

Université de Montréal

**Modulation du cytochrome P450 par l'insuffisance
rénale chronique dans un modèle murin transgénique**

par

Mélina Dani

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Pharmacologie

Août 2009

© Mélina Dani, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Modulation du cytochrome P450 par l'insuffisance rénale chronique
dans un modèle murin transgénique

présenté par :
Mélina Dani

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Patrick Du Souich, président-rapporteur
Dr Vincent Pichette, directeur de recherche
Dr Éric Thorin, membre du jury

Résumé

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est associée à une diminution de la clairance métabolique des médicaments résultant en partie de l'inhibition des cytochromes P450 (CYP450) et des enzymes de phase II, notamment la N-acétyltransférase 2 (NAT2), tel que démontré chez le rat.

Nous avons précédemment démontré le rôle de l'hormone parathyroïdienne (PTH) dans la diminution des CYP450 hépatiques chez le rat souffrant d'IRC. Toutefois, l'étude des mécanismes sous-jacents pouvant être facilitée par l'utilisation de souris transgéniques, l'objectif de cette étude consiste à confirmer ces résultats dans un modèle murin.

D'abord, afin de valider ce modèle expérimental, une IRC a été induite par néphrectomie subtotale 3/4 chez des souris C57BL/6, puis l'expression protéique et génique des CYP450 et de la Nat2 hépatiques a été étudiée. Les résultats indiquent que l'IRC induit effectivement une diminution d'expression de ces enzymes dans un modèle murin.

Ensuite, des souris mutantes pour le gène codant la PTH ($PTH^{-/-}$) et les souris correspondantes de type sauvage ($PTH^{+/+}$) ont été néphrectomisées, puis l'expression protéique et génique des CYP450 hépatiques a été analysée. Si la PTH est responsable de la diminution du CYP450 en situation d'IRC, les souris $PTH^{-/-}$ atteintes d'IRC ne devraient présenter aucune baisse d'expression. Les résultats obtenus pour les souris $PTH^{-/-}$ ne peuvent être interprétés, puisque chez les souris $PTH^{+/+}$ atteintes d'IRC, le CYP450 hépatique est inchangé par rapport aux souris $PTH^{+/+}$ témoins. Des expériences supplémentaires seront requises afin de déterminer si la régulation à la baisse du CYP450 précédemment observée est contrecarrée par l'absence de PTH.

Mots-clés : cytochrome P450, hormone parathyroïdienne, insuffisance rénale chronique, N-acétyltransférase, souris transgéniques

Abstract

Chronic renal failure (CRF) is associated with a decrease in the metabolic clearance of drugs, which is partly due to a reduced expression of cytochrome P450 (CYP450) and phase II enzymes, namely N-acetyltransferase 2 (NAT2). This phenomenon has been shown in the rat.

We have previously demonstrated the role of parathyroid hormone (PTH) in CYP450 down-regulation in rats with CRF. However, the study of mechanisms underlying the down-regulation of CYP450 by PTH should be confirmed with the use of knockout mice. The aim of this study was, therefore, to confirm these results in a murine model.

Firstly, to validate this experimental model, CRF was produced in C57BL/6 mice using the 3/4 subtotal nephrectomy. Protein and mRNA levels of hepatic CYP450 and Nat2 were then analyzed. The results showed that CRF down-regulates these enzymes, as previously observed in the rat.

Finally, PTH-null mice ($PTH^{-/-}$) and their corresponding wild type ($PTH^{+/+}$) were nephrectomized in order to analyze protein and mRNA expression of hepatic CYP450. If PTH is responsible for the decrease of CYP450 in the presence of CRF, then $PTH^{-/-}$ mice with CRF should not show any reduction in CYP450 expression compared to controls. The results concerning the $PTH^{-/-}$ mice could not be interpreted because $PTH^{+/+}$ mice with CRF did not show any significant difference of CYP450 expression when compared to $PTH^{+/+}$ controls. Thus, additional experiments must be conducted in order to determine the role of PTH in CYP450 down-regulation in CRF mice.

Keywords : chronic renal failure, cytochrome P450, knockout mice, N-acetyltransferase, parathyroid hormone

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1 L'insuffisance rénale chronique.....	1
1.1.1 Causes et symptômes.....	2
1.1.2 Hyperparathyroïdie secondaire.....	7
1.2 La pharmacocinétique des xénobiotiques.....	9
1.2.1 Absorption.....	9
1.2.2 Distribution.....	10
1.2.3 Métabolisme.....	12
1.2.4 Élimination.....	18
1.2.5 Transport membranaire.....	19
1.3 La pharmacocinétique en présence d'une insuffisance rénale chronique.....	21
1.3.1 Modulation de l'absorption.....	21
1.3.2 Modulation de la distribution.....	21
1.3.3 Modulation de l'élimination.....	22
1.4 Hormone parathyroïdienne et métabolisme hépatique.....	25
1.5 Hypothèse et objectifs.....	26
2. Résultats.....	28
2.1 Article.....	28
2.2 Étude avec le modèle murin transgénique.....	48
2.2.1 Caractérisation du modèle.....	50
2.2.2 Effets de l'IRC sur les enzymes du CYP450 hépatique.....	52
2.2.3 Difficulté à moduler les enzymes du CYP450 chez les souris <i>PTH^{+/+}</i> atteintes d'IRC.....	57
3. Discussion.....	60
3.1 Modèle murin C57BL/6.....	61
3.1.1 Induction et marqueurs de l'insuffisance rénale chronique.....	61
3.1.2 Expression des enzymes du CYP450 hépatique chez les souris C57BL/6.....	63
3.1.3 Expression de la Nat2 hépatique chez les souris C57BL/6.....	65

