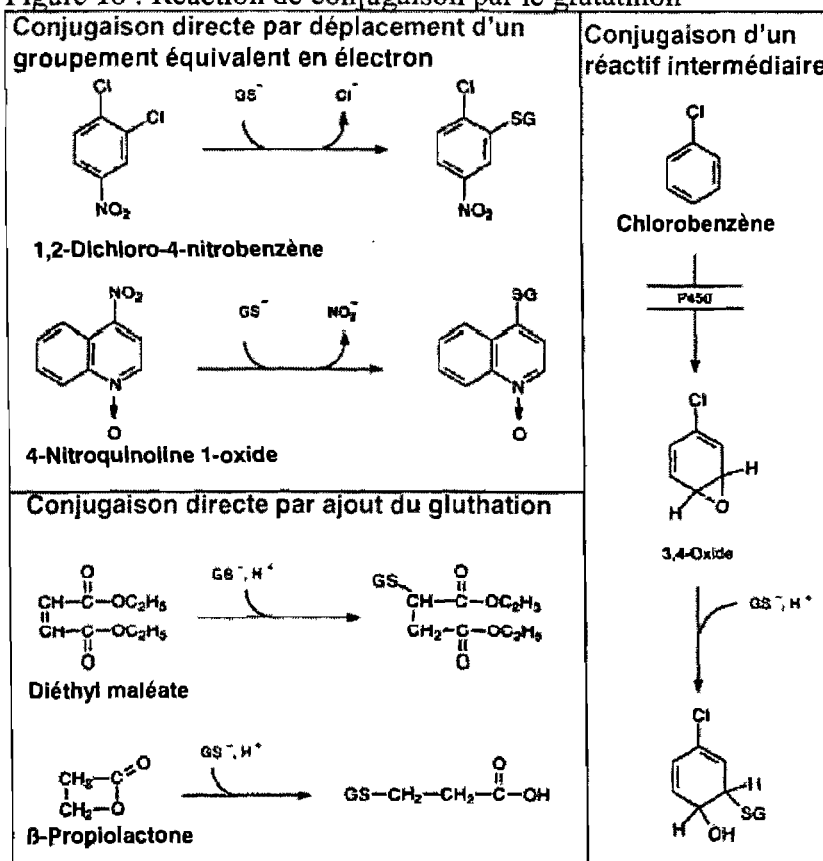


Tirée et traduite de Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing.

Les glutathion-S-transférases (GSTs) existent sous forme cytosolique mais aussi sous forme microsomiale. Cependant, c'est la forme cytosolique qui est prédominante dans le métabolisme des xénobiotiques alors que la forme microsomiale métabolise des substances endogènes telles que les leucotriènes et les prostaglandines (25, 29, 30). La conjugaison par le glutathion (GSH) (figure 10) est très efficace dans la détoxification des réactifs intermédiaires produits lors des réactions de phase I ou II (5). La présence de grandes concentrations de glutathion dans le foie peut permettre la conjugaison de

façon non enzymatique. Cependant, on retrouve également ces enzymes dans d'autres organes tels que l'intestin, les reins et les poumons (5). Le glutathion est une protection cellulaire importante contre les molécules possédant des hétéroatomes réactifs tels que l'oxygène, l'azote et le soufre (5, 25). Bien sûr, si la capacité enzymatique est saturée et que les voies alternatives le sont aussi, certains composés ne seront pas détoxifiés totalement et les risques de toxicité sont alors augmentés (5, 25, 29).

Figure 10 : Réaction de conjugaison par le glutathion



Tirée et traduite de: Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing.

Sulfonation

Les enzymes responsables de la sulfonation sont les sulfotransférases. On les retrouve particulièrement dans le foie, les reins, l'intestin, les poumons ainsi que dans le cerveau (5). Généralement, le produit de cette réaction donne un acide ester-sulfurique et inhibe toute activité biologique. La réaction consiste à transférer un groupement sulfonate (SO_3^-) sur le médicament à éliminer, par exemple l'acétaminophène (figure 11). Ce

c'est une réaction qui a une plus grande capacité, mais une faible affinité pour les substrats (5).

Finalement, bien que la sulfonation permette la détoxification de xénobiotiques dans bien des cas, tout comme la plupart des réactions de phase II, la sulfonation peut augmenter la toxicité d'un composé (par exemple le minoxidil) dû à l'instabilité du produit formé lors de la réaction (5, 28, 35).

Tableau IV : Exemples de substrats conjugués par sulfonation

Groupements fonctionnels	Exemples
Alcool primaire	Chloramphénicol, éthanol, hydrocarbures hydroxyméthyl polycycliques aromatiques, polyéthylène glycol
Alcool secondaire	Acides biliaires, 2-butanol, cholestérol, déhydroépiandrosterone, doxaminol
Phénol	Acétaminophène, estrone, éthinylestradiol, naphtol, pentachlorophénol, phénol, picénadol, salicylamide, trimétrexate
Catéchol	Dopamine, acide ellagique, a-méthyl-DOPA
N-oxide	Minoxidil
Amine aliphatique	2-Amino-3,8-diméthylimidazo[4,5-f]-quinoxaline (MeIQx)* 2-Amino-3-méthylimidazo-[4,5-f]-quinoline (IQ)* 2-Cyanoéthyl-N-hydroxythioacétamide, despramine
Amine aromatique	2-Aminonaphthalène, aniline
Hydroxylamine aromatique	N-hydroxy-2-aminonaphthalène
Hydroxyamide aromatique	N-hydroxy-2-acétylamino fluorène

* Produit de la pyrolyse d'un acide aminé

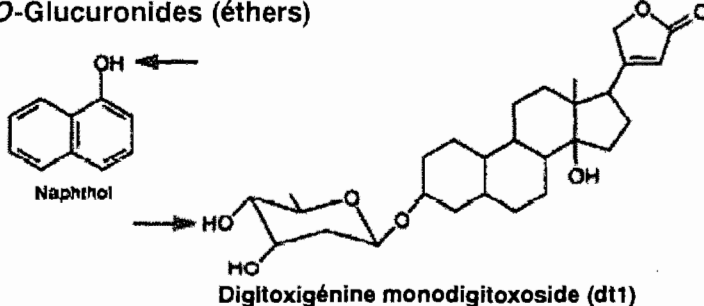
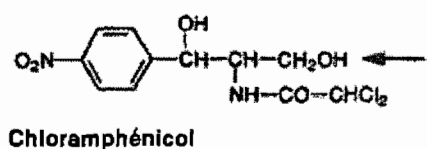
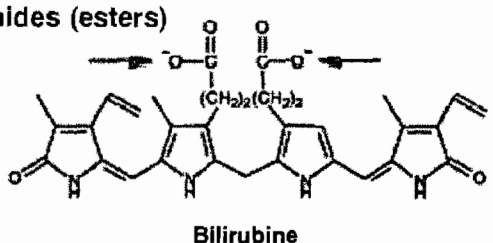
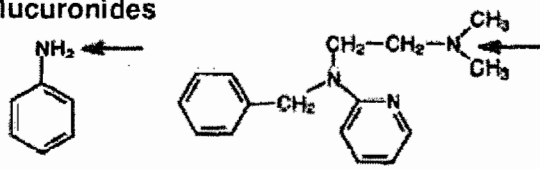
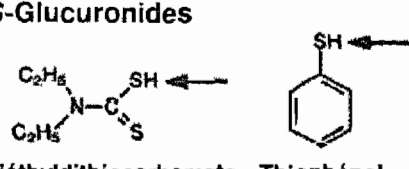
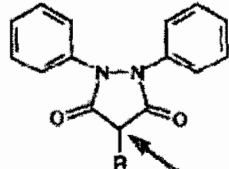
Tirée traduite de Klaassen, C.D., Casarett & Doull's *Toxicology: The basic science of poison*. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing.

Glucuronidation

La réaction de glucuronidation (Figure 12) est une voie majeure des enzymes de phase II puisque 35% des médicaments métabolisés par les phases II sont glucuronidés (36). Ceci est dû au fait que le co-facteur, l'acide glucuronique, est disponible en grandes quantités puisqu'il est synthétisé à partir de glucose-1-phosphate, élément qui est présent en concentrations élevées dans les cellules (5). Les uridines diphosphate glucuronosyltransférases (UDP-GT) sont divisées en 4 quatre familles (37). Les deux familles les mieux connues sont l'UGT1 et l'UGT2. La famille UGT1 est plutôt

impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques contenant un groupement phénol ou amine ainsi que celui de la bilirubine. Pour sa part, la famille UGT2 métabolise les stéroïdes, les acides biliaires ainsi que plusieurs médicaments, notamment des anti-inflammatoires non stéroïdiens (5, 38). Contrairement aux UGT1 et 2, les enzymes faisant partie des deux autres familles, UGT3 et 8, vont utiliser d'autres co-facteurs (comme par exemple l'UDP-galactose utilisé par l'UGT8A1) au lieu de l'acide UDP-glucuronique (37).

Figure 12 : Exemples de substrats conjugués par glucuronidation

<p>O-Glucuronides (éthers)</p>  <p>Naphthol</p> <p>Digitoxigénine monodigitoxoside (dt1)</p>  <p>Chloramphénicol</p>	<p>Autres exemples</p> <p>Acétaminophène Codéine Dextrorphan Diéthylstilbestrol Estrone Hexobarbital Méthyphénylcarbinol Morphine Naloxone 4-Nitrophénol Oxazépam Phénolphtaléine Progestérone Propofol Propranolol Témazépam Testostérone Thyroxine Trichloroéthanol</p>
<p>O-Glucuronides (esters)</p>  <p>Bilirubine</p>	<p>Bénoxaprofène Diclofénac Diflunisal Étodolac Kétoprofène Acide lipoïque Naproxène Suprofène Toilmétine Acide valproïque Zomépirac</p>
<p>N-Glucuronides</p>  <p>Aniline</p> <p>Tripéennamine</p>	<p>Ami tryptiline Benzidine Ciclopirox olamine Cyclobenzaprine Cyproheptadine N-Hydroxyarylamines Imipramine Lamotrigine Méprobamate Sulfadiméthoxine Sulfathiazole Sulfisoxazole</p>
<p>S-Glucuronides</p>  <p>Diéthylthiocarbamate</p> <p>Thiophénol</p>	<p>C-Glucuronides</p>  <p>Phénylbutazone R = C₆H₅ Sulfapyrazone R = (CH₂)₂SO₂C₆H₅</p>

Tirée et traduite de : Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing.

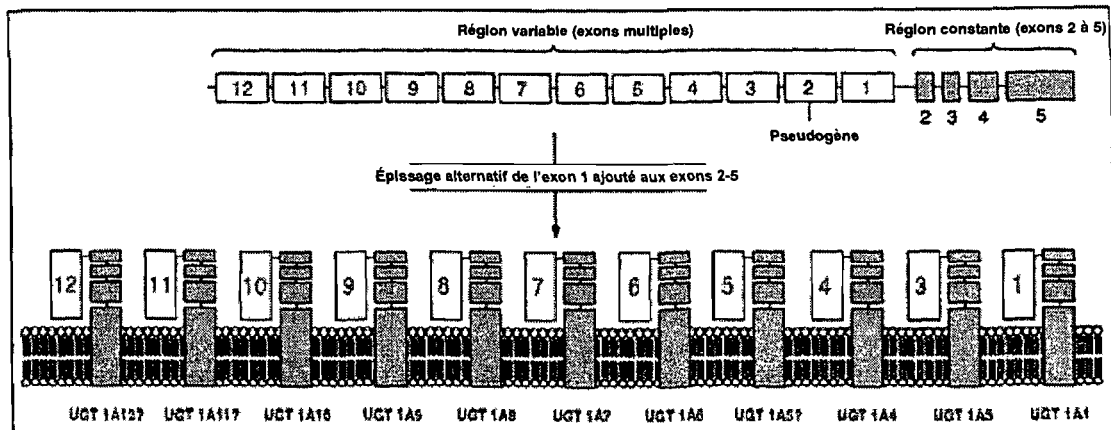
Famille UGT1A

La famille UGT1 contient une sous-famille désignée sous le nom de UGT1A. Chez l'humain, 13 isoformes ont été caractérisées jusqu'à maintenant (voir tableau V). Les isoformes UGT1A2, 1A11, 1A12 et 1A13 ne sont que des pseudogènes codant pour des protéines non fonctionnelles (39, 40). Un seul gène code pour la famille UGT1A. Les exons 2, 3, 4 et 5 sont communs à toutes les isoformes et codent pour la partie C-terminale (ancrage dans la membrane microsomiale) de la protéine alors que l'exon 1 existe en plusieurs copies différentes (autant chez l'humain que chez le rat) et codent pour la partie N-terminale (liaison aux substrats) (38). Il y aura donc épissage alternatif lors de la synthèse protéique, donnant ainsi la spécificité à chacune des isoformes (figure 13) à (40, 41).

Tableau V : Isoformes de la famille UGT1A caractérisées chez l'humain

isoformes	
gènes	pseudogènes
UGT1A1	UGT1A2p
UGT1A3	UGT1A11p
UGT1A4	UGT1A12p
UGT1A5	UGT1A13p
UGT1A6	
UGT1A7	
UGT1A8	
UGT1A9	
UGT1A10	

Figure 13 : Structure du gène de la famille UGT1A



Tirée et traduite de : Klaassen, C.D., *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison*. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing.

De nombreuses mutations existent au sein de la famille UGT1A et la structure du gène fait en sorte que les conséquences de ces mutations peuvent être minimes ou fatales. L'exemple le mieux illustré est celui de l'hyperbilirubinémie héréditaire que l'on retrouve sous deux formes : le syndrome de Crigler-Najjar et la maladie de Gilbert. Les deux maladies impliquent principalement des mutations au niveau du gène de l'UGT1A1, isoforme impliqué dans le métabolisme de la bilirubine, causant entre autres des problèmes plus ou moins majeurs d'ictère (38).

Syndrôme de Crigler-Najjar

Des lésions (insertions, délétions ou mutations) au niveau d'un quelconque exon du gène de l'UGT1A1 qui cause une perte quasi totale de l'activité de l'enzyme se traduit par le syndrome de Crigler-Najjar de type 1 (CN-1). Ces patients ont des taux sanguins de bilirubine élevés et un faible taux de glucuronidation pour d'autres substrats comme les phénols, le propofol et l'éthinylestradiol (38). Le syndrome de Crigler-Najjar de type 2 (CN-2) est causé par une diminution moins sévère de l'activité de l'UGT1A1. Puisque les mutations peuvent être présentes autant au niveau de l'exon 1 propre à l'UGT1A1 qu'au niveau des exons 2, 3 et 5, qui sont les exons communs à toutes les isoformes, l'activité envers des substrats autres que ceux de l'UGT1A1 est altérée chez certains patients. Ces mutations codent pour des protéines non fonctionnelles, d'où la

diminution ou tout simplement l'absence de glucuronidation. On a recours à la transplantation hépatique comme traitement de cette maladie létale (38).

Maladie de Gilbert

La maladie de Gilbert est caractérisée par une hyperbilirubinémie légère à modérée. La maladie est provoquée par des mutations situées au niveau du promoteur du gène de la famille UGT1, plus précisément au niveau de la boîte TATA (42). Plus la séquence du promoteur est allongée par des séquences composées d'une adénine suivie d'une thymine (séquences de TA), plus l'affinité pour le facteur de transcription diminue et plus la transcription du gène est faible, résultant en une diminution de la synthèse de l'UGT1A1 et une diminution de la conjugaison de la bilirubine d'environ 30% par rapport à la normale (42, 43).

Famille UGT2B

La famille UGT2 est divisée en deux sous-familles, UGT2A et UGT2B. La sous-famille 2A ne contient qu'un isoforme connu jusqu'à maintenant, UGT2A1, présent dans la muqueuse nasale (44). La sous-famille UGT2B contient sept isoformes (UGT2B4, B7, B10, B11, B15, B17 et B28) et cinq pseudogènes, tous codés par un gène différent pour chacun (37).

Localisation des UDP-GTs

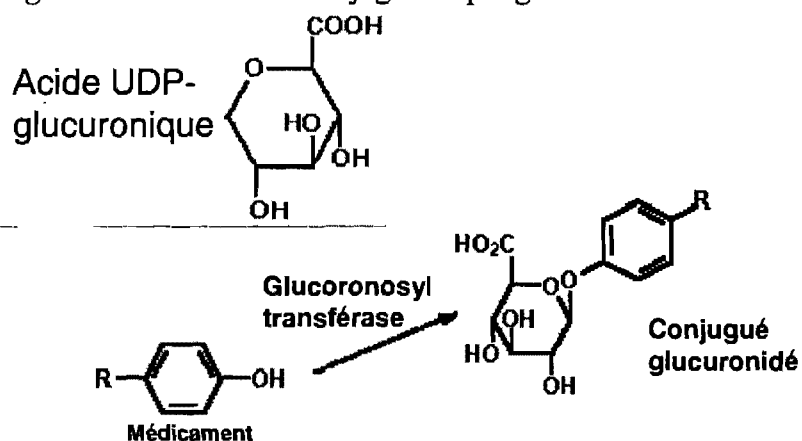
On retrouve les UDP-GTs dans plusieurs organes, entre autres dans le foie et l'intestin où elles y sont en plus grande concentration (25). Ce sont les seules enzymes de phase II qui sont microsomiales. Elles sont ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique par leur partie C-terminale, faisant face au côté luminal, leur donnant ainsi l'avantage d'avoir directement accès aux métabolites produits par les enzymes de phase I (45). Les conjugués glucuronidés sont polaires et très hydrosolubles. Ils sont donc facilement éliminés dans l'urine et la bile, tout dépendant du poids moléculaire de l'aglycon (5). Dans la majorité des cas, la glucuronidation permet d'inhiber l'activité pharmacologique des médicaments et d'éliminer les endobiotiques potentiellement toxiques. Cependant, il existe quelques exceptions où il doit y avoir glucuronidation

pour que le médicament soit actif. Par exemple, la glucuronidation de la morphine par l'UGT2B7 en position 6 donne la morphine-6-glucuronide, composé 50 fois plus efficace que la morphine (5, 28, 46).

Principe de la réaction de glucuronidation

Lors de la réaction de glucuronidation, il y a transfert de l'acide glucuronique à partir du co-facteur, l'acide UDP-glucuronique, sur un hétéroatome (O, N ou S) (figure 14) (5). À pH physiologique, l'acide carboxylique présent sur l'acide glucuronique est ionisé. C'est ce qui favorise l'excrétion du médicament glucuronidé, puisqu'il permet d'augmenter la solubilité de la molécule en phase aqueuse ainsi que sa reconnaissance par les transporteurs localisés au niveau du foie et des reins (5). Cependant, certains xénobiotiques ayant été N-hydroxylés auparavant par le CYP450, comme les arylamines par exemple, peuvent être par la suite N-glucuronidés par les UDP-glucuronosyltransférases. C'est le cas, entre autres, du 2-aminonaphtalène et du 4-aminobiphényl (retrouvés dans la fumée de cigarette) (47). Lorsque N-glucuronidés, ils s'accumulent dans l'urine au niveau de la vessie. À pH acide, ces molécules sont très instables et sont hydrolysées pour former des amines N-hydroxyaromatiques, composés très carcinogènes qui se lient à l'ADN et l'endommage (5, 48, 49).