3.2	Modèle murin transgénique <i>PTH</i> ^{-/-}	66
3.2.1	Conséquences phénotypiques de l'absence de PTH	66
3.2.2	Absence de PTH et insuffisance rénale chronique.....	68
3.3	Mécanisme d'action proposé.....	73
4.	Conclusion.....	75

Liste des tableaux

Tableau I	Classification des stades de l'insuffisance rénale chronique.....	1
Tableau II	Quatre familles d'enzymes du CYP450 majeures impliquées dans le métabolisme des médicaments chez les humains, les souris et les rats.....	14
Tableau III	Principales réactions de phase II.....	16
Tableau IV	Séquences nucléotidiques des amorces de PCR.....	47
Tableau V	Caractéristiques biochimiques des souris <i>PTH^{-/-}</i>	48
Tableau VI	Caractéristiques biochimiques des souris <i>PTH^{+/+}</i> et <i>PTH^{-/-}</i> témoins et atteintes d'IRC.....	51

Liste des figures

Figure 1.1	Pathogenèse de la néphropathie diabétique.....	3
Figure 1.2	Rétro-contrôle de la sécrétion de PTH.....	7
Figure 1.3	Schéma des phases du métabolisme des médicaments.....	12
Figure 1.4	Isoformes majeures des enzymes du CYP450 hépatique impliquées dans le métabolisme des médicaments.....	13
Figure 1.5	Schéma du transport de médicaments dans le foie et le rein.....	19
Figure 2.1	Obtention de souris transgéniques à partir de cellules souches embryonnaires.....	46
Figure 2.2	Gel d'agarose révélé à la lumière ultraviolette présentant un exemple de génotypage.....	47
Figure 2.3	Expression protéique des isoformes du CYP450 hépatique dans les microsomes de souris <i>PTH</i> ^{-/-} et leurs témoins <i>PTH</i> ^{+/+}	49
Figure 2.4	ARNm codant pour les isoformes du CYP450 hépatique chez les souris <i>PTH</i> ^{-/-} et leurs témoins <i>PTH</i> ^{+/+}	50

Figure 2.5	Expression protéique et génique du CYP3A11 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris exprimaient (C57BL/6) ou non ($PTH^{-/-}$) le gène <i>PTH</i>	53
Figure 2.6	Expression protéique et génique du CYP2C29 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris exprimaient (C57BL/6) ou non ($PTH^{-/-}$) le gène <i>PTH</i>	54
Figure 2.7	Expression protéique et génique du CYP3A11 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris exprimaient ($PTH^{+/+}$) ou non ($PTH^{-/-}$) le gène <i>PTH</i>	56
Figure 2.8	Expression protéique et génique du CYP2C29 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris exprimaient ($PTH^{+/+}$) ou non ($PTH^{-/-}$) le gène <i>PTH</i>	57

Article

Figure 1	Protein expression of hepatic cytochrome P450 isoforms in microsomes from control and CRF mice.....	43
Figure 2	mRNA encoding hepatic cytochrome P450 isoforms in control and CRF mice.....	44
Figure 3	Expression of liver NAT2 protein and mRNA in control and CRF mice.....	45

Liste des sigles et abréviations

- 1,25(OH)₂D₃** 1,25-dihydroxycholécalférol
- 25(OH)D₃** 25-hydroxycholécalférol
- ABC** *ATP-binding cassette*
- AGP** α_1 -glycoprotéine acide
- AhR** *Aryl hydrocarbon receptor*
- BCRP** *Breast cancer resistance protein*
- BUN** Blood urea nitrogen
- CaR** Récepteurs sensibles au calcium
- CL_{NR}** Clairance non rénale
- CL_R** Clairance rénale
- CL_{sys}** Clairance systémique
- CMPF** *3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid*
- CRF** *Chronic renal failure*
- CYP450** Cytochrome P450
- DFG** Débit de filtration glomérulaire
- EPO** Érythropoïétine
- F** Biodisponibilité
- FGF-23** *Fibroblast growth factor-23*
- HA** Acide hippurique
- HDL** *High-density lipoprotein*
- IA** Acide 5-dihydroxy-indole acétique
- IDL** *Intermediate-density lipoprotein*
- IRC** Insuffisance rénale chronique
- IRT** Insuffisance rénale terminale
- IS** Sulfate d'indoxyle
- LDL** *Low-density lipoprotein*
- MCV** Maladies cardiovasculaires