Figure 14 : Réaction de conjugaison par glucuronidation

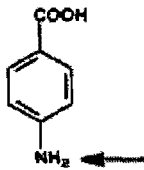
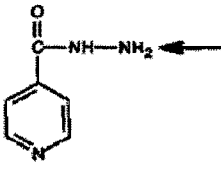
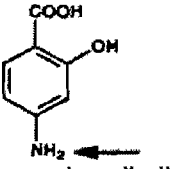
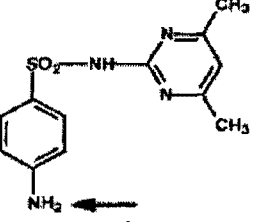
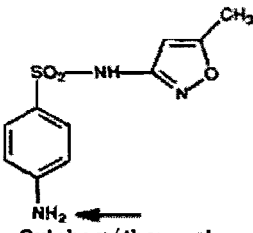
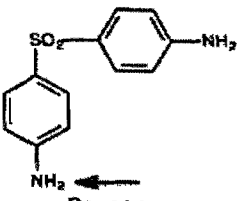


Acétylation

Contrairement aux autres réactions de phase II, le nombre d'isoformes chez les N-acétyltransférases (NATs) est plutôt limité. En effet, chez la plupart des espèces, dont l'humain, on ne retrouve que deux isoformes : N-acétyltransférase 1 et N-acétyltransférase 2 (NAT1 et NAT2) (5, 25, 28, 50). Récemment, un troisième isoforme nommé NAT3 a été caractérisé chez le rat et la souris (5, 51, 52). Cependant, cet isoforme possède une activité plus faible que les deux autres (51).

L'homologie entre les séquences nucléiques des isoformes est très grande (entre 79 et 95%). De plus, les deux protéines sont codées chacune par un gène situé sur le même chromosome (chromosome 8 chez l'humain). Malgré cela, NAT1 et NAT2 sont régulées de façon indépendante. En effet, NAT1 est principalement localisée de façon extrahépatique (vessie, côlon, glandes mammaires, poumons, reins, intestin grêle et glande pinéale) alors que NAT2 l'est dans le foie et l'intestin. Chacune des isoformes démontre une spécificité envers certains substrats, mais cette spécificité n'est pas totale, c'est-à-dire qu'aucun substrat n'est exclusif à l'une ou l'autre des isoformes (5). Par contre, certains substrats vont être préférentiellement acétylés par NAT1 ou NAT2 (figure 15). Chez l'humain, l'acide para-aminobenzoïque (PABA), l'acide para-aminosalicylique et le sulfanilamide font partie des substrats dont l'acétylation est principalement faite par NAT1. L'isoniazide, l'hydralazine, la procainamide, le dapson et la sulphaméthazine font partie des substrats préférentiellement acétylés par NAT2. Chez le rat, le PABA est plutôt un substrat pour NAT2 alors que la procainamide l'est pour NAT1. En général, parmi les substrats des N-acétyltransférases, on retrouve les xénobiotiques refermant un groupement amine aromatique (R-NH₂) ou hydrazine (R-NH-NH₂).

Figure 15 : Exemples de substrats pour NAT1 et NAT2

Substrats préférentiellement métabolisés par NAT1	Substrats préférentiellement métabolisés par NAT2
 <p>Acide <i>para</i>-aminobenzoïque</p>	 <p>Isoniazide</p>
 <p>Acide <i>para</i>-aminosalicylique</p>	 <p>Sulphaméthazine</p>
 <p>Sulphaméthoxazole</p>	 <p>Dapsone</p>

Tirée et traduite de : Klaassen, C.D., Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison. 6th ed. 2001: McGraw-Hill Professional Publishing.

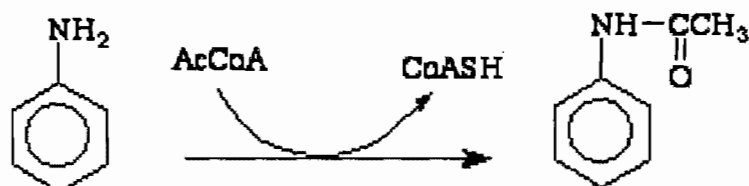
Tout comme dans le cas de la méthylation, l'acétylation ne permet pas d'augmenter l'hydrosolubilité des xénobiotiques. Au contraire, les métabolites vont plutôt être moins solubles que la molécule mère. En fait, lors de la réaction, la charge présente sur le groupement amine du xénobiotique est masquée par l'ajout d'un groupement acétyl (CHCO₃). Cependant, dans certains cas, comme celui de l'isoniazide, l'excrétion par l'urine sera néanmoins favorisée.

Le site actif des N-acétyltransférases renferme une triade catalytique importante dans l'activité de l'enzyme. Cette triade est constituée de trois résidus : une sérine, une arginine et une cystéine. C'est ce dernier résidu qui joue un rôle important dans la réaction d'acétylation. En premier lieu, il y a transfert du groupement acétyl (COCH₃) du co-facteur, l'acétyl coenzyme A (ACoA), sur le résidu cystéine du site actif de l'enzyme. Ensuite, après que le coenzyme A ait été libéré, le substrat peut se lier au site

actif pour que le transfert du groupement acétyl au groupement amine du xénobiotique ait lieu. C'est une réaction de type « ping-pong bibi », puisque le site actif des N-acétyltransférases n'a pas la capacité d'accepter simultanément deux substrats (voir figure 16b).

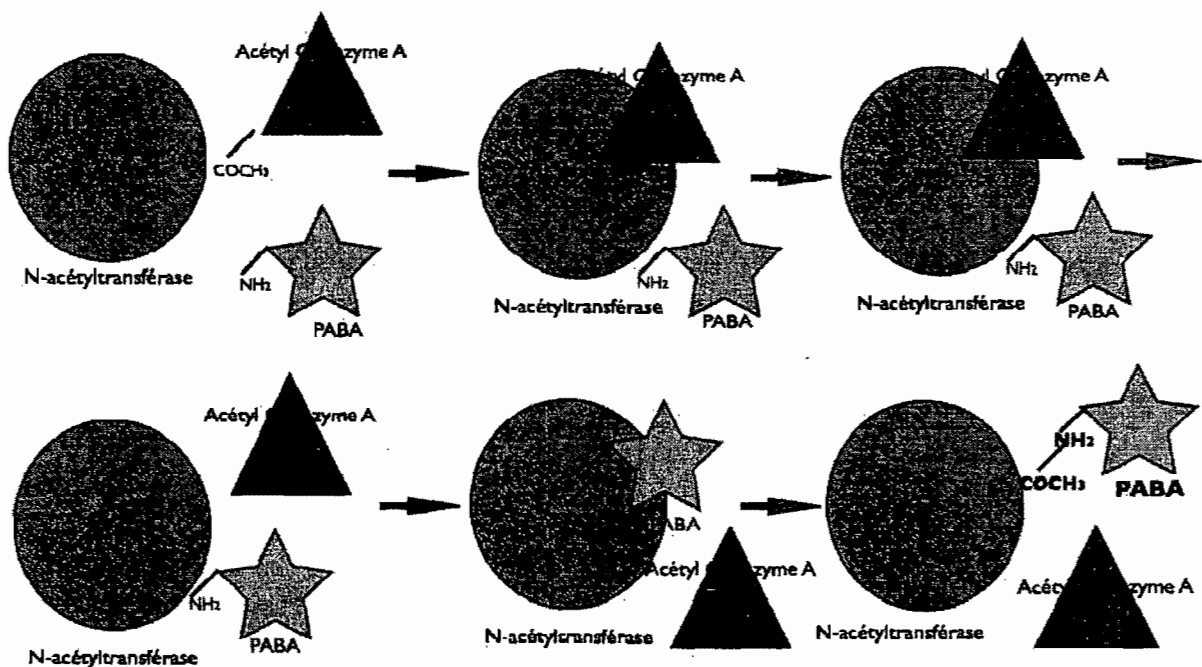
Figure 16 : Réaction d'acétylation (a) et réaction « ping-pong bibi » (b)

a)



<http://www.humboldt.edu/~rap1BiochSupp/BioTox/ChemEqa/N-acetylation.gif>

b)



Les N-acétyltransférases peuvent aussi bien inactiver qu'activer les amines aromatiques (53). En effet, la détoxification de ces dernières se fait par leur conversion en leurs amides aromatiques correspondants. Ces composés sont moins instables que les amines aromatiques et risquent moins d'être métabolisés pour donner des métabolites réactifs et dangereux pour l'ADN par le CYP1A2 ou les UDPGTs par exemple (5, 54, 55). Cependant, puisque les métabolites de phase I font partie des substrats des NATs, il peut arriver que des médicaments ou des xénobiotiques préalablement N-hydroxylés soient activés par acétylation. C'est le cas du 3,2'-diméthyl-4-aminobiphényl (DMABP) qui est un carcinogène reconnu chez les rongeurs et très utilisé dans les études puisque sa composition chimique ressemble beaucoup à celle des substances mutagènes retrouvées dans la nourriture brûlée (56, 57). Après avoir été N-hydroxylé, si le N-hydroxyle-DMABP entre en contact avec les NATs, il sera O-acétylé pour donner un N-acétoxy-DMABP, composé très instable et automatiquement hydrolysé pour donner un ion arylnitrenium très électrophile et pouvant induire des lésions à l'ADN en s'y liant de façon covalente (58, 59).

Il existe d'autres types de N-acétyltransférases dans le corps humain qui ne sont toutefois pas impliquées dans le métabolisme des médicaments. Il s'agit des arylalkylamine-n-acétyltransférases (AA-NAT) et des spermines/spermidines-N1-acétyltransférases (SSAT). Les AA-NAT sont impliquées dans la synthèse de la mélatonine et du cycle circadien au niveau du cerveau (60). Quant aux SSAT, ce sont des enzymes clés dans le catabolisme des polyamines (spermidine, spermine) qui jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire (61).

Les effets de l'insuffisance rénale chronique sur la biotransformation des médicaments

Les patients souffrants d'IRC ont des problèmes de toxicité suite à la prise de leurs médicaments. Cette toxicité est due à l'effet néfaste de la maladie sur l'absorption, la distribution et l'excrétion des médicaments. Parce que la fonction du rein est altérée, les

médicaments qui sont normalement éliminés dans l'urine s'accumulent dans le sang et dans les tissus et ce, à doses usuelles (62, 63). Lorsque la toxicité est trop importante, il y a un réajustement des doses des médicaments par le médecin traitant selon le degré de sévérité de la maladie pour chacun des patients. Cependant, même après ajustement des doses, environ 40% de ces patients démontrent encore des problèmes de toxicité (63, 64).

Absorption et distribution

L'IRC a peu de répercussions directes au niveau de l'absorption, si ce n'est une augmentation de la biodisponibilité des médicaments due à l'altération du pH intestinal. En effet, les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique prennent souvent des agents chélateurs du phosphore, des antiacides ou d'autres médications qui altèrent le pH intestinal et la motilité intestinale (65-68). La biodisponibilité des médicaments acides est altérée par l'augmentation du pH intestinal puisque ces médicaments sont normalement ionisés et plus solubles dans un environnement acide. Un pH plus alcalin limite donc leur absorption (67, 69).

Cependant, la liaison des médicaments aux protéines plasmatiques est modifiée. L'albumine, à laquelle se lie les médicaments acides, est diminuée (hypoalbuminémie) chez les patients IRC comparativement aux patients sains. En effet, l'IRC provoque un déséquilibre de l'équilibre entre les cytokines pro et anti-inflammatoires qui, en lien avec l'accumulation de déchets urémiques, contribue à la diminution de la synthèse de l'albumine (70). La fraction libre des médicaments acides tels que la pénicilline, le furosémide et les salicylates sera plus importante. De plus, l'accumulation des toxines urémiques ainsi que la carbamylation de l'albumine contribuent à réduire les sites de liaison pour les médicaments. En effet, l'accumulation des toxines crée de la compétition avec les médicaments pour les sites de liaison à l'albumine. Quant au phénomène de carbamylation, il consiste en une réaction post-traductionnelle non enzymatique entre l'acide isocyanique (un dérivé de l'urée) et l'hémoglobine bloquant ainsi les sites de liaison à l'hémoglobine (71-73). Chez les patients, la diminution de la liaison aux protéines plasmatiques causée par l'IRC contribue à l'accumulation des

médicaments débits dépendants, alors qu'elle cause une augmentation de la clairance des médicament débits indépendants (62, 63, 65, 69, 74-77).

Enzymes de phase I

Chez l'humain, il a été démontré que l'insuffisance rénale chronique diminue la clairance métabolique de nombreux médicaments (62, 63, 78-82). De plus, la plupart de ces médicaments sont métabolisés par le foie, suggérant une altération du métabolisme hépatique en IRC. Si on regarde de plus près, on remarque que la majorité de ces médicaments sont métabolisés par les enzymes du cytochrome P450 (CYP3A4, CYP2D6 CYP2C19), suggérant une altération de l'activité ou même de l'expression de ces enzymes en IRC (76, 79, 81-83). Cependant, puisqu'il est impossible de faire des études sur l'expression des différentes isoformes chez l'humain, quelques méthodes ont permis d'évaluer l'activité *in vivo* du CYP450, entre autres, par l'administration de substrats métabolisés spécifiquement par un isoforme donné (84). Par exemple, Kevorkian *et al.* ont démontré une diminution de la clairance métabolique de la spartéine (marqueur de l'activité du CYP2D6), suggérant une diminution de l'activité du CYP2D6 chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (85). Dowling *et al.*, quant à eux, ont démontré une diminution de l'activité du CYP3A4 chez l'humain. Lors de tests d'exhalation, le métabolisme de l'érythromycine marquée au carbone 14 était diminué chez les patients insuffisants rénaux comparés aux patients sains (86).

Afin de pouvoir évaluer les répercussions de l'IRC sur l'expression des différentes isoformes du P450, des études sur des modèles animaux ont été menées. Chez le rat, le foie renferme de nombreuses isoformes du P450 tels que CYP1A2, CYP2C11, CYP2D, CYP2E1 et CYP3A1/2 (87, 88). Même si quelques études ont démontré que l'IRC avait des répercussions sur le CYP total dans le foie, il est important de savoir quelles sont les isoformes qui subissent une diminution de leur expression afin de prévenir la toxicité liée à une diminution du métabolisme par ces isoformes. Uchida *et al.* sont les premiers à avoir démontré, toujours chez le rat souffrant d'IRC, une diminution dans le foie de l'expression protéique des isoformes CYP2D6, 2C11 et 3A2 (89). C'est par la

suite que Leblond *et al.* ont mesuré une diminution *in vivo* de 35% de la N-déméthylation de l'aminopyrine et de l'érythromycine chez les rats IRC. Ces résultats démontrent une diminution de l'activité des isoformes CYP2C11 et CYP3A1/2, secondaire à une diminution de leur expression protéique (90). Finalement, il a été démontré que la diminution de l'expression protéique du CYP450 (isoformes 2C11, 3A1/2) dans le foie est due à la diminution de son expression génique (88). Il a aussi été observé que les isoformes CYP1A1 et 3A2 subissent une diminution de leur expression au niveau de l'intestin chez le rat. Cette diminution est aussi causée par la diminution de l'expression génique de ces isoformes (91). Autant au niveau du foie que de l'intestin, une corrélation entre le degré de sévérité de l'insuffisance rénale et la diminution du CYP450 a été observée (88, 91). Les isoformes 1A1 et 3A2 chez le rat correspondent aux isoformes 1A1 et 3A4 de l'humain. Ces isoformes sont responsables du métabolisme de nombreuses drogues administrées aux patients insuffisants rénaux, dont le tacrolimus et l'érythromycine. Ces résultats au niveau du foie et de l'intestin peuvent donc expliquer pourquoi la biodisponibilité du tacrolimus et de l'érythromycine est augmentée de plus de 30% chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique (91-93).

Par quel mécanisme l'IRC produit-elle une diminution de l'activité des enzymes de phase I? L'hypothèse d'un ou de plusieurs facteurs urémiques a souvent été évoquée et démontrée récemment. En effet, l'expression du CYP450 (CYP1A2, 2C6, 2C11, 2D, 3A4 et 4A) est diminuée dans des hépatocytes de rats lorsque ceux-ci sont incubés en présence de sérum de patient atteints d'IRC (94). Il en est de même pour les isoformes CYP2C11 et 3A2, lorsque des hépatocytes de rats sont incubés avec du sérum de rats auxquels on a induit l'IRC (95).

On peut maintenant se demander : Quel serait ce ou ces facteurs urémiques? Une augmentation des concentrations sériques de plusieurs protéines a été observée chez les patients qui souffrent d'insuffisance rénale chronique. Parmi ces protéines, on retrouve la PTH ainsi que des cytokines pro-inflammatoires : interleukine-1 (IL-1), interleukine-6

(IL-6) et le facteur α de nécrose tumorale (TNF- α) (82). Différentes fractions du sérum d'humain, correspondant au poids moléculaire de certains facteurs urémiques, ont été testées sur des hépatocytes en culture. La fraction de sérum contenant les protéines dont le poids moléculaire se situe entre 10 et 15 kDa avait un effet inhibiteur sur l'expression du CYP450 (94). Or, non seulement l'hormone parathyroïdienne et certaines cytokines sont des substances dont les concentrations sériques sont augmentées en IRC, mais elles sont aussi des molécules dont le poids moléculaire est d'environ 15 kDa (94, 96).

Les cytokines sont déjà reconnues pour avoir un effet inhibiteur sur le CYP450 lors de l'inflammation (97, 98). Par ailleurs, l'inhibiteur de la synthèse protéique dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques par la PTH s'explique par une diminution de l'expression génique (99-101). Il existe aussi une corrélation entre la diminution du CYP450 et les taux de PTH sérique (94). Finalement, il a été démontré que lorsque des hépatocytes de rats sont incubés en présence de concentrations de PTH similaires à celles retrouvées dans le sérum des patients qui souffrent d'insuffisance rénale chronique ($1 \times 10^{-9} \text{M}$), il y a une diminution de l'expression du CYP450 (3A2, 1A1 et 2C11) (21). Lorsqu'il y a pré incubation des hépatocytes en présence d'inhibiteurs de la voie du NF- κ B, l'ajout de PTH au milieu de culture ne modifie pas l'expression du CYP450 par rapport aux cultures témoins (21). De plus, lorsque des rats néphrectomisés subissent une parathyroïdectomie, l'expression des enzymes hépatiques du CYP450 ne subit pas de modifications et les niveaux protéiques et géniques sont semblables à ceux observés chez les rats témoins (21). Ces résultats confirment le fait que la PTH serait un facteur majeur dans l'inhibition de l'expression du CYP450 en insuffisance rénale chronique.