MDR *Multidrug resistance*
MRP *Multidrug resistance-associated protein*
NAT N-acétyltransférase
Neo^r Gène de résistance à la néomycine
Nx Néphrectomie
OAT *Organic anion transporter*
OATP *Organic anion transporting polypeptide*
OCT *Organic cation transporter*
OPG Ostéoprotégérine
PDTC Dithiocarbamate de pyrrolidine
Pgp P-glycoprotéine
PTH Hormone parathyroïdienne
PTH^{-/-} Mutant pour le gène codant la PTH
PTHrP *PTH-related peptide*
SGLT-1 *Sodium-dependent glucose transporter 1*
SLC *Solute carrier*
TCDD *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*
UGT UDP-glucuronyltransférase
Vd Volume de distribution
VDR Récepteur de la vitamine D
VLDL *Very-low-density lipoprotein*

*Ce n'est pas parce que les choses sont
difficiles que nous n'osons pas, c'est parce
que nous n'osons pas que les choses sont
difficiles. (Sénèque)*

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ces formidables années universitaires.

Je tiens à remercier le Dr Vincent Pichette, qui, en tant que Directeur de recherche, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de mon projet, ainsi que tous les membres du laboratoire pour la générosité et la patience dont il ont su faire preuve malgré toutes leurs occupations.

Mes remerciements s'adressent également à toute ma famille pour leur soutien et leur compréhension au cours de ces deux années. Je n'oublie surtout pas mon chéri, Rocco, pour son encouragement et sa grande attention.

Enfin, je remercie tous mes proches et amis, qui ont toujours été présents.

Merci à tous et à toutes.

1. Introduction

1.1 L'insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est caractérisée par une détérioration progressive de la fonction rénale. Elle constitue un souci grandissant dans notre société, en raison de son incidence accrue. En effet, on estime actuellement à 19,2 millions le nombre de personnes touchées par l'IRC aux États-Unis, soit 11% de la population adulte totale¹. Au Canada, parmi les 1,9 à 2,3 millions de personnes souffrant d'IRC², 33 832 patients étaient traités pour une insuffisance rénale terminale (IRT) en 2006³. De ce fait, les coûts associés au traitement de l'IRT s'avèrent considérables, puisqu'ils représentent 1,2% du budget total alloué aux soins de santé au Canada⁴.

D'après les lignes directrices émises par la *National Kidney Foundation*, l'IRC peut être identifiée selon deux critères. En premier lieu, elle se définit par la présence de dommages rénaux (anomalies structurales ou fonctionnelles) chez un patient pour une période de plus de trois mois, avec ou sans diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG). En second lieu, un DFG maintenu sous 60 mL/min/1,73m² durant au moins trois mois, avec ou sans dommage rénal, correspond également à l'IRC⁵, puisque le DFG normal équivaut à 120 mL/min/1,73m²⁶. Afin de tenir compte des différences morphologiques interindividuelles, le DFG est exprimé en fonction de la surface corporelle moyenne d'un adulte, soit 1,73m²⁷. D'après la valeur de DFG estimée ainsi que les anomalies anatomiques et urinaires (albuminurie, protéinurie, hématurie), cinq stades distincts catégorisent la sévérité de l'IRC (**Tableau I**)⁸.

Le stade 5 représente l'incapacité absolue des reins à maintenir l'homéostasie et oblige l'emploi d'un traitement de substitution rénale pour assurer la survie du patient. Ces méthodes incluent notamment la dialyse péritonéale, l'hémodialyse et la transplantation rénale⁹.

Stade	Description	DFG (mL/min/1,73m ²)
1	Domage rénal avec DFG normal ou ↑	≥ 90
2	Domage rénal avec DFG légèrement ↓	60-89
3	DFG modérément ↓	30-59
4	DFG sévèrement ↓	15-29
5	Défaillance rénale	< 15 (ou dialyse)

Tableau I Classification des stades de l'insuffisance rénale chronique⁸

1.1.1 Causes et symptômes

Le diagnostic de l'IRC peut parfois être retardé puisque les signes et symptômes d'une atteinte rénale sont insidieux et non spécifiques⁶. Par ailleurs, diverses causes sont associées au développement de la maladie. De 1990 à 2002, la majorité des nouveaux cas d'IRC rapportés découlaient du diabète mellitus et de l'hypertension. D'autres désordres tels que la glomérulonéphrite, l'ischémie, l'infection, la maladie polykystique rénale, l'obstruction et les troubles auto-immuns peuvent conduire à l'IRC¹⁰.

1.1.1.1 Le diabète

Les mécanismes pathophysiologiques qui engendrent la néphropathie diabétique reposent principalement sur des changements hémodynamiques et biochimiques. En premier lieu, des facteurs comme l'angiotensine II, le monoxyde d'azote, le peptide natriurétique auriculaire, le glucagon et l'insuline exercent des changements notables sur la résistance artériolaire, ce qui donne lieu à une hyperfiltration glomérulaire et à une hyperperfusion¹¹. En second lieu, l'hyperglycémie caractéristique du diabète induirait un défaut de transport d'électron dans la chaîne respiratoire mitochondriale, résultant en une production excessive de dérivés réactifs de l'oxygène¹². Cette augmentation du stress oxydatif activerait les réactions de glycation de protéines et favoriserait la formation de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans la production et dans le dépôt de matrice extracellulaire, engendrant par conséquent une glomérulosclérose et une fibrose

tubulo-interstitielle (**Figure 1.1**)¹³. Chez les patients, la progression de la maladie peut être évaluée avec l'apparition d'une protéinurie permanente, dont le risque majeur est l'évolution vers l'insuffisance rénale terminale (IRT)⁶.

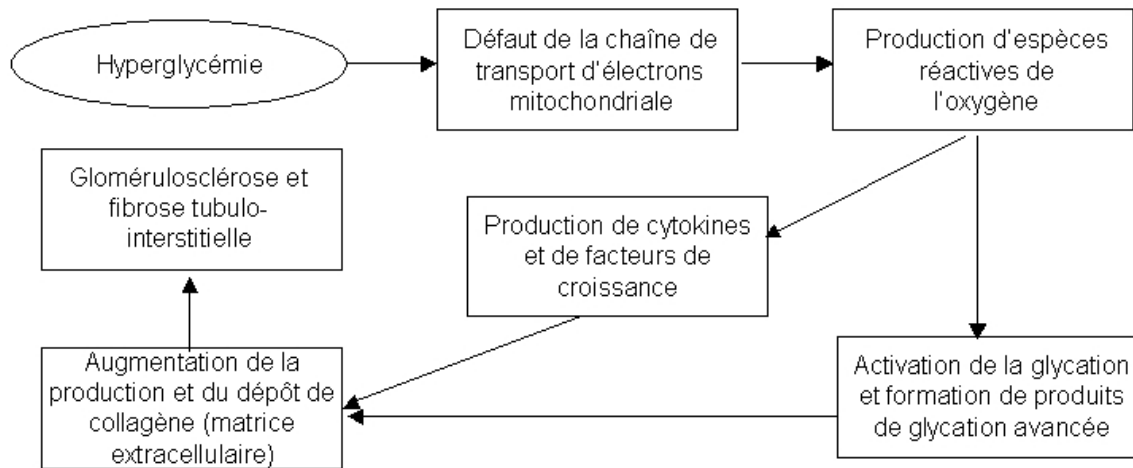


Figure 1.1 Pathogenèse de la néphropathie diabétique¹³

1.1.1.2 L'hypertension

La néphrosclérose hypertensive constitue la deuxième cause la plus commune d'IRT. Cependant, bien que le lien entre l'hypertension et le rein soit évident, les mécanismes d'apparition des lésions artérielles, artériolaires et glomérulaires demeurent toujours incertains¹⁴. Les caractéristiques histopathologiques relatives à la néphrosclérose incluent des changements microvasculaires tels la hyalinose de l'artéiole afférente (dépôts de substance vitreuse due à la destruction du collagène), ainsi que des altérations au niveau de la paroi des artères pré-glomérulaires, par exemple l'épaississement de l'intima¹⁵. Ces modifications contribuent à la hausse de la pression capillaire glomérulaire et permettent le passage de protéines plasmatiques¹⁴.

1.1.1.3 Signes et symptômes

Quelque soit la cause de la maladie, une liste de symptômes généraux sont retrouvés chez les patients souffrant d'une atteinte rénale : fatigue, œdème, troubles cardiovasculaires, symptômes gastro-intestinaux, etc (**Encadré 1.1**)⁶.

Généraux	Gastro-intestinaux
Fatigue et malaise	Anorexie
Œdème (souvent périphérique et périorbitaire)	Nausées et vomissements
Diminution du débit urinaire aux stades avancés	Dysgueusie (goût métallique)
Ophthalmologiques	Constipation
Signes funduscopiques d'hypertension (rétrécissements segmentaires des artères et aspect cuivré ou en fil d'argent)	Saignements
Signes funduscopiques de diabète (exsudats cotonneux)	Dermiques
Cardiaques	Prurit
Hypertension	Ecchymoses
Insuffisance cardiaque, surcharge liquidienne	Pâleur
Péricardite	Neuromusculaires
Athérosclérose accélérée	Syndrome des jambes sans repos
	Crampes musculaires
	Fonctions cognitives altérées
	Convulsions
	Neuropathie périphérique
	Malnutrition protéino-énergétique, perte de masse maigre
	Douleurs osseuses (possiblement associées à l'ostéomalacie)

Encadré 1.1 Signes et symptômes associés à l'IRC⁶

L'IRC est également à l'origine de différents désordres métaboliques attribuables à l'accumulation ou au déficit de diverses substances de même qu'au dérèglement de voies métaboliques importantes⁹.

1.1.1.3.1 Anémie

Chez les patients, il existe une forte corrélation entre la prévalence de l'anémie et la sévérité de l'IRC. En effet, plus le stade est avancé, plus la proportion de patients souffrant d'anémie augmente¹⁶. Ce désordre est caractérisé par la réduction de la concentration d'hémoglobine, de l'hématocrite et/ou du décompte d'érythrocytes¹⁷. Le principal mécanisme impliqué dans le développement de l'anémie en présence d'IRC correspond à une diminution de synthèse d'érythropoïétine (EPO). Il s'agit d'une hormone de nature glycoprotéique sécrétée par les fibroblastes interstitiels rénaux essentielle à la croissance et à la différenciation des globules rouges au niveau de la moelle osseuse¹⁸. En situation d'IRC, l'atrophie tubulaire génère une fibrose tubulo-interstitielle, compromettant alors la synthèse d'EPO et résultant en une anémie¹⁷.