Enzymes de phase II

Jusqu'à ce jour, peu d'études ont évalué les répercussions de l'insuffisance rénale chronique sur l'expression des enzymes de phase II, que ce soit chez l'humain ou l'animal. Quelques études cliniques ont démontré que le métabolisme de la zidovudine, de la morphine ainsi que du métoclopramide, médicaments métabolisés majoritairement

par glucuronidation, était altéré en IRC (102-105). Plus récemment, chez le rat, Yu *et al.* ont démontré que l'IRC n'altérait pas l'expression des UGTs (106). Cependant, leur étude ne comprenait que quatre animaux par groupe et le niveau d'insuffisance rénale était faible.

Concernant l'acétylation, quelques études cliniques ont prouvé que les concentrations sériques de la procainamide restaient élevées plus longtemps chez les patients souffrant d'IRC que chez les personnes saines (62, 107-110). Il en est de même pour l'isoniazide, un médicament antituberculeux (111). Ces résultats suggèrent que l'acétylation est altérée en insuffisance rénale chronique. Par contre, aucune étude n'a été faite concernant l'impact de l'IRC sur l'expression des N-acétyltransférases chez le rat. Puisque des études sur la glucuronidation ont déjà été faites et que l'acétylation est une voie importante de la biotransformation par les enzymes de phase II, ce sont les N-acétyltransférases que nous avons décidé d'étudier.


L'hypothèse de ce projet de maîtrise était que l'IRC entraîne des modulations de l'acétylation au niveau hépatique. Nous avons aussi proposé que l'expression des NATs pourrait être modulées par des facteurs urémiques, particulièrement la PTH.

Ce projet a permis, dans un premier temps, de vérifier si oui ou non l'expression hépatique de NAT1 et de NAT2 était altérée chez le rat néphrectomisé. Ensuite, c'est par l'étude de l'expression de ces mêmes enzymes dans des hépatocytes en culture, en présence de sérum de rats néphrectomisés, qu'il a été possible d'établir si les changements observés étaient dus à la présence d'un facteur sérique. Puisque la PTH est reconnue comme étant un des facteurs de l'insuffisance rénale chronique pouvant inhiber l'expression du CYP450 de façon majeure (21), son effet a aussi été étudié sur l'expression des N-acétyltransférases dans des hépatocytes en culture, incubés en sa présence et/ou en présence d'un inhibiteur de la voie de NF- κ B, l'andrographolide (112). Finalement, l'expression des NATs a aussi été étudiée dans le foie de rats néphrectomisés et ayant subi ou non une parathyroïdectomie.

Down-regulation of hepatic drug acetylation in chronic renal failure

Emilie Simard^{1,2}, Judith Naud M Sc^{1,2}, Josée Michaud M Sc^{1,2}, Francois A. Leblond Ph.D¹, Alain Bonnardeaux MD, Ph.D¹, Chantal Guillemette Ph.D³, Edith Sim Ph.D⁴
and Vincent Pichette MD Ph.D^{1,2}

¹Service de néphrologie et Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont,
²Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Canada, ³Faculté de pharmacie, Université Laval, Québec, Canada, and
⁴Department of Pharmacology, University of Oxford, UK

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

Short title: Decreased acetylation in CRF

Abstract: 250 words

Article : 3262 words

ABSTRACT.

Chronic renal failure (CRF) is associated with a decrease in drug metabolism, particularly those mediated by the cytochrome P450. Indeed, many studies have shown a reduction in liver and intestinal P450 isoforms in CRF. However none had evaluated the effects of CRF on N-acetyltransferase (NAT) even though several drugs cleared by acetylation accumulate in CRF. The present study describes the repercussions of CRF on liver acetylation and defines the mechanism of its down-regulation. Four groups of rats were studied: control, CRF, parathyroidectomized (PTX), and CRF-PTX. Nat1 and Nat2 protein expressions, mRNA levels, and their metabolic activity were assessed. The effects of CRF serum on Nats expression and activities were also evaluated in hepatocytes. Compared to control, liver protein and gene expressions of Nat1 and Nat2 were reduced by more than 30%, ($p < 0.01$) in CRF rats. Nat2 activity was reduced by 50% ($p < 0.001$) in CRF rats. Incubation of hepatocytes with CRF serum induced a decrease of 40% ($p < 0.005$) and 30% ($p < 0.01$) in Nats protein and gene expression respectively, suggesting that a circulating factor is responsible for this decrease. The down-regulation of *Nat* expression and activity in CRF rats was not observed when they were parathyroidectomized. Adding parathyroid hormone (10^{-9} M) to cultured hepatocytes induced a decrease in NAT2 protein and gene expressions. In conclusion, liver acetylation of drugs in a rat model of CRF is reduced by a down-regulation of Nat1 and Nat2 isoforms, secondary to a decreased gene expression. Parathyroid hormone appears to be an important mediator implicated in this phenomenon.

INTRODUCTION

Reduction in renal function alters the disposition of many drugs mainly by decreasing the elimination of those excreted by the kidney.^{1,2} However, drug metabolism by the liver may also be altered in patients with chronic renal failure (CRF)³ Indeed, several studies have shown that the metabolic clearance of various substrates is reduced in patients with chronic renal failure (CRF)¹⁻¹⁰ Liver enzymes implicated in drug metabolism are classified in phase I (mainly oxidative reaction mediated by cytochrome P450) and phase II (conjugation reactions). Up to now, the studies on the repercussions of CRF on drug metabolism have been primarily focused on cytochrome P450 (P450). Indeed, several studies have demonstrated that CRF in rats was associated with a reduction in protein and gene expression as well as a significant decrease in the activity of several liver cytochrome P450 isoforms.¹¹⁻¹⁶ Moreover, we recently reported that this decrease was secondary to uremic circulating factors, particularly parathyroid hormone (PTH).¹⁷

However, phase II enzymes are also critical for the metabolism of drugs.^{18,19} These enzymes are responsible for the conjugation of drugs and glucuronidation mediated by uridine diphosphate-glucuronosyl transferase (UGT) and acetylation mediated by N-acetyltransferases (NATs) are among the most important reactions.¹⁹ Interestingly, several human studies have reported a reduction in the liver metabolism of drugs that are cleared by glucuronidation or acetylation in patient suffering CRF, suggesting that CRF could impede these metabolic pathways.⁶⁻⁹ For instance, zidovudine and morphine (two glucuronidated molecules) have a significantly reduced metabolic clearance in CRF.^{20,21} Moreover, several drugs extensively acetylated (isoniazid, procainamide) are also accumulating in patients with decreased renal function,^{2,22-24} suggesting a reduction in hepatic acetylation. Recently, Yu *et al.* have shown that liver UGT was unchanged in a CRF rat model.²⁵ However, no study has been done on the effect of CRF on hepatic acetylation in rat.

Human N-acetyltransferases are composed of two isoforms (NAT1 and NAT2) and both are involved in drug metabolism processes, although human NAT1 is also thought to have an endogenous role.²⁶ These enzymes are expressed in the liver; they catalyze acetyl group transfer from acetyl-coenzyme A, to an aromatic or heterocyclic amine, hydrazine, hydrazide or *N*-hydroxylamine acceptor substrate. NATs metabolize several drugs such as sulfonamides and isoniazid.²⁶ In the rat, similar to human, there are two isoforms (Nat1 and Nat2), although a third isoform (Nat3) with less metabolic activity has been recently characterized.²⁷

The objectives of this study were to determine the effects of CRF on hepatic N-acetyltransferases and to define the mechanisms leading to their down-regulation. For this purpose, we measured in control and CRF rats 1) liver Nat1 and 2 protein and gene expression and 2) Specific metabolic activity of Nat2. We also evaluate the effects of uremic serum on *Nat1* and *Nat2* expression by incubating normal rat hepatocytes with control or CRF sera. Finally, the implication of parathyroid hormone (PTH) (as a potential uremic factor) in the down-regulation of rat *Nat* genes was also evaluated *in vivo* in parathyroidectomized rats, and *in vitro* in rat hepatocytes incubated with PTH.

RESULTS

Biochemical parameters and body weight in control and CRF rats (Table 1).

Table 1 presents the body weight and the biochemical parameters of the animals studied. As shown, body weights were similar in all groups. CRF rats had higher levels of plasma creatinine and a lower creatinine clearance reduced by 79% ($p < 0.001$) compared to control rats.

Nat isoforms in the liver (Figure 1 and 2).

The levels of Nat1 and Nat2 in CRF rats (n=10) liver were reduced by 33 and 50 %, respectively in CRF rats compared to control ($p < 0.001$) (n=8) (Figure 1). There was

a significant negative correlation of Nat protein levels and creatinine clearance ($r=0.76$, $p<0.001$). In order to evaluate if the down-regulation of *Nat* in the liver of CRF rat was secondary to a decrease in the proteins synthesis, mRNA encoding the different isoforms were evaluated by multiplex qPCR. This reveals a significant decrease in mRNA encoding *Nat1* and *Nat2* in CRF animals ($n=19$) compared to control subjects ($n=16$) (Figure 2). Thus, the decrease in protein levels of the different Nat isoforms observed in CRF is secondary to reduced gene expression.

***In vitro* metabolism of p-aminobenzoic acid (PABA) (Figure 3).**

To determine the repercussion of CRF on the metabolism of drugs by Nats, the *in vitro* N-acetylation of PABA (Sigma) has been assessed in liver cytosols. This enzymatic reaction is mediated primarily by the rat Nat2 isoform. The N-acetylation of PABA was decreased by 50% in rats with CRF ($n=8$), compared to control animals ($p<0.001$; $n=6$) (Figure 3).

Effects of uremic serum on Nat protein and mRNA levels (Figure 4).

The objective of this experiment was to determine the effects of CRF serum on liver Nats. Following 48 hours of incubation of normal hepatocytes with serum (10%) from rats with CRF ($n=15$), the amounts of Nat1 and 2 proteins were decreased by 40 and 57% ($p<0.005$), respectively, compared to hepatocytes incubated with serum from control animals ($n=12$) (Figure 4a). The mRNA levels of *Nat1* and *Nat2* were both decreased by 30% ($p<0.005$) (Figure 4b). Thus, uremic serum contains mediator(s) that down-regulate *Nat* expression in normal hepatocytes.

Physical and biochemical characteristics of PTX rats (Table 2).

To clarify the role of PTH in the down-regulation of *Nat* genes, some CRF ($n=6$) and control ($n=6$) rats were surgically treated to remove parathyroid glands. Table 2 presents the body weight and the biochemical characteristics of the animals used in this experiment. Once again, no difference was observed between groups for body weights while clearance and creatinine were significantly reduced in both CRF groups. There

was a forty-fold increase in PTH in CRF rats, confirming the severity of secondary hyperparathyroidism in these animals. PTH was undetectable in rats with PTX.

Role of PTH in the *in vivo* down-regulation of rat *Nat1* and *Nat2* induced by CRF (figure 5 and 6)

To determine whether PTH was implicated in the *in vivo* decrease of Nat by CRF, we evaluated the effects of PTX in CRF rats on Nat 1 and 2 protein levels. As shown in Figure 5, preventing the development of secondary hyperparathyroidism by PTX prevents the negative effect of CRF on Nat2 protein and the *Nat2* gene. We also observed a significant difference in Nat2 metabolic activity in CRF-PTX rats compared to CRF subjects (Figure 5). Similar results were obtained for NAT1 (Figure 6)

***In vitro* effect of PTH on Nat2 in cultured hepatocytes (Figure 7)**

To confirm the implication of the PTH in the down-regulation of *Nat 2* in CRF, we incubated normal hepatocytes during 48 hours with 10^{-9} M synthetic 1-34 rat PTH (n=12). As shown on Table 2, this concentration of PTH is similar to the one observed *in vivo* in our CRF rats. The effects of PTH on the Nat2 protein and mRNA levels are shown on Figure 7. When hepatocytes were incubated with PTH, Nat2 protein and *Nat2* mRNA levels were decreased by 80% ($p<0.01$) and 25% ($p<0.01$) respectively. There was no effect of PTH on other control hepatocytes proteins (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Aspartate aminotransferase or β -actin) (Data not shown).

Although PTH could act via several signalling pathways, we tested the hypothesis that the down-regulation of *Nat2* was through activation of NF- κ B, as previously shown for CYP450¹⁷. Addition of 30 μ M andrographolide to hepatocytes cultured in presence of 10^{-9} M PTH (n=6) prevents the decrease in *Nat2* gene expression induced by PTH with a subsequent effect on Nat2 protein level (Figure 7).

DISCUSSION

This study demonstrates that in the rat, CRF induces a marked decrease in liver protein levels of Nat1 and Nat2 isoforms, secondary to a reduction in the levels of mRNA encoding these proteins. The repercussions on the metabolism of drugs by the liver are important, since we observed a 50% reduction of PABA metabolism mediated by Nat2 isoform. The mechanism underlying the down-regulation of *Nat* genes is the presence of endogenous inhibitors in the uremic blood, PTH being one of the major inhibitors.

Enzymatic reactions leading to drug biotransformation are classified in phase I and phase II reactions. Phase I reactions usually convert parent drugs to a more polar metabolite and are mediated by cytochrome P450. On the other hand, parent drugs or their phase I metabolites could also undergo conjugation reactions with an endogenous substrate, such as glucuronic acid, acetic acid or sulfuric acid, to yield drug conjugates. The two major phase II reactions implicated in drug metabolism are glucuronidation, mediated by UGT, and acetylation, mediated by Nats.

Renal failure has been generally thought to mainly decrease the renal clearance of drugs^{1,2}. However, many studies have demonstrated that humans with CRF also present decreased hepatic drug metabolism¹⁻¹⁰. Since the cytochrome P450 is the major enzymatic system involved in drug biotransformation, most studies have focused on liver P450. The results of these studies showed that in CRF rats, liver total P450, several P450 isoforms^{11-16,28} and enzymatic reactions normally carried by the liver P450 are significantly decreased¹⁰. We also showed that both patients and rats uremic serum contain mediator(s) that down-regulate liver P450^{29,30}.

Many drugs commonly used in clinical practice are metabolized by phase II enzymes. Several pharmacokinetics studies have revealed a decrease in glucuronidation or acetylation of drugs in CRF patients, suggesting that not only P450 could be altered

in CRF but also phase II enzymes. For instance, the metabolism of zidovudine and metoclopramide, which is primarily mediated by glucuronidation, is reduced in patients with renal failure^{20,31,32}. Acetylation also appears to be reduced in patients with CRF; several reports have demonstrated that the metabolic clearance of procainamide is reduced by approximately 60% in renal failure^{2,23,24}. Moreover, a decrease in the acetylation of isoniazid has also been reported in patients with CRF²².

The mechanism leading to a decrease in phase II enzymatic reactions in CRF is unknown. While many animal studies have been done on P450, very few have been performed on the effects of CRF on phase II enzymes. Paterson and Cohn studied the uridine diphosphate (UDP)-glucuronyl transferase activity in microsomes from control and rats with CRF and reported a 19% reduction in UDP-glucuronyl transferase activity, although this difference was not significant ($p=0.06$)¹⁴. More recently, Yu *et al.* did not confirm these results since they found no significant difference in liver UGT in CRF rats compared to control animals, although the number of animals was small ($n=4$ per group) and the degree of renal failure was moderate²⁵. On the other hand, Taburet *et al.* reported that incubation of microsomes, prepared from healthy human livers, with serum of patients with CRF was associated with a decrease in the metabolism of zidovudine, reflecting an inhibition of UDP-glucuronosyltransferase³³, and suggesting that uremic mediator(s) are responsible for the reduction in drug metabolism.

Our study is the first to evaluate the effects of CRF on acetylation of drugs. Our results demonstrate a significant decrease in both Nat1 and Nat2 with a major impact on their *in vitro* activity. Interestingly, we found a strong correlation between creatinine clearance and protein expression, suggesting that as renal function decrease, down-regulation of Nats are more important. As shown for CYP450, the mechanism of protein down-regulation is secondary to a reduced gene expression. These results could explain why the clearance of drugs cleared by acetylation is reduced in patients with CRF.

Another hypothesis to explain decrease drug metabolism in CRF have been raised by Sun *et al.* which demonstrated that hepatic uptake of erythromycin (a CYP450 substrate) by hepatocytes incubated with uremic toxins was decreased^{34,35}. Since uptake by hepatic transporters (such as organic anion transporter protein, Oatp) is the first step in the elimination of several drugs, making it available for metabolizing enzymes, a decrease in Oatp as shown in hepatocytes incubated with uremic toxins and more recently in CRF rats could probably explain in part the decrease in drug metabolism induced by CRF³⁴⁻³⁶. In the present study we found a decrease in Nat activity using cytosolic preparations which only reflect the metabolic activity and not the uptake or the efflux of drugs that could also be modulated in CRF.

In the present study, we tested the hypothesis that uremic mediators were implicated in the decrease of NATs in CRF. The results clearly demonstrate that uremic serum contains mediator(s) able to down-regulate hepatic NATs. Interestingly, the results obtained with uremic serum also closely mimic what we showed *in vivo* in rats with CRF (Figure 1 and 4). Our results also demonstrate that there is an association between lower levels of Nat mRNAs and the corresponding protein (Figure 4a and 4b) in hepatocytes incubated with serum from rats with CRF. This suggests that gene expression is reduced by mediator(s) present in uremic serum. Although the mechanisms responsible for the diminished hepatic gene expression in CRF are not known, the present study suggests that uremic mediator(s) could affect *NAT* promoters.

CRF is often associated with secondary hyperparathyroidism. High level of PTH have been linked to impaired protein synthesis, by reduced gene expression, in the liver, the skeletal muscle and the cardiomyocytes³⁷⁻³⁹. More recently, we also showed that PTH was an important factor implicated in the decreased of liver P450 in CRF¹⁷. In the present study we tested the hypothesis that PTH could also be implicated in the decrease in liver acetylation. First, we evaluated whether PTX could prevent the down-regulation of *Nat* genes. As shown in Figure 5 and 6, PTX-CRF rats have essentially the same level and metabolic activity of Nat as control rats, demonstrating that PTH is a major *in vivo*

mediator of CRF-induced down-regulation of *Nat2*. Moreover, our results also demonstrate that PTH could decrease *Nat2* gene expression and cause a corresponding reduction in Nat2 protein in normal hepatocytes (Figure 7).

Our results emphasize the deleterious effects of PTH on protein synthesis by the liver. The signalling pathway through which this occur remains poorly described. PTH could act by an increase in cAMP or intracellular calcium^{40,41}. More recently, we have suggested that PTH could also act by activation of NF- κ B to down-regulate liver CYP450¹⁷. In the present study, we also demonstrated that inhibiting the activation of NF- κ B prevents the decrease of Nat activity induced by PTH in culture hepatocytes. Further studies are needed to elucidate the effect of PTH on NAT and to investigate further the possible role of transcription factors including NF- κ B.

In conclusion, this study demonstrates that CRF induces a decrease in rat Nat1 and Nat2 protein secondary to a decrease in gene expression. We also found a major reduction of Nat2 activity which could explain the decrease in drug acetylation observed in patients with CRF. As shown for other major liver enzymes, the results of this study emphasize the fact that uremic serum contains mediators that down-regulate hepatic protein synthesis. PTH appears to be a major culprit in hepatocellular dysfunction in CRF.

MATERIALS AND METHODS

Experimental model.

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Saint-Charles, PQ), weighing 200 to 300 g were housed in the Research Center animal care facility and maintained on Harlan Teklad rodent diet (Harlan Teklad Global Diets, Montreal, Canada) and water *ad libitum*. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals, and under the supervision of our local animal care committee.

Chronic renal failure was induced by two stage five-sixth nephrectomy as previously reported¹⁵. Control rats were pair-fed the same quantity of rat chow that was ingested by the rats with CRF on the previous day. At day 41 after the nephrectomy, the rats were housed in metabolic cages and urine was collected for 24 hours to determine the clearance of creatinine. Rats were sacrificed by decapitation at 42 days after nephrectomy. Blood and tissues were stored at -80°C up to analysis.

Total parathyroidectomy (PTX) was performed, as previously described^{17,37}, 7 days before the first nephrectomy. To avoid hypocalcemia, rats were then supplemented in calcium by adding calcium gluconate to drinking water (control 2.5%; CRF 5%). Control rats received sham surgery in the neck region.

Primary hepatocytes culture

Hepatocytes were isolated from normal rats according to the two-step liver perfusion method of Seglen as previously published²⁹. Collagenase Type 4 (Worthington, Lakewood, NJ) was used. Isolated hepatocytes were plated and cultured in 2 ml of William E medium containing 10% of serum from rats with CRF or from control animals. The serum of one rat was used for one experiment. Hepatocytes were incubated during 48 hours and were then harvested by scraping. Samples were stored at -80°C up to analysis.

To assess whether liver Nat2 could be down-regulated by PTH, we measured the ability of rat synthetic 1-34 PTH (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) to depress the NATs of normal hepatocytes. The concentration of PTH used was 10^{-9} M. Incubation time was 48 hours (media was changed completely after 24 hours to maintain PTH concentration).

To determine whether NF- κ B pathway could be involved in the effect of PTH on Nat2, we blocked this pathway using andrographolide (Calbiochem, San Diego, CA) a well known NF- κ B inhibitor⁴².

Liver cytosol preparation.

Cytosols were prepared according to the method of Schneck *et al.*⁴³ with slight modifications.

Western blot analysis.

Nat1 and Nat2 were assessed by western blotting according to previously published procedure^{44,45}. Rat Nat2 was detected using a specific polyclonal rabbit antiserum, raised against the C-terminal dodecapeptide common to Human NAT1 and mouse and rat Nat2 as previously described⁴⁶. β -actin was detected using a mouse anti-chicken β -actin (Neo-Markers, Fremont, CA). Immune complexes were revealed by peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore Pike, West Grove, PA) and goat anti-mouse IgG coupled to peroxidase (Sigma) respectively.

Rat Nat1 was detected using rabbit anti-rat antibodies recognizing both Nat1 and Nat2. In order to achieve a specific quantification of rat Nat1, the Nat2 isoform is immunoprecipitated prior to SDS-gel electrophoresis. Cytosols were diluted 1:1 with IP buffer pH 7.4 (300 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA pH 8, 0.1% Tween 20) to which Complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) was added. Diluted cytosols were incubated with the same amount of pre-washed Protein A Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences inc., Baie d'Urfé, Canada) for 10 minutes at 4°C and then centrifuged for 1 minute to pellet the beads. The supernatant was subsequently incubated with anti-NAT2 for 2 hours at 4°C. Fresh Protein A Sepharose CL-4B was added to the samples and incubation was continued overnight at 4°C. Sepharose beads were removed by centrifugation and supernatants were frozen up to analysis of rat Nat1 by Western blot.

RNA isolation and real-time quantitative polymerase chain reaction analysis.

Total RNA were extracted from liver and hepatocytes by using the RNeasy Midi and Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ont, Canada), respectively. Specific primer and

probes sets for rat N-acetyltransferases 1 and 2⁴⁷ and for glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)⁴⁸ were used for qPCR analysis. Resulting data were processed by the delta C_t method⁴⁹.

Evaluation of NAT2 activity.

The metabolic activity of rat Nat2 in either treated hepatocytes or cytosolic liver preparation of the different groups of rats was determined based on the method described by Andres *et al.*⁵⁰ which has been modified by Mattano and Weber⁵¹. The method measures the production of N-acetyl-p-aminobenzoic acid (NAPABA) while samples are incubated with PABA. Controls and samples were run in triplicate.

Other assays.

PTH was measured by using the Rat intact PTH ELISA Kit (Alpco Diagnostics, Salem, NH), which measure the intact 1-84 PTH. The lowest detectable level is 1.6 pg/ml.

Statistical analysis.

The results are expressed as mean \pm standard error over the mean (S.E.M.). Differences between groups were assessed by using either unpaired Student's *t* test or an ANOVA test followed by Scheffe post-hoc comparison. The threshold of significance was $p < 0.05$.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Vincent Pichette is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. Edith Sim thanks the Wellcome Trust for financial support. Part of this work have been presented at the 14th North American International Society for the Study of Xenobiotic meeting held in Rio Grande, Puerto Rico, October 22 to 26th 2006.

REFERENCES

- 1 Matzke GR, Frye RF: Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* 16: 205-231, 1997
- 2 Lam YW, Banerji S, Hatfield C, Talbert RL: Principles of drug administration in renal insufficiency. *Clin Pharmacokinet* 32: 30-57, 1997
- 3 Touchette MA, Slaughter RL: The effect of renal failure on hepatic drug clearance. *DICP* 25: 1214-1224, 1991
- 4 Talbert RL: Drug dosing in renal insufficiency. *J Clin Pharmacol* 34: 99-110, 1994
- 5 Cantu TG, Ellerbeck EF, Yun SW, Castine SD, Kornhauser DM: Drug prescribing for patients with changing renal function. *Am J Hosp Pharm* 49: 2944-2948, 1992
- 6 Pichette V, Leblond F: Metabolism of drugs in chronic renal failure. *Recent Res Devel Drug Metabol Disposition* 1: 43-56, 2002
- 7 Pichette V, Leblond FA: Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* 4: 91-103., 2003
- 8 Nolin TD, Frye RF, Matzke GR: Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis* 42: 906-925., 2003
- 9 Dreisbach AW, Lertora JJ: The effect of chronic renal failure on hepatic drug metabolism and drug disposition. *Semin Dial* 16: 45-50., 2003
- 10 Gibson TP: Renal disease and drug metabolism: an overview. *Am J Kidney Dis* 8: 7-17, 1986
- 11 Leber HW, Gleumes L, Schutterle G: Enzyme induction in the uremic liver. *Kidney Int Suppl* S43-48, 1978
- 12 Leber HW, Schutterle G: Oxidative drug metabolism in liver microsomes from uremic rats. *Kidney Int* 2: 152-158, 1972
- 13 Uchida N, Kurata N, Shimada K, Nishimura Y, Yasuda K, Hashimoto M, Uchida E, Yasuhara H: Changes of hepatic microsomal oxidative drug metabolizing enzymes in chronic renal failure (CRF) rats by partial nephrectomy. *Jpn J Pharmacol* 68: 431-439., 1995

- 14 Patterson SE, Cohn VH: Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure. *Biochem Pharmacol* 33: 711-716, 1984
- 15 Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, Pichette V: Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12: 326-332., 2001
- 16 Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP, Pichette V: Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos* 28: 1317-1320., 2000
- 17 Michaud J, Naud J, Chouinard J, Desy F, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, Pichette V: Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17: 3041-3048. Epub 2006 Oct 3044., 2006
- 18 Boukouvala S, Fakis G: Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug Metab Rev* 37: 511-564., 2005
- 19 Klaassen CD: Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th Edition, New York, McGraw-Hill Professional Publishing, 2001
- 20 Singlas E, Pioger JC, Taburet AM, Colin JN, Fillastre JP: Zidovudine disposition in patients with severe renal impairment: influence of hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther* 46: 190-197., 1989
- 21 Osborne R, Joel S, Grebenik K, Trew D, Slevin M: The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronides in kidney failure. *Clin Pharmacol Ther* 54: 158-167., 1993
- 22 Kim YG, Shin JG, Shin SG, Jang IJ, Kim S, Lee JS, Han JS, Cha YN: Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther* 54: 612-620, 1993
- 23 Karlsson E: Clinical pharmacokinetics of procainamide. *Clin Pharmacokinet* 3: 97-107., 1978
- 24 du Souich P, Erill S: Metabolism of procainamide in patients with chronic heart failure, chronic respiratory failure and chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 14: 21-27., 1978
- 25 Yu C, Ritter JK, Krieg RJ, Rege B, Karnes TH, Sarkar MA: Effect of chronic renal insufficiency on hepatic and renal udp-glucuronyltransferases in rats. *Drug Metab Dispos* 34: 621-627. Epub 2006 Jan 2013., 2006

- 26 Sim E, Westwood I, Fullam E: Arylamine N-acetyltransferases. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3: 169-184., 2007
- 27 Walraven JM, Doll MA, Hein DW: Identification and characterization of functional rat arylamine N-acetyltransferase 3: comparisons with rat arylamine N-acetyltransferases 1 and 2. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 369-375. Epub 2006 Jul 2007., 2006
- 28 Van Peer AP, Belpaire FM: Hepatic oxidative drug metabolism in rats with experimental renal failure. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 228: 180-183, 1977
- 29 Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V: Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* 137: 1039-1046., 2002
- 30 Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, Pichette V: Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol* 144: 1067-1077, 2005
- 31 Lehmann CR, Heironimus JD, Collins CB, O'Neil TJ, Pierson WP, Crowe JT, Melikian AP, Wright GJ: Metoclopramide kinetics in patients with impaired renal function and clearance by hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther* 37: 284-289., 1985
- 32 Bateman DN, Gokal R, Dodd TR, Blain PG: The pharmacokinetics of single doses of metoclopramide in renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 19: 437-441., 1981
- 33 Taburet AM, Vincent I, Perello L, Coret B, Baune B, Furlan V: Impairment of drug biotransformation in renal disease an in vitro model. *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics* 59: 136, 1996
- 34 Sun H, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ: Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos* 32: 1239-1246, 2004
- 35 Sun H, Frassetto L, Benet LZ: Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* 109: 1-11, 2006
- 36 Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond FA, Mitchell A, Jones C, Bonnardeaux A, Pichette V: Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 978-985. Epub 2006 Nov 2009., 2007

- 37 Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG: Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J Clin Invest* 97: 2167-2173, 1996
- 38 Qing DP, Ding H, Vadgama J, Wu YY, Kopple JD: Elevated myocardial cytosolic calcium impairs insulin-like growth factor-1-stimulated protein synthesis in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 10: 84-92, 1999
- 39 Ding H, Gao XL, Hirschberg R, Vadgama JV, Kopple JD: Impaired actions of insulin-like growth factor 1 on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of rats with chronic renal failure. Evidence for a postreceptor defect. *J Clin Invest* 97: 1064-1075, 1996
- 40 Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC: Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 282: 1-17., 2002
- 41 Picotto G, Massheimer V, Boland R: Parathyroid hormone stimulates calcium influx and the cAMP messenger system in rat enterocytes. *Am J Physiol* 273: C1349-1353, 1997
- 42 Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Redondo JM, de Landazuri MO: Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood* 88: 3482-3490., 1996
- 43 Schneck DW, Sprouse JS, Hayes AH, Jr., Shiroff RA: The effect of hydralazine and other drugs on the kinetics of procainamide acetylation by rat liver and kidney N-acetyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther* 204: 212-218., 1978
- 44 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 45 Towbin H, Staehlin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979
- 46 Stanley LA, Coroneos E, Cuff R, Hickman D, Ward A, Sim E: Immunochemical detection of arylamine N-acetyltransferase in normal and neoplastic bladder. *J Histochem Cytochem* 44: 1059-1067., 1996
- 47 Takeshita F, Ogawa K, Asamoto M, Shirai T: Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and

- mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Lett* 194: 25-35., 2003
- 48 Kobayashi K, Utsumi H, Okada M, Sakairi T, Ikeda I, Kusakabe M, Takagi S: One-step RT-PCR without initial RNA isolation sStep for laser-microdissected tissue sample. *J Vet Med Sci* 65: 917-919., 2003
- 49 Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408., 2001
- 50 Andres HH, Klem AJ, Szabo SM, Weber WW: New spectrophotometric and radiochemical assays for acetyl-CoA: arylamine N-acetyltransferase applicable to a variety of arylamines. *Anal Biochem* 145: 367-375., 1985
- 51 Mattano SS, Weber WW: Kinetics of arylamine N-acetyltransferase in tissues from rapid and slow acetylator mice. *Carcinogenesis* 8: 133-137., 1987

FIGURES

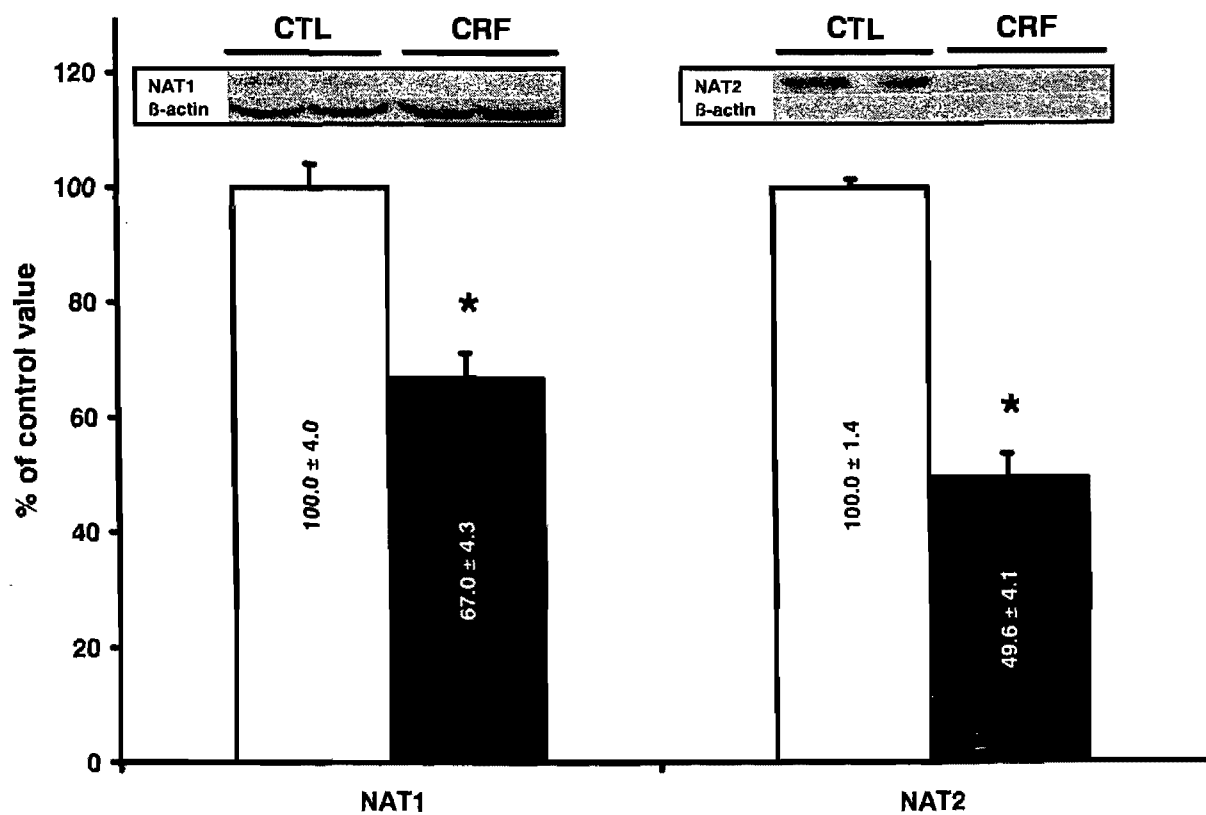


Figure 1. Protein expression of liver NAT1 and 2 in control (black bars) and CRF (white bars) rats. Control results were defined as 100%. Data are the mean \pm S.E.M. Representative blots are shown in insert. * $p < 0.001$ compared to control rats.

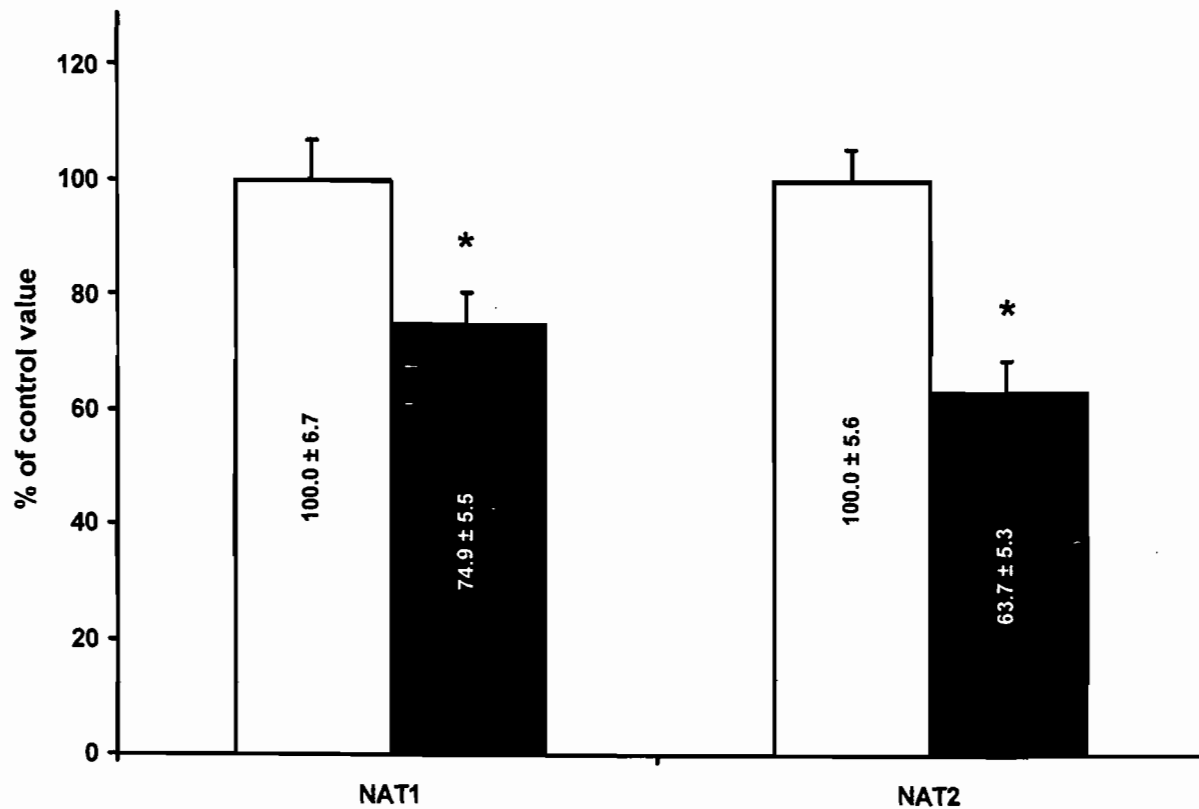


Figure 2. Expression of liver NAT1 and 2 mRNA in control (black bars) and CRF (white bars) rats. Control results were defined as 100%. Data are the mean \pm S.E.M., * $p < 0.01$ compared to control rats.