1.1.1.3.2 Risques cardiovasculaires

Parmi les complications reliées à l'IRC, les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de décès chez les patients¹⁹. Outre l'hypertension et le diabète, divers facteurs spécifiques aux patients atteints d'IRC contribuent à l'augmentation du risque cardiovasculaire¹⁷. Par exemple, l'anémie, citée ci-haut, pourrait jouer un rôle dans le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche²⁰. Des niveaux sériques anormaux de phosphate, de produit phosphocalcique, et d'hormone parathyroïdienne (PTH) sont associés à une progression de la calcification artérielle, favorisant l'artériolosclérose et la rigidité de la paroi vasculaire²¹. L'ostéoprotégérine (OPG), un facteur impliqué dans le remodelage osseux, a également été associée à la progression de l'athérosclérose et à une augmentation du risque d'événements cardiovasculaires²². En outre, les marqueurs de l'inflammation semblent des facteurs prédictifs des MCV : certaines études ont corrélé la concentration sérique de protéine C-réactive aux événements cardiovasculaires survenant en situation d'IRC²³. Enfin, la perte de fonction rénale augmente également le risque de développer une insuffisance cardiaque congestive par un mécanisme encore imprécis²⁴.

1.1.1.3.3 Dyslipidémie

Plusieurs facteurs contribuent au développement de la dyslipidémie associée à l'IRC. Les patients présentent une diminution d'activité de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique, empêchant alors la recapture des lipoprotéines athérogènes (riches en triglycérides) par le foie et les tissus périphériques, et favorisant leur circulation¹⁷. Le profil lipidique est modifié : augmentation des niveaux de triglycérides, diminution du cholestérol des HDL (*High-density lipoprotein*) et des LDL (*Low-density lipoprotein*), augmentation du cholestérol dans les VLDL (*Very-low-density lipoprotein*) et les IDL (*Intermediate-density lipoprotein*), et enrichissement des LDL et des HDL en triglycérides²⁵.

1.1.1.3.4 Dénutrition

Au cours de la progression de la maladie, des changements liés au métabolisme énergétique peuvent se manifester. Les patients souffrent de « malnutrition urémique », un désordre caractérisé par une diminution des réserves protéiques (perte de masse corporelle, accumulation de créatinine sérique) et des protéines viscérales (refléte par des niveaux sériques d'albumine et de pré-albumine diminués)²⁶.

1.1.1.3.5 Ostéodystrophie rénale

Enfin, diverses anomalies du métabolisme osseux sont retrouvées chez les patients atteints d'IRC. L'ostéodystrophie rénale correspond aux différents changements histologiques de l'architecture osseuse liés à la physiopathologie de l'IRC. Des concentrations plasmatiques inadéquates de phosphate et de calcium, régulées par la PTH, de même que des niveaux anormaux de 1,25-dihydroxy-vitamine D sont en cause de l'apparition de ces changements (voir section 1.1.2)¹⁷.

1.1.2 Hyperparathyroïdie secondaire

L'hyperparathyroïdie secondaire constitue une complication commune de l'IRC. Elle est définie par une sécrétion excessive de PTH résultant d'une incapacité des reins à maintenir l'homéostasie phospho-calcique¹⁰.

1.1.2.1 Rôles de l'hormone parathyroïdienne

La PTH est une hormone polypeptidique de 84 acides aminés sécrétée par les cellules principales des glandes parathyroïdes en réponse à une faible concentration de calcium (Ca^{2+})²⁷. Les changements de calcémie sont détectés par des récepteurs couplés aux protéines G sensibles au calcium (CaR) présents à la surface des cellules parathyroïdiennes. Dans des conditions physiologiques normales, le Ca^{2+} lié au CaR freine la sécrétion de PTH²⁸. Or, une diminution des niveaux de Ca^{2+} entraîne la libération des granules sécrétoires au niveau des parathyroïdes, et ainsi libère la PTH, permettant d'exercer son action sur les os, les intestins et les reins pour rétablir la calcémie normale (**Figure 1.2**)²⁹. Au niveau des os et des reins, elle agit en se liant aux récepteurs PTH/PTHrP de type 1 afin d'activer la résorption osseuse et d'augmenter la réabsorption du Ca^{2+} dans le tubule rénal proximal. La PTH stimule également la production de la forme active de la vitamine D, le 1,25-dihydroxycholécalférol (1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol), en régulant l'hydroxylation du 25-hydroxycholécalférol (25(OH)D₃ ou calcidiol) en position 1 par l'enzyme 1 α -hydroxylase dans les cellules du tubule rénal. La vitamine D activée favorise alors l'absorption du Ca^{2+} par le duodénum³⁰.