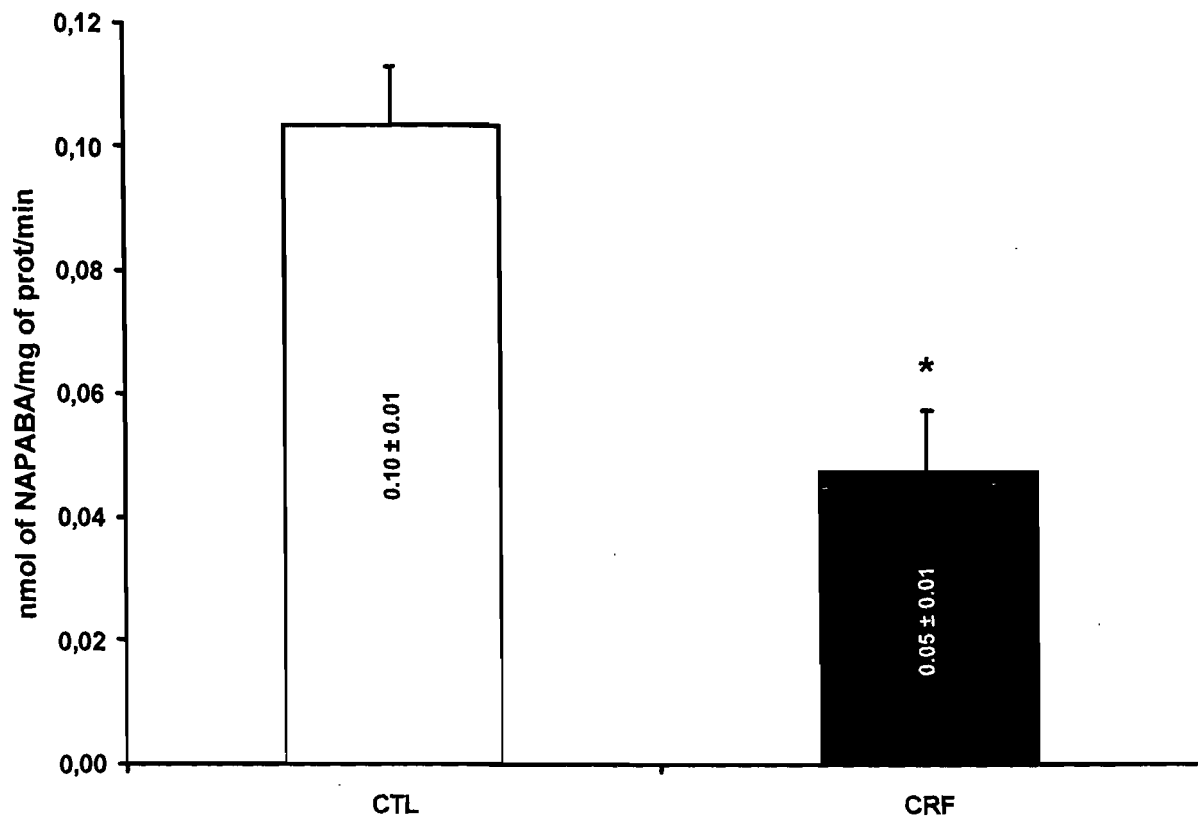
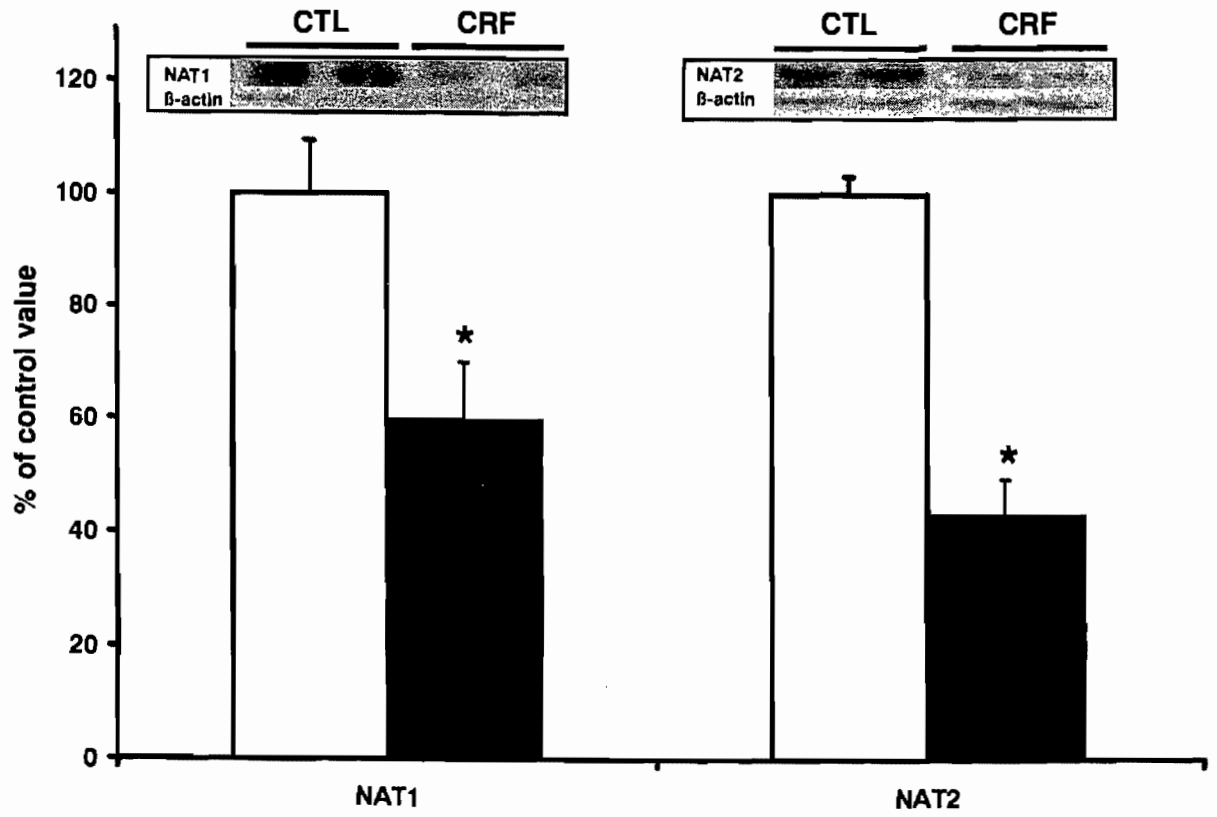


Figure 3. NAT2 metabolizing activity as measured by using PABA as specific substrate in control (black bars) and CRF (white bars) rats liver. Results expressed by nmol of NAPABA produced per mg of proteins per minute. Data are the mean \pm S.E.M. * $p < 0.001$ compared to control rats.

4 a-)



4 b-)

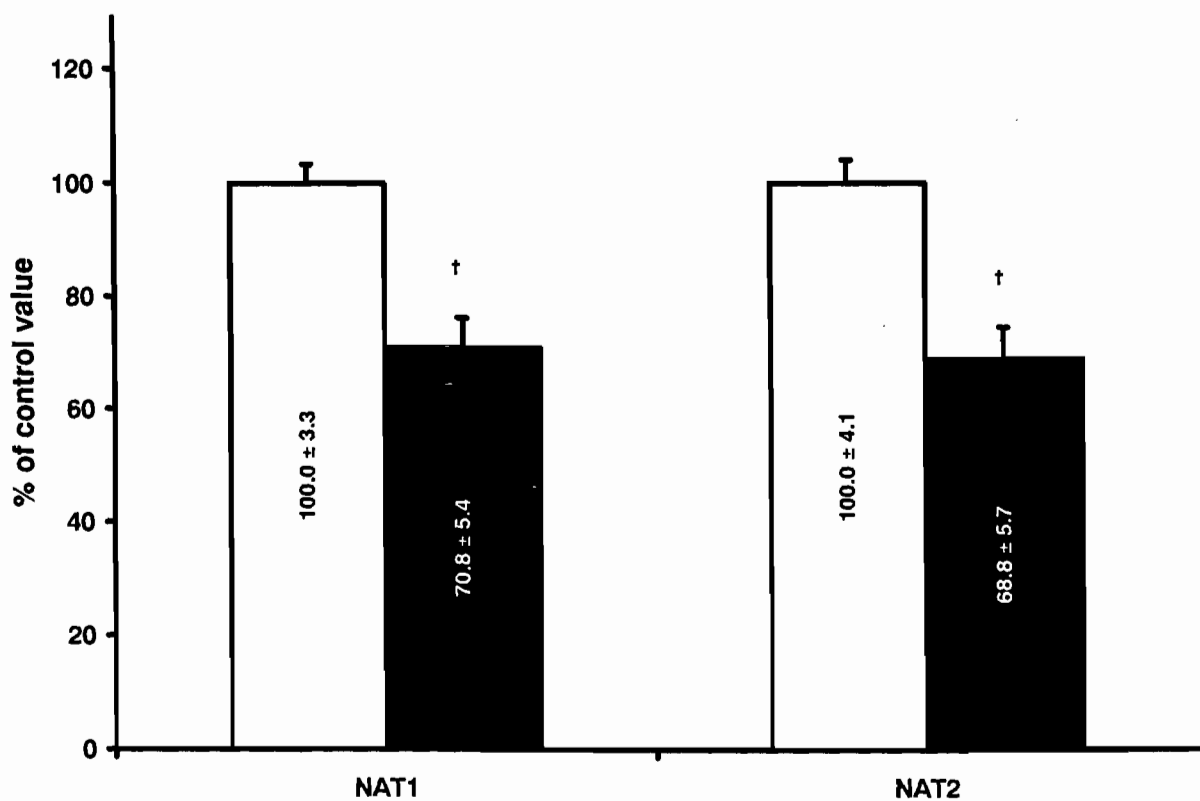


Figure 4. Protein (A) and mRNA (B) expression of NAT1 and NAT2 in 48-h cultured hepatocytes incubated with CTL (black bars) and CRF (white bars) rat serum (10%). Expression in hepatocytes incubated with CTL serum was defined as 100%. Representative blots are shown in insert. Data are the mean \pm S.E.M., * $p < 0,005$ compared to control rats. † $p < 0,001$ compared to control rats.

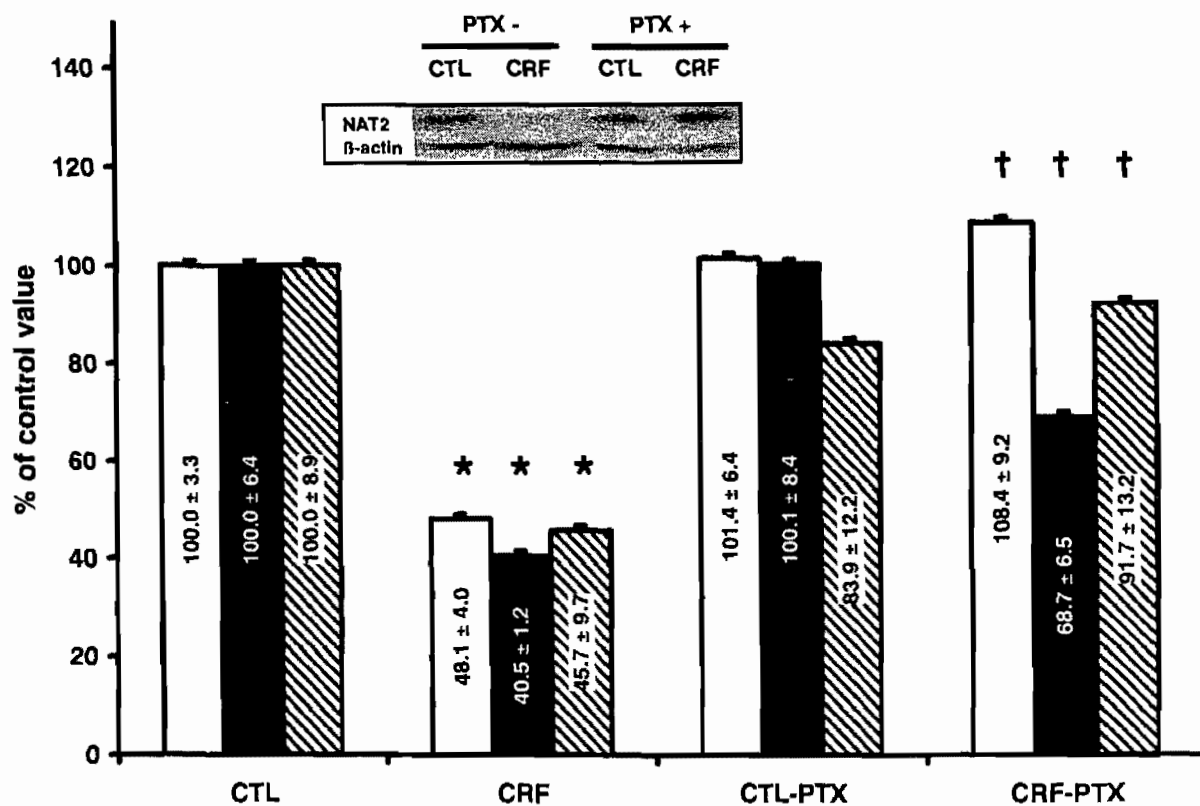


Figure 5. Expression of NAT2 protein (black bars), mRNA (white bars) and activity (hatched bars) in CTL and CRF rats liver with or without parathyroidectomy (PTX). CTL rats were defined as 100%. Data are the mean \pm S.E.M. Representative blots are shown in insert. * $p < 0,05$ compared to control rats. † $p < 0,05$ when compared to CRF group.

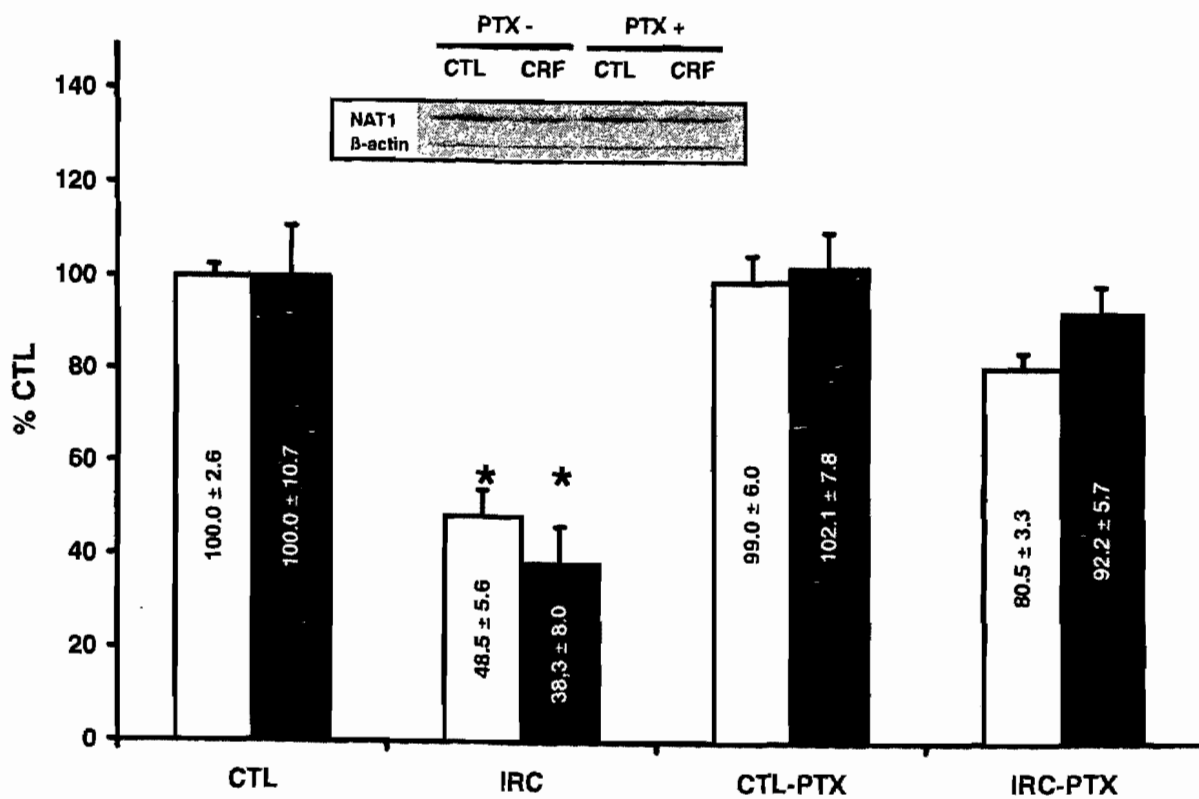


Figure 6. Expression of NAT1 protein (black bars) and mRNA (white bars) in CTL and CRF rats liver with or without parathyroidectomy (PTX). CTL rats were defined as 100%. Data are the mean \pm S.E.M. Representative blots are shown in insert. * $p < 0,05$ compared to control rats.

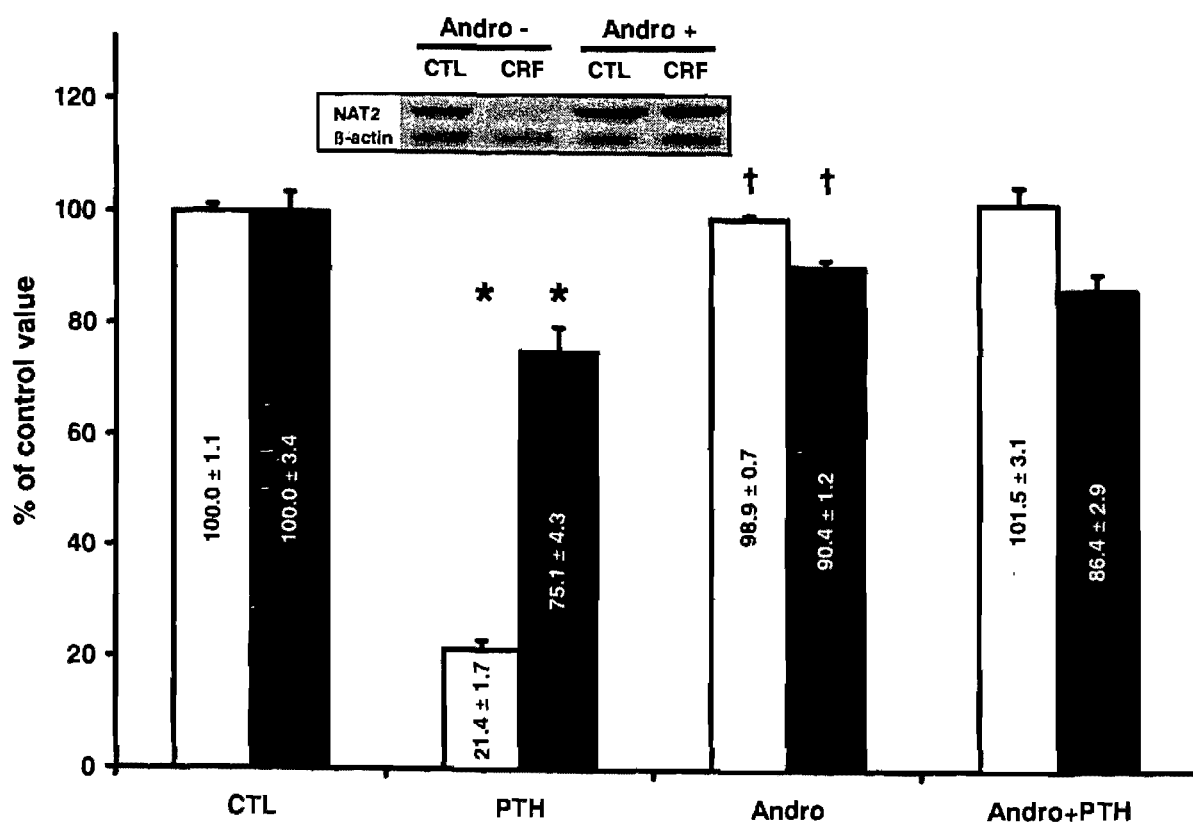


Figure 7. Protein (black bars) and mRNA (white bars) expression of NAT2 in hepatocytes incubated for 48h with 10^{-9} M PTH in 10% calf serum with or without 30μ M andrographolide (andro). Results of samples incubated with calf serum without PTH and andrographolide were defined as 100%. Data are the mean \pm S.E.M. Representative blots are shown in insert. * $p < 0,05$ when compared to CTL group.

† $p < 0,05$ when compared to PTH group

Table 1. Physiological characteristics of rats^a

	Control	CRF
Rats (n)	38	39
Final body weight (g)	345 ± 6	303 ± 9
Serum chemistry		
Creatinine (µmol/L)	55 ± 1	230 ± 13 ^b
Urea (mmol/L)	5.0 ± 0.2	50.0 ± 5.0 ^b
Calcium (mmol/L) ^c	1.39 ± 0.03	1.28 ± 0.08
Phosphate (mmol/L)	3.36 ± 0.10	3.78 ± 0.27
Creatinine clearance (µl per 100g per min)	337 ± 14	69 ± 7 ^b

Data are the means ± S.E.M.

^a CRF, chronic renal failure

^b p < 0.01 versus control group

^c ionized calcium concentration corrected at pH 7.4

Table 2. Physiological characteristics of PTX rats^a

	Control	CRF	Control-PTX	CRF-PTX
Rats (n)	6	6	6	6
Final body weight (g)	349 ± 21	291 ± 26	350 ± 16	310 ± 18
Serum chemistry				
Creatinine (μmol/L)	58 ± 2	208 ± 38 ^b	53 ± 1	221 ± 54 ^b
Urea (mmol/L)	5.0 ± 0.4	52.0 ± 14.0 ^b	4.5 ± 0.3	37.0 ± 9.0 ^b
Calcium (mmol/L) ^c	1.44 ± 0.04	1.38 ± 0.05	1.23 ± 0.13	1.35 ± 0.11
Phosphate (mmol/L)	3.14 ± 0.08	3.45 ± 0.12	4.01 ± 0.47	3.57 ± 0.32
PTH (pg/ml)	62 ± 18	2790 ± 825 ^b	< 20 ^b	< 20 ^b
Creatinine clearance (μl per 100g per min)	332 ± 30	100 ± 20 ^b	373 ± 14	76 ± 17 ^b

Data are the means ± S.E.M.

^a CRF, chronic renal failure; PTH, parathyroid hormone; PTX, parathyroidectomy.

^b p < 0.01 versus control group

^c ionized calcium concentration corrected at pH 7.4

Discussion

Les enzymes responsables de la biotransformation des médicaments se divisent en deux groupes. Premièrement, on retrouve les enzymes de phase I, bien représentées par la famille du CYP450. Ces enzymes catalysent entre autres des réactions d'oxydation, favorisant l'élimination des médicaments dans l'urine ou la bile en transformant la molécule mère en un composé beaucoup plus polaire. Cependant, il se peut que la réaction de phase I ne soit pas suffisante. Les métabolites, ou même la molécule mère, devront alors passer par la réaction de phase II, qui consiste en une réaction de conjugaison (glucuronidation, acétylation, sulfonation, méthylation, etc...). À l'exception de l'acétylation, les autres réactions de conjugaison permettent l'ajout d'un groupement polaire sur le xénobiotique à éliminer. L'acétylation, quant à elle, permet l'ajout d'un groupement non polaire qui masque un autre groupement réactif présent sur le xénobiotique.

Il est connu depuis longtemps que l'insuffisance rénale chronique diminue la clairance rénale des médicaments (113). Cependant, nous savons maintenant que cette maladie a aussi un impact sur la clairance métabolique, autant au niveau hépatique qu'intestinal (64, 79-82). Il existe de nombreuses études concernant l'effet de l'IRC sur les enzymes de la famille du CYP450. Chez le rat néphrectomisé, il a été démontré que l'état d'insuffisance rénale chronique modifiait l'activité, les taux de protéines et l'expression génique de plusieurs isoformes du CYP450 (88, 89, 91, 114). Les études ont aussi démontré que ces modifications étaient causées par la présence de facteurs inhibiteurs dans le sérum des rats néphrectomisés (94, 95) et que la PTH serait un de ces facteurs (21).

Jusqu'à ce jour, les études portant sur l'impact de l'IRC sur les enzymes de phase II n'étaient que des études cliniques. Chez des patients souffrant d'IRC, des altérations du métabolisme avaient été observées pour certains médicaments métabolisés par glucuronidation comme la zidovudine, la morphine ainsi que le métoclopramide

(102-105). Ces résultats cliniques suggéraient donc que l'IRC avait un impact sur la glucuronidation. Du côté *in vitro*, Taburet et al. ont observé une diminution du métabolisme de la zidovudine dans des microsomes, préparés à partir de foies humains sains, qui ont été incubés en présence de sérum d'humains en insuffisance rénale chronique. Ceci suggérait que non seulement la maladie altérait le métabolisme par glucuronidation, mais que la cause de cette altération serait un ou des facteurs urémiques (115). Chez le rat néphrectomisé, Paterson et Cohn ont quant à eux mesuré une diminution de 19% par rapport au contrôle de l'activité des UDP-glucuronosyltransférases dans des microsomes hépatiques, diminution qui n'était pas significative ($p = 0,06$) (114). À l'opposé, Yu et al. n'ont pas confirmé ces résultats puisqu'ils n'ont pas observé de changements significatifs de l'expression des UDP-glucuronosyltransférases hépatiques et rénales toujours chez le rat néphrectomisé. Cependant, le nombre de rats par groupe était petit ($n = 4$) et le degré de sévérité de l'insuffisance rénale était plutôt faible (106).

Concernant l'acétylation, l'augmentation des concentrations sériques de médicaments comme la procainamide et l'isoniazide observée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique coïnciderait avec le fait que le métabolisme de l'isoniazide serait diminué d'environ 60% chez ces patients (62, 107-111). Ces résultats suggèrent que l'insuffisance rénale chronique provoquerait une diminution du métabolisme par acétylation. Par contre, aucune étude animale sur l'impact de l'IRC sur l'acétylation n'a été menée jusqu'à ce jour. L'hypothèse de ce projet de maîtrise était donc, dans un premier temps, que l'insuffisance rénale chronique module l'expression hépatique des N-acétyltransférases chez le rat. Deuxièmement, ces changements seraient provoqués par un ou des facteurs sériques présents dans le sérum, particulièrement la PTH.

Le but de ce projet était, dans un premier temps, de démontrer que l'insuffisance rénale chronique affecte le métabolisme par acétylation. Tout d'abord, l'activité ainsi que l'expression protéique et génique de NAT1 et NAT2 ont été mesurées dans le foie de rat néphrectomisé. Les niveaux protéiques de NAT2 observés dans le foie

de ces rats étaient diminués de près de 50% par rapport aux rats témoins. Cette diminution s'explique par une réduction de la traduction du gène puisque l'ARNm au niveau hépatique subissait aussi une diminution, cette fois de 35% par rapport aux témoins. Cette baisse de l'expression des NATs par l'IRC n'est donc pas due à des modifications post-traductionnelles (dégradation protéique), mais bien à des altérations au niveau de la traduction du gène. De plus, la répercussion de l'IRC sur le métabolisme des N-acétyltransférases est importante puisque les résultats obtenus démontrent qu'il y a une diminution de près de 50% de l'activité de NAT2 dans le foie de rats souffrant d'IRC. Des résultats semblables ont été observés pour NAT1, démontrant aussi que l'IRC module son expression et que cette réduction de protéine est due à une diminution de son expression génique. Une forte corrélation entre la clairance de la créatinine et l'expression protéique existe, suggérant que plus la maladie progresse, plus l'expression des NATs diminue.

À doses normalement recommandées par le fabricant, certains médicaments peuvent provoquer des problèmes de toxicité reliés à leur accumulation sérique s'ils sont administrés aux patients souffrant d'IRC dont le métabolisme enzymatique est altéré par la maladie. Un ajustement des doses de ces médicaments par le médecin est alors nécessaire pour le patient. Il est donc important de connaître l'impact qu'à l'IRC sur les différentes enzymes du métabolisme afin de prédire quels médicaments nécessiteront des doses ajustées. Beaucoup de médicaments métabolisés par acétylation sont administrés aux patients souffrant d'IRC notamment la procaïnamide, l'acébutolol, l'isoniazide et la sulfadiazine. Puisque l'expression des NATs est altérée par l'IRC, il existe donc un risque chez ces patients d'accumuler les médicaments métabolisés par acétylation et d'éprouver des problèmes de toxicité suite à la prise de ces médicaments.

Pour comprendre par quels mécanismes l'IRC influence l'expression des N-acétyltransférases, nous avons émis l'hypothèse qu'un ou des facteurs sériques inhiberaient l'expression des N-acétyltransférases. L'expression génique et protéique a été mesurée dans des hépatocytes en culture, incubés avec sérum de rat

atteint d'IRC. Nous avons observé une diminution de 40% et 57% de NAT1 et NAT2, respectivement. Nous pouvons affirmer que cette diminution est aussi due à une altération au niveau de leur expression génique puisqu'il y a réduction de 30% de l'ARNm pour les deux isoformes. Il existe donc une corrélation entre le taux d'expression génique et protéique. De plus, ces résultats *in vitro* sont similaires à ceux obtenus *in vivo* dans le foie des rats néphrectomisés. Ces résultats suggèrent fortement la présence d'un ou plusieurs facteurs sériques responsables de la baisse de l'expression des NATs dans le foie des rats néphrectomisés.

Jusqu'à ce jour, il existe peu d'études sur la régulation des arylamines N-acétyltransférases. Quelques-unes d'entre elles ont démontré que l'acétylation pouvait être induite par trois classes d'agents: les immunomodulateurs, les précurseurs de l'acétyl-CoA et les glucocorticoïdes. Tout d'abord, chez le lapin, une augmentation de l'acétylation *in vivo* a été observée lors de stimulations par des immunomodulateurs tel que le tilorone (116-118). Chez l'homme et dans des hépatocytes de rats isolés, il a été démontré que les précurseurs de l'acétyl CoA (éthanol, citrate et acétate) ont la capacité d'augmenter l'acétylation des xénobiotiques (119-121). Finalement, il a aussi été démontré que l'hydrocortisone a un effet inducteur sur l'acétylation *in vivo* chez le lapin (117, 122, 123). Suite aux résultats avec l'hydrocortisone, Zaher et al. ont poussé plus loin l'effet des glucocorticoïdes (hydrocortisone, prednisolone et dexaméthasone) sur l'acétylation dans le foie de rats et n'ont trouvé qu'une modeste induction de l'acétylation par ces glucocorticoïdes, contrairement à l'effet observé sur certaines isoformes du CYP450 (124-126).

À l'inverse, très peu d'études ont été faites sur les facteurs pouvant réduire les NATs, tel que démontré dans nos travaux. Quelques études ont démontré que certaines espèces réactives de l'oxygène ainsi que les substrats eux-mêmes pourraient avoir un effet inhibiteur sur l'activité des arylamine-n-acétyltransférases. Butcher et al ont démontré que des substrats sélectifs pour NAT1 chez l'humain, tel que le PABA, pouvait inhiber son activité dans des cellules sanguines

mononucléaires (PBMC) (127). Deux mécanismes peuvent expliquer la diminution de l'activité de NAT1 par le PABA. Dans le premier cas, il y aurait liaison de l'acide N-hydroxy-*p*-aminobenzoïque (N-OH-PABA), métabolite du PABA, à la cystéine présente dans la triade catalytique de l'enzyme causant une inactivation irréversible de cette dernière. Tel serait le cas aussi du N-hydroxy-sulfaméthoxazole (N-OH-SMX), métabolite de la sulfaméthazine. Deuxièmement, le PABA pourrait agir sur la NAT1 par diminution de son expression, résultant en une diminution des niveaux de protéines (128). Dans le cas des espèces réactives de l'oxygène, NAT1 et NAT2 sont inhibées lorsqu'elles sont exposées à des concentrations physiologiques ou pathologiques de peroxy-nitrite et de H₂O₂ dans des cellules épithéliales humaines du cristallin. De plus, il a été démontré que les NATs pouvaient être inactivées après oxydation de la cystéine située au niveau de la triade catalytique de l'enzyme (129-131).

D'autres substances, qui ne sont pas des substrats pour les NATs, ont la capacité de diminuer leur activité. Tel est le cas de la famotidine et de la cimétidine qui, lorsqu'elles sont incubées dans du cytosol de foie de rat, inhibent l'activité de NAT2 et non de NAT1 (132). Le ketoprofène (l'acide 2-(3-benzoylphenyl) propionique) est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui a démontré un effet inhibiteur sur NAT1 chez l'humain par diminution de son ARNm (133). La berbérine, un agent aux multiples effets pharmacologiques étudié pour son activité anticancéreuse, diminuerait l'activité de NAT1 dans des cellules leucémiques humaines en altérant son expression génique (134). Il en est de même pour le curcumin, le pigment principal de l'épice nommée safran des indes, possédant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Dans des cellules humaines provenant de tumeur du poumon, une diminution de l'activité des NATs a été observée après 48 heures d'incubation en présence de curcumin. Dans cette même étude, il a été démontré que l'expression génique de NAT1 était altérée par le curcumin, expliquant une partie de la diminution de l'activité des NATs (135). Il semble que NAT1 chez l'humain (NAT2 chez le rat) soit inhibée par un plus grand nombre de composés que NAT2. Dans tous ces cas, peu d'informations sont disponibles quant

au mécanisme impliqué dans l'altération de l'expression génique des NATs par les différentes substances.

En 1993, Smolen *et al.* démontraient que le sexe influence le taux d'acétylation dans le rein chez la souris. Ils ont observé que l'acétylation du PABA était différente entre les femelles et les mâles. Le taux d'acétylation mesuré chez les souris mâles castrées était semblable à celui mesuré chez les femelles. Lorsque les souris castrées étaient traitées à la testostérone, les taux d'acétylation revenaient au même niveau que chez les souris mâles intacts (136), suggérant un contrôle par les hormones androgènes. Des résultats similaires ont été obtenus chez le hamster par Menendez-Pelaez *et al.* (137). Estrada-Rodgers *et al.* ont par la suite étudié l'influence du sexe sur l'activité de NAT2 tout au long du développement (0 à 80 jours) chez la souris dans le foie et les reins. Aucune différence dans l'activité de NAT2 n'a été observée dans le foie entre les mâles et les femelles durant le développement, ce qui n'est pas le cas au niveau des reins. Le taux d'acétylation plus élevé dans les reins des mâles se traduit par un taux plus élevé de protéines que chez les femelles (138). Ces résultats appuient non seulement le fait que les N-acétyltransférases pourraient être régulées par les hormones androgènes, mais aussi que leur régulation peut être dépendante des tissus.

Afin d'expliquer le dimorphisme observé entre les souris mâles et les femelles, l'équipe d'Estrada-Rodgers s'est ensuite penchée sur l'étude de la structure en 5' du gène *Nat2*. Ils ont repéré, dans la région du promoteur, des éléments importants dans l'efficacité de la transcription (CAAT et Sp1), un site de liaison pour AP-1 ainsi qu'un élément de réponse aux hormones (HRE), aussi appelé élément de réponse aux xénobiotiques (XRE). Cet élément est important lors de l'activation du gène suite à un stimulus (139). Chez l'humain, en plus des sites de liaison pour AP-1 et Sp1, Mitchell *et al.* ont trouvé à environ 200 paires de bases en amont du site d'initiation de transcription de NAT1, correspondant à NAT2 chez le rat et la souris, un site de liaison à AhR (aryl hydrocarbon receptor) (140). Après transfection d'hépatocytes humains avec un vecteur contenant les gènes de *Nat1* et *Nat2*

humains, Mitchell et al. ont démontré que chacun des deux gènes pouvait être induit par leur substrat spécifique, soit l'acide p-aminosalicyclique (ASA) pour NAT1 et la sulphaméthazine (SMZ) pour NAT2 (140). Cependant, l'ASA pouvait induire NAT2 alors que la sulphaméthazine pouvait induire NAT1, suggérant que l'induction au niveau génique des NATs ne serait pas exclusivement que dépendante des xénobiotiques (140).

Le mécanisme de régulation des arylamines n-acétyltransférases demande encore beaucoup d'éclaircissements. Ce n'est pas tout à fait le cas des arylalkylamines n-acétyltransférases dont les mécanismes de régulation ont été plus étudiés jusqu'à maintenant. Leur régulation serait principalement contrôlée par la norépinéphrine. En effet, le relâchement de cette hormone au niveau de la glande pinéale active des récepteurs adrénergiques menant à une augmentation des concentrations d'AMPc et de calcium intracellulaire. Il y a alors phosphorylation de la protéine CREB (*cAMP response element binding protein*) et activation de la transcription du gène de l'Aa-Nat via la séquence de l'élément de réponse à l'AMPc (CRE). Cette activation permet l'initiation de la synthèse de la mélatonine (141). L'augmentation de la synthèse d'AMPc activerait une protéine kinase activée par les mitogènes (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) : *c-Jun n-terminal kinase* (JNK). Cette dernière serait responsable de l'élévation des niveaux d'ARMm de l'Aa-Nat. Une fois activé, JNK peut se lier à un facteur de transcription nommé c-JUN qui contrôle l'expression des gènes via le site de liaison AP-1. Tout comme les NATs, il se trouve qu'une séquence correspondante à AP-1 a été identifiée 32 pb en amont du site d'initiation de l'Aa-Nat (141-146). Un mécanisme semblable pourrait peut-être aussi être impliqué dans la régulation des arylamines N-acétyltransférases, mais ceci reste à démontrer.