Par ailleurs, des études ont aussi associé la sécrétion de PTH à l'équilibre du phosphore plasmatique. En effet, une concentration de phosphore élevée est associée à une augmentation de sécrétion de la PTH. Or, l'effet direct du phosphore sur les parathyroïdes demeure incertain. Des études animales ont toutefois démontré que le phosphore régulait l'expression d'ARNm codant la PTH, indépendamment des niveaux sériques de calcium et de 1,25(OH)₂D₃²⁸.

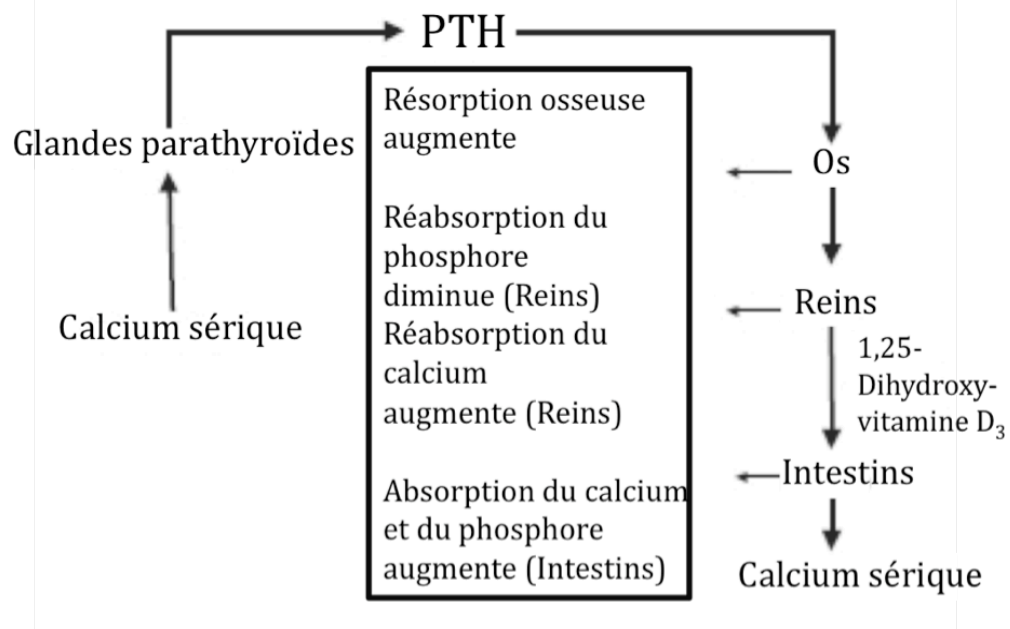


Figure 1.2 Rétro-contrôle de la sécrétion de PTH¹⁰

1.1.2.2 Physiopathologie de l'hyperparathyroïdie secondaire

Au cours de l'évolution de l'IRC, les patients présentent une déficience en calcitriol. La quantité circulante est amoindrie en raison d'une diminution d'expression de la 1α -hydroxylase au niveau du rein¹⁰. Des études *in vitro* ont démontré que la vitamine D exerçait un effet inhibiteur direct sur les glandes parathyroïdes à travers le récepteur cytoplasmique de la vitamine D (VDR), entraînant une réduction d'expression de l'ARNm codant la PTH. Incidemment, une diminution de calcitriol provoque une augmentation de la synthèse de PTH³¹. De plus, la déficience en vitamine D engendre une hypocalcémie due à une absorption intestinale de Ca^{2+} réduite, conduisant ainsi à une sécrétion excessive de PTH. Parallèlement, la perte de fonction rénale est associée à une rétention du phosphore, qui stimule la sécrétion de PTH, de même que l'expression du *fibroblast growth factor-23* (FGF-23) responsable d'inhiber l'activité de la 1α -hydroxylase³². La combinaison de ces phénomènes (diminution de vitamine D, hypocalcémie et hyperphosphatémie) conduit alors à l'hyperplasie des glandes parathyroïdes¹⁰.

1.2 La pharmacocinétique des xénobiotiques

Tel que mentionné précédemment, l'IRC s'accompagne d'une diminution du débit de filtration glomérulaire. De ce fait, l'élimination rénale des xénobiotiques est affectée. Or, la présente étude s'intéresse davantage à l'effet de l'IRC sur l'élimination hépatique. La section suivante décrit alors les concepts généraux de la pharmacocinétique des médicaments.

1.2.1 Absorption

Quelle que soit la formulation d'un médicament, il doit d'abord être absorbé afin d'atteindre la circulation sanguine³³. La fraction de la dose atteignant la circulation sanguine représente la biodisponibilité (F). Divers facteurs peuvent l'influencer. Par exemple, suite à l'absorption gastro-intestinale, le médicament circule par la veine porte jusqu'au foie, où une proportion plus ou moins importante est biotransformée en métabolites et éliminée avant même d'atteindre la circulation systémique. Ainsi, la biodisponibilité est fortement réduite : ce phénomène se nomme *effet de premier passage*³⁴.