L'IRC crée plusieurs changements physiologiques qui pourraient avoir un effet sur la régulation des NATs. Entre autres, on retrouve l'état inflammatoire causé par l'accumulation de toxines urémiques, ainsi que l'hyperparathyroïdie secondaire.

L'accumulation de toxines urémiques et la dialyse sont des facteurs reconnus comme étant responsables de l'augmentation des concentrations sériques de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-6 et TNF- α (96, 147). Il a été démontré que ces cytokines ont la capacité de modifier l'expression du CYP450 (148, 149). En effet, l'expression des isoformes 1A1, 1A2, 2B1/2, 2C11 et 3A2 du cytochrome P450 est diminuée dans des hépatocytes humains et dans des hépatocytes de rat lorsqu'ils sont en présence de IL-1, IL-2 et TNF- α (150-155). Puisque l'expression du CYP est altérée par ces cytokines, cela suggère qu'elles pourraient aussi inhiber l'expression des N-acétyltransférases. En effet, ce n'est que tout récemment que Buranrat et al. ont démontré que certaines cytokines pouvaient avoir un effet inhibiteur sur l'expression de la NAT1 humaine (correspondant à NAT2 chez le rat). Des cellules épithéliales biliaires humaines ont été incubées 48 heures en présence d'une combinaison de cytokines inflammatoires humaines : l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interféron- γ (IFN- γ) et TNF- α . Une diminution significative tant au niveau de l'activité que de l'ARNm de NAT1 a été observée(156).

Par ailleurs, l'hyperparathyroïdie secondaire est une complication courante de l'insuffisance rénale chronique. En concentrations élevées, la PTH est reconnue comme étant un facteur inhibant la synthèse de certaines protéines, par diminution de leur expression génique. C'est le cas de la lipase hépatique, des récepteurs de la vasopressine et de l'angiotensine II dans des hépatocytes, ainsi que l'IGF-1 dans les cardiomyocytes (99-101, 157). Récemment, il a été démontré que la PTH avait un effet inhibiteur sur l'expression du CYP450 chez les rats néphrectomisés (21). L'expression des N-acétyltransférases étant aussi diminuée chez ce même modèle animal, nous avons émis l'hypothèse que la PTH pourrait jouer un rôle majeur dans cette diminution d'expression.

Après avoir démontré l'effet inhibiteur du sérum de rat en IRC sur l'expression des NATs, nous avons testé l'effet de la PTH sur leur expression. Nous avons vérifié si la parathyroïdectomie permettrait de rétablir le taux d'expression des N-

acétyltransférases. En effet, suite à la chirurgie, l'activité métabolique de NAT2 chez les rats ayant été néphrectomisés et parathyroïdectomisés est semblable à celle mesurée chez les rats témoins. Ce rétablissement est aussi observé au niveau de l'expression protéique de NAT2 ainsi que sur l'expression du gène *Nat2*. Ces résultats vont dans le même sens que les résultats *in vitro*. Effectivement, une diminution de l'expression de NAT2 a été observée dans des hépatocytes de rats cultivés en présence de PTH (à une concentration de 10^{-9} M, concentration similaire à celle mesurée dans le sérum des rats urémiques). La présence de PTH cause une diminution de l'expression du gène de *Nat2*, ce qui a pour conséquence une diminution des taux de protéines dans ces hépatocytes. Ces résultats suggèrent fortement que la PTH joue un rôle important dans l'inhibition de l'expression des NATs en IRC. Cependant, le mécanisme par lequel la PTH influence les N-acétyltransférases n'est pas encore établi.

La PTH pourrait exercer son effet inhibiteur par le biais de trois voies de signalisation intracellulaires : via l'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc (activation d'une PKA suivi de la phosphorylation de protéines) ou de calcium, via l'activation d'une PKC ou via la voie du NF- κ B (19, 20, 158, 159).

Des études ont démontré que la PTH pouvait activer le facteur AP-1 via la voie de la PKA. En effet, la liaison de la PTH au récepteur de la PTH de type 1 (PTH1R) entraînerait l'activation entre autres de la PKA, de la PKC ou de la MAPK dans les ostéoblastes (160). Or, les récepteurs PTH1R sont retrouvés au niveau du foie (161). De plus, l'activation de la voie PKA permettrait d'activer tout particulièrement le facteur AP-1 (162), dont la séquence a été retrouvée au niveau du promoteur des NATs (139, 140). (Le facteur de transcription AP-1 est composé de dimères de protéines faisant partis des familles Jun, Fos et des facteurs de transcriptions activateurs (163). AP-1 est aussi impliqué dans la régulation de plusieurs gènes impliqués entre autres dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et l'inflammation. Même si la structure des protéines faisant partie des familles Jun et Fos partage une forte homologie, les différents dimères d'AP-1 possèdent une

affinité différente pour l'ADN et permettent soit d'activer ou de supprimer l'expression d'un gène (164, 165)).

Récemment, il a été démontré que la PTH agissait sur l'expression du CYP450 *via* la voie du NF- κ B (21). Ce facteur de transcription est important pour la régulation de plusieurs réactions physiologiques notamment au niveau de la réponse immunitaire, de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (166). De plus, il avait déjà été suggéré que le NF- κ B jouait un rôle majeur dans l'inhibition de l'expression du CYP450 par les cytokines pro-inflammatoires ou les LPS (158, 159). En effet, le NF- κ B a la caractéristique de pouvoir réguler à la baisse l'activité transcriptionnelle de plusieurs récepteurs nucléaires (167-170). C'est le cas du récepteur nucléaire orphelin RXR. Gu *et al.* ont démontré que le NF- κ B était capable d'inhiber la transcription du gène du CYP3A4 en empêchant la liaison du complexe RXR-PXR à son site de régulation du gène (171). La PTH, par sa liaison à son récepteur, activerait la voie du NF- κ B, supprimant ainsi l'expression du CYP450. Même si plusieurs voies pourraient être en cause, nous avons commencé par étudier la voie du NF- κ B dans la diminution de l'acétylation en IRC. Notre hypothèse était donc, dans ce cas-ci, que la diminution de l'expression des N-acétyltransférases par la PTH se faisait *via* la voie de NF- κ B.

Pour réaliser ce projet, des hépatocytes de rats ont été mis en incubation en présence de PTH à 10^{-9} M, avec ou sans inhibiteur de la voie du NF- κ B : l'andrographolide (112). Ce dernier agit par sa liaison à une cystéine présente dans la sous-unité p50 de NF- κ B, atténuant ainsi sa capacité de transcription (172). Lorsque l'andrographolide est ajouté au milieu de culture contenant de la PTH, les niveaux de protéines de NAT2 sont rétablis aux mêmes niveaux que ceux des hépatocytes témoins. Cette diminution protéique survient suite à une diminution de l'expression du gène *Nat2*. Ces résultats appuient fortement l'hypothèse selon laquelle la PTH est un facteur important dans la répression de l'expression des N-acétyltransférases par l'IRC. Plus d'études seront nécessaires afin de pouvoir faire le lien entre la PTH, le NF- κ B et la régulation des NATs.

L'insuffisance rénale chronique a un impact majeur au niveau du métabolisme hépatique non seulement sur les enzymes de phase I mais aussi sur les enzymes de phase II. Au niveau clinique chez l'humain, il avait déjà été démontré que l'acétylation de plusieurs médicaments était diminuée en IRC. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'acétylation serait diminuée dans le foie de rats en IRC. On a pu démontrer que l'expression ainsi que l'activité de NAT1 et 2 dans le foie de rat en IRC était diminuée suite à une réduction de leur expression génique. De plus, grâce aux études avec des hépatocytes en culture, nous avons démontré que la présence d'un ou de facteurs inhibiteurs dans le sérum de rats était responsable de l'inhibition de l'expression des NATs. Cependant, l'IRC ne semble pas être la seule maladie à avoir un impact sur l'expression des NATs. En effet, il semblerait que l'acétylation chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) subirait des modifications. Dans la population non malade, le génotype permet habituellement de prédire qu'elle sera le phénotype du sujet. La distribution des acétylateurs lents versus acétylateurs rapide est d'environ 50 :50 (173). Par contre, chez les populations malades, la relation génotype-phénotype est plus difficile à prédire. Chez la population atteinte du VIH, le ratio acétylateurs lents versus rapides est de 20:8, ce qui voudrait dire qu'il y a une diminution de l'acétylation chez ces patients (174). Cependant, dans le cas du VIH, cette diminution d'expression des NATs ne serait pas causée par une réduction de l'expression génique comme dans le cas de l'IRC, mais plutôt par une altération post-traductionnelle. Jusqu'à maintenant, le principal facteur qui aurait un effet néfaste sur l'acétylation chez les patients atteints du VIH serait la progression de la maladie. Plusieurs autres facteurs pourraient entrer en compte mais la régulation des n-Acétyltransférases chez ces patients reste encore très mal connue (175).

Des nombreux facteurs sériques dont les concentrations augmentent de façon importante en IRC (PTH, IL-1, IL-6, TNF- α), c'est de la PTH dont nous avons décidé d'investiguer les effets. Son effet sur l'expression du CYP étant inhibiteur, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait avoir un effet semblable sur les N-acétyltransférases. Les études avec les rats parathyroïdectomisés ont clairement démontré que l'expression des NATs était rétablie chez les rats en IRC ayant

préalablement subi une PTX, contrairement aux rats néphrectomisés sans PTX. *In vitro*, l'expression des NATs était aussi diminuée dans les hépatocytes incubés avec la PTH. Lorsqu'une des voies de signalisation de la PTH, NF- κ B, était bloquée par l'andrographolide, l'expression de NAT2 était rétablie tant au niveau protéique que génique, suggérant fortement que la PTH fait partie des facteurs ayant un impact majeur sur la diminution de l'expression des N-acétyltransférases en IRC.

Conclusion

Les résultats obtenus coïncident avec les résultats des études précédentes portant sur l'impact de l'IRC sur l'acétylation chez l'humain. Par contre, encore beaucoup d'études sur la régulation des NATs seront nécessaires afin de pouvoir comprendre comment l'insuffisance rénale influence leur expression. Cependant, avec les résultats présents, cela suggère que leur régulation semble similaire à celle du CYP450. En effet, tout comme le CYP450, la PTH a un effet inhibiteur sur l'expression des NATs. L'étude des enzymes dans le foie des souris « knock-out » pour le gène de la PTH viendrait fortement appuyer les résultats obtenus dans cette étude.

Références

1. Tortora GJ, Grabowski SR. Principes d'anatomie et de physiologie. traduction de la 9^{ième} édition anglaise ed. St. Laurent, Qc: ERPI; 2001.
2. Guyton AC, Hall JE. Précis de physiologie médicale. 2^{ième} édition française, traduction de la 10^{ème} édition américaine ed. Padou: Piccin; 2003.
3. Gougoux A. La physiologie du rein et des liquides corporels. 1^{ière} ed. Montréal: Gaëtan morain éditeur; 1999.
4. Mulder GJ. Pharmaceutical Toxicology. 1st ed. London, UK: Pharmaceutical Press; 2006.
5. Klaassen CD. Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poison. 6th ed: McGraw-Hill Professional Publishing; 2001.
6. Beers MH. The Merck Manual of medical information. 2nd ed. Whitehouse station: Merck research Laboratories; 2004.
7. Neal M. En bref...Pharmacologie médicale. traduction de la 3^{ième} édition anglaise ed. Paris, Bruxelles: De Boeck Université; 1999.
8. Hannedouche T. Complications cardiovasculaires et hématologiques de l'IRC. In: Nephrohus learning; 2001.
9. Sogliano Y, Massry S, Iseki K, Nadler J, Campese V. Effect of PTH on blood pressure and response to vasoconstrictor agonists. *Am J Physiol.* 1985;248(5 Pt 2):F674-81.
10. Ellison D, DA. M. Infusion of bovine parathyroid hormone 1-34 attenuates the pressor response to angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1982;4(9-10):1637-47.
11. Helwig J, Musso M, Judes C, Nickols G. Parathyroid hormone and calcium: interactions in the control of renin secretion in the isolated, nonfiltering rat kidney. *Endocrinology.* 1991;129(3):1233-42.
12. Hebert SC. Therapeutic use of calcimimetics. *Annu Rev Med* 2006;57:349-64.
13. Porterfield SP. Endocrine Physiology. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Mosby Inc.; 2001.

14. Jodoin M. *Physiologie Médicale*. Traduction de la 21^{ème} ed. St-Nicolas, Qc: Les Presses de l'Université Laval; 2005.
15. Dong BJ. Cinacalcet: An oral calcimimetic agent for the management of hyperparathyroidism. *Clin Ther* 2005;27(11):1725-51.
16. Hannedouche T. Complications hydro-électrolytiques de l'IRC. In: *Nephrohus Learning*; 2007.
17. Hannedouche T. Hyperphosphatémie: Diagnostic et traitement. In: *Nephrohus*; 2007.
18. Man N, Jungers P. Désordre du métabolisme phospho-calcique et complications ostéo-articulaires. In: *Nephrohus Learning: Nephrohus Learning*; 2007.
19. Massry SG, Smogorzewski M. Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver. *Kidney Int Suppl* 1997;62:S5-7.
20. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 2002;282(1-2):1-17.
21. Michaud J, Naud J, Chouinard J, Desy F, Leblond FA, Desbiens K, et al. Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):3041-8. Epub 2006 Oct 4.
22. Katzung BG. *Basic and clinical pharmacology*. 9^{ème} ed. New York: The McGraw-Hills companies; 2004.
23. Schanker L, Jeffery J. Active transport of foreign pyrimidines across the intestinal epithelium. *Nature*. 1961;190:727-8.
24. Leopold G, Furukawa E, Forth W, Rummel W. [Comparative study of the absorption of heavy metals in vivo and in vitro]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1969;263(1):275-6.
25. Brunton L. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed: McGraw-Hill Professional Publishing; 2006.
26. Mulder AB, van den Bergh FA, Vermees I. Response to "The efficacy of simvastatin is not influenced by CYP2D6 polymorphism" by Geisel et al. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73(5):475.

27. Rushmore TH, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 2002;3(5):481-90.
28. Craig CRS, Robert E. *moder pharmacology and clinical applications*. 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
29. van Bladeren PJ. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* 2000;129(1-2):61-76.
30. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7369-75.
31. Negishi M, Pedersen LG, Petrotchenko E, Shevtsov S, Gorokhov A, Kakuta Y, et al. Structure and function of sulfotransferases. *Arch Biochem Biophys* 2001;390(2):149-57.
32. Glatt H, Meinel W. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369(1):55-68. Epub 2003 Nov 5.
33. Chapman E, Best MD, Hanson SR, Wong CH. Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl* 2004;43(27):3526-48.
34. Blanchard RL, Freimuth RR, Buck J, Weinshilboum RM, Coughtrie MW. A proposed nomenclature system for the cytosolic sulfotransferase (SULT) superfamily. *Pharmacogenetics* 2004;14(3):199-211.
35. Glatt H. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 2000;129(1-2):141-70.
36. Kiang TK, Ensom MH, Chang TK. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions. *Pharmacol Ther* 2005;106(1):97-132. Epub 2005 Jan 12.
37. Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, et al. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(10):677-85.
38. Burchell B. Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *american journal of pharmacogenomics* 2003;3(1):37-52.
39. Zhang W, Liu W, Innocenti F, Ratain MJ. Searching for tissue-specific expression pattern-linked nucleotides of UGT1A isoforms. *PLoS ONE* 2007;2:e396.

40. Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, et al. Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. *Pharmacogenetics* 2001;11(4):357-68.
41. Harding D, Jeremiah SJ, Povey S, Burchell B. Chromosomal mapping of a human phenol UDP-glucuronosyltransferase, GNT1. *Ann Hum Genet* 1990;54(Pt 1):17-21.
42. Ostanek B, Furlan D, Mavec T, J. L-B. UGT1A1(TA)_n promoter polymorphism--a new case of a (TA)₈ allele in Caucasians. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38(2):78-82. Epub 2006 Dec 28.
43. Drenth JP PW, Jansen JB. [From gene to disease; unconjugated hyperbilirubinemia: Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar types I and II]. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2002;146(32):1488-90.
44. Jedlitschky G, Cassidy AJ, Sales M, Pratt N, Burchell B. Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J* 1999;340(Pt 3):837-43.
45. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:581-616.
46. Stone AN, Mackenzie PI, Galetin A, Houston JB, Miners JO. Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human udp-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos* 2003;31(9):1086-9.
47. Al-Zoughool M, Talaska G. 4-Aminobiphenyl N-glucuronidation by liver microsomes: optimization of the reaction conditions and characterization of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Appl Toxicol* 2006;26(6):524-32.
48. Ciotti M, Lakshmi VM, Basu N, Davis BB, Owens IS, Zenser TV. Glucuronidation of benzidine and its metabolites by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases and pH stability of glucuronides. *Carcinogenesis* 1999;20(10):1963-9.
49. Babu SR, Lakshmi VM, Hsu FF, Zenser TV, Davis BB. Glucuronidation of N-hydroxy metabolites of N-acetylbenzidine. *Carcinogenesis* 1995;16(12):3069-74.
50. Boukouvala S, Fakis G. Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. *Drug Metab Rev* 2005;37(3):511-64.
51. Walraven JM, Doll MA, Hein DW. Identification and characterization of functional rat arylamine N-acetyltransferase 3: comparisons with rat arylamine N-

acetyltransferases 1 and 2. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319(1):369-75. Epub 2006 Jul 7.