1.2.1.1 Administration orale

Suivant l'ingestion, le composé peut franchir la paroi du tractus gastro-intestinal par diffusion passive ou à l'aide d'un transporteur. Dans le cas de la diffusion passive, seule la fraction soluble non-ionisée peut traverser les membranes cellulaires le long d'un gradient de concentration. La quantité absorbée repose alors sur le pKa de la molécule et le pH ambiant. La vitesse d'absorption dépend des propriétés physicochimiques de la molécule : plus elle est petite et liposoluble, plus son passage à travers la bicouche lipidique sera rapide. D'autres facteurs tels que la surface de contact, la motilité, le flot sanguin intestinal ou l'ingestion d'un repas riche en lipides peuvent influencer la vitesse d'absorption³⁵.

Le transport actif permet le passage de molécules à travers les membranes contre un gradient électrochimique. Il s'effectue à l'aide de transporteurs possédant des substrats

spécifiques et nécessite une dépense énergétique. La liaison au transporteur est saturable, et peut donner lieu à des interactions médicamenteuses. Le transport actif secondaire utilise l'énergie électrochimique emmagasinée par un gradient pour permettre le passage d'une autre molécule contre son gradient de concentration. Par exemple, le transporteur intestinal SGLT-1 (*sodium-dependent glucose transporter 1*) utilise l'énergie du gradient de sodium afin de transporter le glucose à travers la membrane apicale contre son gradient. Une molécule peut également traverser les membranes à l'aide de la diffusion facilitée, qui nécessite aussi des transporteurs. Cependant, aucune dépense énergétique n'est requise, ainsi la molécule est transportée selon son gradient de concentration³⁴.

L'absorption intestinale de certains médicaments est limitée par des transporteurs d'efflux localisés au niveau des entérocytes. En effet, la P-glycoprotéine (Pgp), une protéine membranaire fonctionnant selon un mécanisme ATP-dépendant, renvoie les composés dans le tractus gastro-intestinal. Une modification de l'activité de la Pgp exprimée au niveau de la bordure en brosse peut ainsi affecter l'absorption de médicaments qui en sont des substrats³⁶.

1.2.1.2 Autres voies d'administration

Outre la voie d'administration orale, les xénobiotiques peuvent être absorbés au niveau sublingual, rectal, parentéral, pulmonaire, transdermal et topique. On favorisera une voie différente selon l'effet pharmacologique recherché³⁵.

1.2.2 Distribution

Suite à l'absorption du médicament, celui-ci est distribué vers les compartiments extracellulaires et intracellulaires. La vitesse et l'étendue de la distribution sont déterminées par différents facteurs physiologiques tels que le débit cardiaque, la perfusion tissulaire, la perméabilité capillaire et le volume de tissu. D'abord, le médicament atteint les tissus les plus perfusés (foie, reins, cœur) rapidement, comparativement aux tissus moins irrigués (muscles, viscères, peau/graisse). Selon les propriétés physicochimiques, la présence de

transporteurs d'efflux et la liaison aux protéines plasmatiques, la molécule diffusera plus ou moins dans les tissus³⁴.

1.2.2.1 Liaison aux protéines plasmatiques

De nombreux médicaments circulent dans les vaisseaux sanguins liés à des protéines plasmatiques telles que l'albumine, pour les acides, ou la α_1 -glycoprotéine acide (AGP), pour les bases. La fraction liée est déterminée par la concentration, l'affinité des sites de liaison pour la molécule et le nombre de sites de liaison. Il s'agit d'un processus non-linéaire saturable, qui peut être à la base d'interactions médicamenteuses. En effet, l'équilibre entre la fraction libre et la fraction liée d'un médicament fortement fixé avec un faible index thérapeutique influence fortement son effet. Si ce médicament est coadministré avec un médicament ayant une affinité élevée à la même protéine plasmatique, ils peuvent compétitionner pour les mêmes sites de liaison et modifier l'équilibre, ce qui peut causer des réactions indésirables³⁴.

1.2.2.2 Volume de distribution apparent

Les médicaments ayant une affinité élevée pour les tissus s'y accumulent à des concentrations plus élevées que dans les fluides extracellulaires et le sang. Les molécules se lient à des constituants de la cellule, agissant comme un réservoir, et l'effet du médicament peut être prolongé. La masse grasseuse peut donc servir de réservoir pour les molécules liposolubles, ce qui rend la prédiction de leur distribution plus imprécise chez les individus obèses³⁵.

Il est difficile de quantifier la distribution d'un médicament compte-tenu de l'impossibilité de mesurer les concentrations tissulaires, seul le compartiment plasmatique étant facilement accessible. La relation entre la quantité totale de médicament présente dans l'organisme et la concentration plasmatique s'exprime par le volume de distribution (Vd). Ce paramètre correspond au volume fictif dans lequel le médicament devrait être réparti pour être à la même concentration que dans le plasma. Plus sa valeur est élevée, plus le médicament sera distribué dans les tissus³⁷.

1.2.3 Métabolisme

Avant leur élimination de l'organisme, la plupart des médicaments sont métabolisés. Les systèmes enzymatiques sont principalement situés dans le foie, néanmoins, plusieurs tissus possèdent une activité métabolique. Les réactions enzymatiques se répartissent en deux phases : la phase I, comprenant des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, et la phase II, correspondant à des réactions de conjugaison (**Figure 1.3**). Le métabolisme conduit généralement à l'augmentation de l'hydrosolubilité des molécules, facilitant ainsi leur excrétion. Certains médicaments, afin de produire un effet, nécessitent une activation métabolique, alors que d'autres sont inactivés par le métabolisme. La biotransformation d'une substance peut être à l'origine d'un métabolite toxique³⁴.