52. Kelly SL, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase in Balb/c mice: identification of a novel mouse isoenzyme by cloning and expression in vitro. *Biochem J* 1994;302(Pt 2):347-53.
53. Brockton N, Little J, Sharp L, Cotton SC. N-acetyltransferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000;151(9):846-61.
54. Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, et al. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(1):29-42.
55. Cribb AE, Spielberg SP. Hepatic microsomal metabolism of sulfamethoxazole to the hydroxylamine. *Drug Metab Dispos* 1990;18(5):784-7.
56. Cleveland JC, Litvak SF, Cole JW. Identification of the route of action of the carcinogen 3:2-dimethyl-4-aminobiphenyl in the induction of intestinal neoplasia. *Cancer Res* 1967;27(4):708-14.
57. Walpole AL, Williams MH, Roberts DC. The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-amino-diphenyl. *Br J Ind Med* 1952;9(4):255-63.
58. Flammang TJ, Westra JG, Kadlubar FF, Beland FA. DNA adducts formed from the probable proximate carcinogen, N-hydroxy-3,2' -dimethyl-4-aminobiphenyl, by acid catalysis or S-acetyl coenzyme A-dependent enzymatic esterification. *Carcinogenesis* 1985;6(2):251-8.
59. Westra JG, Flammang TJ, Fullerton NF, Beland FA, Weis CC, Kadlubar FF. Formation of DNA adducts in vivo in rat liver and intestinal epithelium after administration of the carcinogen 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and its hydroxamic acid. *Carcinogenesis* 1985;6(1):37-44.
60. Ellison N, Weller J, Klein D. Development of a circadian rhythm in the activity of pineal serotonin N-acetyltransferase. *J Neurochem.* 1972;19(5):1335-41.
61. Thomas T, Thomas T. Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med.* 2003;7(2):113-26.
62. Lam YW, Banerji S, Hatfield C, Talbert RL. Principles of drug administration in renal insufficiency. *Clin Pharmacokinet* 1997;32(1):30-57.

63. Matzke GR, Frye RF. Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* 1997;16(3):205-31.
64. Matzke GE, Frey RF. Drug dosing in patients with impaired renal function. In: Pipiro JT TR, Hayes PE, Yee GC, Matzke GR, Posey ML, editor. *Pharmacotherapy: A pathophysiologic basis*. Second ed. New York: Elsevier Science Publishing Inc; 1992. p. 750-763.
65. Nolin TD, Frye RF, Matzke GR. Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42(5):906-25.
66. Aronoff GR. *Drug Prescribing in Renal Failure: Dosing Guidelines for Adults*. 4th ed. Philadelphia: American College of Physicians; 1999.
67. Gugler R, Allgayer H. Effects of antacids on the clinical pharmacokinetics of drugs. An update. *Clin Pharmacokinet* 1990;18(3):210-9.
68. Maton PN, Burton ME. Antacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommended therapeutic use. *Drugs* 1999;57(6):855-70.
69. Winter ME. *Basic Clinical Pharmacokinetics*. 4 edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
70. Galli F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(Suppl 5):v20-36.
71. Wynckel A, Randoux C, Millart H, Desroches C, Gillery P, Canivet E, et al. Kinetics of carbamylated haemoglobin in acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(8):1183-8.
72. Erill S, du Souich P, Courteau H. Carbamylation of proteins and sulfacetamide free fraction in serum in experimentally-induced high blood urea states. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985;50(1):45-56.
73. Dengler TJ, Robertz-Vaupel GM, HJ D. Albumin binding in uraemia: quantitative assessment of inhibition by endogenous ligands and carbamylation of albumin. *Eur J Clin Pharmacol* 1992;43(5):491-9.
74. Launay-Vacher V, Deray G. Modifications pharmacocinétiques au cours de l'insuffisance rénale. *Oncologie* 2004;6:282-286.
75. Gabardi S, Abramson S. Drug dosing in chronic kidney disease. *Med Clin North Am* 2005;89(3):649-87.

76. Dreisbach AW, Lertora JJ. The effect of chronic renal failure on hepatic drug metabolism and drug disposition. *Semin Dial* 2003;16(1):45-50.
77. Vanholder R, De Smet R, Ringoir S. Factors influencing drug protein binding in patients with end stage renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1993;44(Suppl 1):S17-21.
78. Talbert RL. Drug dosing in renal insufficiency. *J Clin Pharmacol* 1994;34(2):99-110.
79. Touchette MA, Slaughter RL. The effect of renal failure on hepatic drug clearance. *DICP* 1991;25(11):1214-24.
80. Gibson TP. Renal disease and drug metabolism: an overview. *Am J Kidney Dis* 1986;8(1):7-17.
81. Pichette V, Leblond F. Metabolism of drugs in chronic renal failure. *Recent Res Devel Drug Metabol Disposition* 2002;1:43-56.
82. Pichette V, Leblond FA. Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* 2003;4(2):91-103.
83. Correia MA. Rat and human liver cytochrome P450: Substrate and inhibitor specificities and functional markers. In: Ortiz de Montellano PR, editor. *Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry*. Second edition ed. New York: Plenum Press; 1995.
84. Streetman DS, Bertino JS, Jr., Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* 2000;10(3):187-216.
85. Kevorkian JP, Michel C, Hofmann U, Jacqz-Aigrain E, Kroemer HK, Peraldi MN, et al. Assessment of individual CYP2D6 activity in extensive metabolizers with renal failure: comparison of sparteine and dextromethorphan. *Clin Pharmacol Ther* 1996;59(5):583-92.
86. Dowling TC, Briglia AE, Fink JC, Hanes DS, Light PD, Stackiewicz L, et al. Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73(5):427-34.
87. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992;22(1):1-21.
88. Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, Pichette V. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(2):326-32.

89. Uchida N, Kurata N, Shimada K, Nishimura Y, Yasuda K, Hashimoto M, 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):431-9.
90. Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP, Pichette V. Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos* 2000;28(11):1317-20.
91. Leblond FA, Petrucci M, Dube P, Bernier G, Bonnardeaux A, Pichette V. Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002;13(6):1579-85.
92. Kanfer A, Stamatakis G, Torlotin JC, Fredj G, Kenouch S, Mery JP. Changes in erythromycin pharmacokinetics induced by renal failure. *Clin Nephrol* 1987;27(3):147-50.
93. Okabe H, Hashimoto Y, Inui KI. Pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J Pharm Pharmacol* 2000;52(12):1467-72.
94. Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, et al. Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol* 2005;144(8):1067-77.
95. Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* 2002;137(7):1039-46.
96. Raj DS, Shah H, Shah VO, Ferrando A, Bankhurst A, Wolfe R, et al. Markers of inflammation, proteolysis, and apoptosis in ESRD. *Am J Kidney Dis* 2003;42(6):1212-20.
97. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993;44(4):707-15.
98. Bleau AM, Maurel P, Pichette V, Leblond F, du Souich P. Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2003;473(2-3):197-206.
99. Ding H, Gao XL, Hirschberg R, Vadgama JV, Kopple JD. Impaired actions of insulin-like growth factor 1 on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of rats with chronic renal failure. Evidence for a postreceptor defect. *J Clin Invest* 1996;97(4):1064-75.

100. Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG. Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1996;97(10):2167-73.
101. Qing DP, Ding H, Vadgama J, Wu YY, Kopple JD. Elevated myocardial cytosolic calcium impairs insulin-like growth factor-1-stimulated protein synthesis in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999;10(1):84-92.
102. Singlas E, Pioger JC, Taburet AM, Colin JN, Fillastre JP. Zidovudine disposition in patients with severe renal impairment: influence of hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther* 1989;46(2):190-7.
103. Osborne R, Joel S, Grebenik K, Trew D, Slevin M. The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronides in kidney failure. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54(2):158-67.
104. Bateman DN, Gokal R, Dodd TR, Blain PG. The pharmacokinetics of single doses of metoclopramide in renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1981;19(6):437-41.
105. Lehmann CR, Heironimus JD, Collins CB, O'Neil TJ, Pierson WP, Crowe JT, et al. Metoclopramide kinetics in patients with impaired renal function and clearance by hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther* 1985;37(3):284-9.
106. Yu C, Ritter JK, Krieg RJ, Rege B, Karnes TH, Sarkar MA. Effect of chronic renal insufficiency on hepatic and renal udp-glucuronyltransferases in rats. *Drug Metab Dispos* 2006;34(4):621-7. Epub 2006 Jan 13.
107. Gibson TP, Atkinson AJ, Jr., Matusik E, Nelson LD, Briggs WA. Kinetics of procainamide and N-acetylprocainamide in renal failure. *Kidney Int* 1977;12(6):422-9.
108. Gibson TP, Matusik EJ, Briggs WA. N-Acetylprocainamide levels in patients with end-stage renal failure. *Clin Pharmacol Ther* 1976;19(2):206-12.
109. Karlsson E. Clinical pharmacokinetics of procainamide. *Clin Pharmacokinet* 1978;3(2):97-107.
110. du Souich P, Erill S. Metabolism of procainamide in patients with chronic heart failure, chronic respiratory failure and chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1978;14(1):21-7.
111. Kim YG, Shin JG, Shin SG, Jang IJ, Kim S, Lee JS, et al. Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54(6):612-20.

112. Munoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood* 1996;88(9):3482-90.
113. Cantu TG, Ellerbeck EF, Yun SW, Castine SD, Kornhauser DM. Drug prescribing for patients with changing renal function. *Am J Hosp Pharm* 1992;49(12):2944-8.
114. Patterson SE, Cohn VH. Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure. *Biochem Pharmacol* 1984;33(5):711-6.
115. Taburet AM, Vincent I, Perello L, Coret B, Baune B, Furlan V. Impairment of drug biotransformation in renal disease an in vitro model. *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1996;59(2):136.
116. Zidek Z, Fiebova M, Janku I, Elis J. Influence of sex and Freund's adjuvant on liver N-acetyltransferase activity and elimination of sulphadimidine in urine of rats. *Biochem Pharmacol.* 1977;26(1):69-70.
117. du Souich P, Coureau C. Induction of acetylating capacity with complete Freund's adjuvant and hydrocortisone in the rabbit. *Drug Metab Dispos.* 1981;9(3):279-83.
118. Svensson CK, Knowlton PW. Effect of the immunomodulator tilorone on the in vivo acetylation of procainamide in the rat. *Pharm Res.* 1989;6(6):477-80.
119. Olsen H, Morland J. Ethanol-induced increase in drug acetylation in man and isolated rat liver cells. *Br Med J.* 1978;2(6147):1260-2.
120. Olsen H, Morland J. Ethanol-induced increase in procainamide acetylation in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1982;13(2):203-8.
121. Olsen H. Interaction between drug acetylation and ethanol, acetate, pyruvate, citrate, and L(-) carnitine in isolated rat liver parenchymal cells. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 1982;50(1):67-74.
122. Reeves PT, Minchin RF, Ilett KF. Induction of sulfamethazine acetylation by hydrocortisone in the rabbit. *Drug Metab Dispos.* 1988;16(1):110-5.
123. Reeves PT, Minchin RF, Ilett KF. In vivo mechanisms for the enhanced acetylation of sulfamethazine in the rabbit after hydrocortisone treatment. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;248(1):348-52.

124. Zaher H, Svensson CK. Glucocorticoid induction of hepatic acetyl CoA:arylamine N-acetyltransferase activity in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1994;83(2):195-208.
125. Schuetz E, Hazelton GA, Hall JP, Watkins PB, Klaassen CD, Gluzelian PS. Induction of digitoxigenin monodigitoxoside UDP-glucuronosyltransferase activity by glucocorticoids and other inducers of cytochrome P-450p in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes and in human liver. *J Biol Chem*. 1986;261(18):8270-5.
126. Schuetz EG, Wrighton SA, Barwick JL, Guzelian CP. Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 alpha-carbonitrile regulate de novo synthesis of a common form of cytochrome P-450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver in vivo. *J Biol Chem*. 1984;259(3):1999-2006.
127. Butcher N, Ilett K, Minchin R. Substrate-dependent regulation of human arylamine N-acetyltransferase-1 in cultured cells. *Mol Pharmacol*. 2000;57(3):468-73.
128. Butcher NJ, Ilett KF, Minchin RF. Inactivation of human arylamine N-acetyltransferase 1 by the hydroxylamine of p-aminobenzoic acid. *Biochem Pharmacol* 2000;60(12):1829-36.
129. Atmane N, Dairou J, Paul A, Dupret J, Rodrigues-Lima F. Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). Reversible inactivation by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 2003;278(37):35086-92. Epub 2003 Jun 27.
130. Dairou J, Malecaze F, Dupret JM, Rodrigues-Lima F. The xenobiotic-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases in human lens epithelial cells: inactivation by cellular oxidants and UVB-induced oxidative stress. *Mol Pharmacol* 2005;67(4):1299-306. Epub 2005 Jan 11.
131. Rodrigues-Lima F, Dupret JM. Regulation of the activity of the human drug metabolizing enzyme arylamine N-acetyltransferase 1: role of genetic and non genetic factors. *Curr Pharm Des* 2004;10(20):2519-24.
132. Svensson CK, Tomilo M. Effect of H2-receptor antagonists on rat liver cytosolic acetyl CoA:arylamine N-acetyltransferase activity. *Drug Metab Dispos* 1992;20(1):74-8.
133. Cheng KC, Li YC, Yu CS, Yu FS, Lee JH, Lin ML, et al. Ketoprofen-inhibited N-acetyltransferase activity and gene expression in human colon tumor cells. *Anticancer Res* 2006;26(2A):1105-11.

134. Lin CC, Kao ST, Chen GW, Chung JG. Berberine decreased N-acetylation of 2-aminofluorene through inhibition of N-acetyltransferase gene expression in human leukemia HL-60 cells. *Anticancer Res* 2005;25(6B):4149-55.
135. Chen YS, Ho CC, Cheng KC, Tyan YS, Hung CF, Tan TW, et al. Curcumin inhibited the arylamines N-acetyltransferase activity, gene expression and DNA adduct formation in human lung cancer cells (A549). *Toxicol In Vitro* 2003;17(3):323-33.
136. Smolen TN, Brewer JA, Weber WW. Testosterone modulation of N-acetylation in mouse kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;264(2):854-8.
137. Menendez-Pelaez A, Marrufo B, Reiter R, Santana C, Guerrero J. Testosterone increases N-acetyltransferase activity in both male and female Syrian hamster harderian glands. *Biochem Int.* 1989;19(1):115-21.
138. Estrada-Rodgers L, Levy GN, Weber WW. Expression of arylamine N-acetyltransferase, NAT2, during development of CD1 mice. *Pharmacologist* 1997;39.
139. Estrada-Rodgers L, Levy GN, Weber WW. Characterization of a hormone response element in the mouse N-acetyltransferase 2 (Nat2*) promoter. *Gene Expr* 1998;7(1):13-24.
140. Mitchell KR, Warshawsky D. Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicol Lett* 2003;139(1):11-23.
141. Baler R, Covington S, Klein D. Rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene: upstream and intronic components of a bipartite promoter. *Biol Cell.* 1999;91(9):699-705.
142. Chansard M, Iwahana E, Liang J, Fukuhara C. Regulation of cAMP-induced arylalkylamine N-acetyltransferase, Period1, and MKP-1 gene expression by mitogen-activated protein kinases in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;139(2):333-40.
143. Baler R, Covington S, Klein D. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem.* 1997;272(11):6979-85.
144. Bogoyevitch M, Boehm I, Oakley A, Ketterman A, Barr R. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1697(1-2):89-101.
145. Boschert U, Dickinson R, Muda M. Regulated expression of dual specificity protein phosphatases in rat brain. *Neuroreport.* 1998;9(18):4081-6.

146. Burke Z, Well T, Carter D, Klein D, Baler R. Genetic targeting: the serotonin N-acetyltransferase promoter imparts circadian expression selectively in the pineal gland and retina of transgenic rats. *J Neurochem.* 1999;73(4):1343-9.
147. Jacobs P, Glorieux G, Vanholder R. Interleukin/cytokine profiles in haemodialysis and in continuous peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(Suppl 5):V41-45.
148. Renton KW, Knickle LC. Regulation of hepatic cytochrome P-450 during infectious disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990;68(6):777-81.
149. Stanley LA, Adam DJ, Balkwill FR, Griffin D, Wolf CR. Differential effects of recombinant interferon alpha on constitutive and inducible cytochrome P450 isozymes in mouse liver. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(2):311-20.
150. Fukuda Y, Ishida N, Noguchi T, Kappas A, Sassa S. Interleukin-6 down regulates the expression of transcripts encoding cytochrome P450 IA1, IA2 and IIIA3 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;184(2):960-5.
151. Fukuda Y, Sassa S. Suppression of cytochrome P450IA1 by interleukin-6 in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(7):1187-95.
152. Clark MA, Bing BA, Gottschall PE, Williams JF. Differential effect of cytokines on the phenobarbital or 3-methylcholanthrene induction of P450 mediated monooxygenase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 1995;49(1):97-104.
153. Sanne JL, Krueger KE. Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat central nervous system: a study by polymerase chain reaction and in situ hybridization. *J Neurochem.* 1995;65(2):528-36.
154. Barker CW, Fagan JB, Pasco DS. Interleukin-1 beta suppresses the induction of P4501A1 and P4501A2 mRNAs in isolated hepatocytes. *J Biol Chem.* 1992;267(12):8050-5.
155. Wright K, Morgan ET. Regulation of cytochrome P450IIC12 expression by interleukin-1 alpha, interleukin-6, and dexamethasone. *Mol Pharmacol.* 1991;39(4):468-74.
156. Buranrat B, Prawan A, Sripan B, V. K. Inflammatory cytokines suppress arylamine N-acetyltransferase 1 in cholangiocarcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2007;13(46):6219-25.

157. Massry SG, Klin M, Ni Z, Tian J, Kedes L, Smogorzewski M. Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats. *Kidney Int* 1995;48(4):1324-31.
158. Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y. Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2001;276(43):39638-44.
159. Tian Y, Ke S, Denison MS, Rabson AB, Gallo MA. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 1999;274(1):510-5.
160. Nakchbandi I, Weir E, Insogna K, Philbrick W, Broadus A. Parathyroid hormone-related protein induces spontaneous osteoclast formation via a paracrine cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):7296-300.
161. Watson P, Fraher L, Hendy GN, Chung U, Kisiel M, Natale B, et al. Nuclear localization of the type 1 PTH/PTHrP receptor in rat tissues. *J Bone Miner Res*. 2000;15(6):1033-44.
162. Fu Q, Jilka R, Manolagas S, O'Brien C. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48868-75. Epub 2002 Oct 2.
163. Zenz R, Wagner E. Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(7):1043-9. Epub 2005 Dec 20.
164. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002;4(5):E131-6.
165. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler H, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* 2008;10(1):201. Epub 2008 Jan 18.
166. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):725-34.
167. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*. 1999;20(4):435-59.
168. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 2004;6(3):203-8.

169. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(10):749-59.
170. Xiao C, Ghosh S. NF-kappaB, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses. *Adv Exp Med Biol* 2005;560:41-5.
171. Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, 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):17882-9. Epub 2006 Apr 10.
172. Xia Y, Ye B, Li Y, Wang J, He X, Lin X, et al. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF-kappa B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *J Immunol*. 2004;173(6):4207-17.
173. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmüller J, Maurer A, Sperling K, Roots I. Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity. *Am J Hum Genet*. 1995;57(3):581-92.
174. Lee B, Wong D, Benowitz N, Sullam P. Altered patterns of drug metabolism in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Ther*. 1993;53(5):529-35.
175. O'Neil W, Gilfix B, DiGirolamo A, Tsoukas C, Wainer I. N-acetylation among HIV-positive patients and patients with AIDS: when is fast, fast and slow, slow? *Clin Pharmacol Ther*. 1997;62(3):261-71.