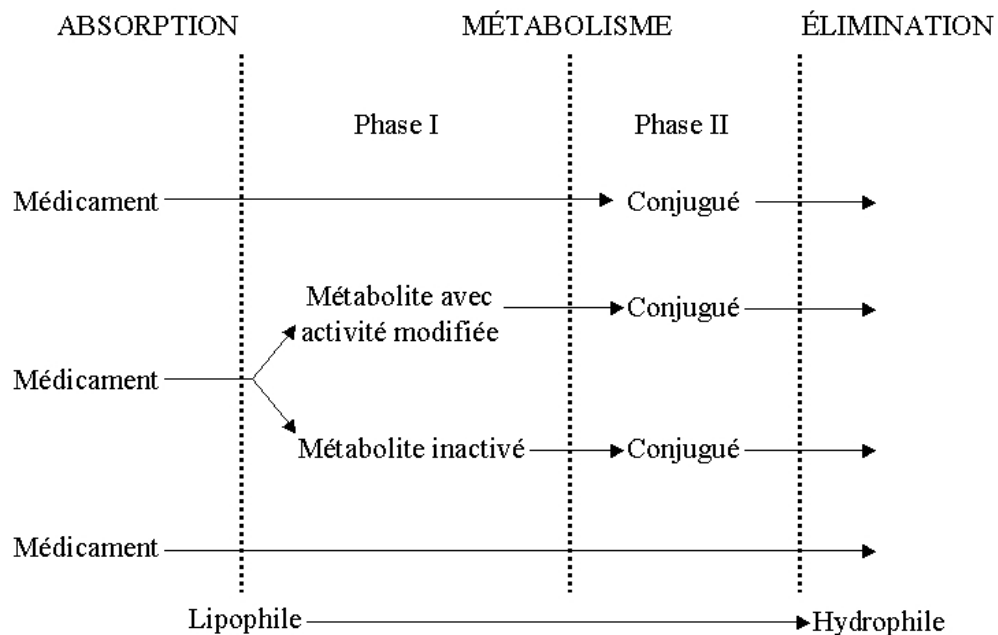
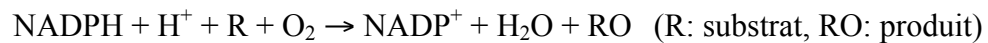


Figure 1.3 Schéma des phases du métabolisme des médicaments³⁸

1.2.3.1 Le cytochrome P450

Les réactions de phase I sont principalement effectuées par la superfamille des cytochromes P450 (CYP450). Chez les mammifères, la plupart des protéines du CYP450 se situent au niveau du réticulum endoplasmique, cependant certaines sont localisées dans la mitochondrie³⁹. Dans le réticulum endoplasmique, ces enzymes interagissent avec une flavoprotéine, la NADPH-P450 réductase, permettant des réactions catalytiques d'oxydation⁴⁰:



Le génome humain encode 57 enzymes du CYP450 différentes, dont 15 sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques⁴⁰. Les enzymes du CYP450 participent également à la synthèse et à la biotransformation de composés endogènes, tels les stéroïdes, les prostaglandines et les vitamines⁴¹. La **figure 1.4** présente les isoformes hépatiques prédominantes dans le métabolisme des médicaments ainsi que certains de leurs substrats respectifs.

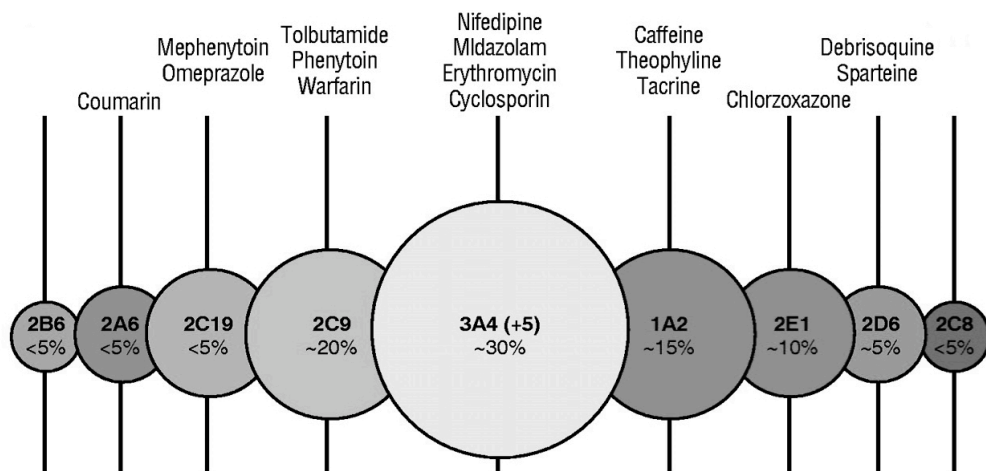


Figure 1.4 Isoformes majeures des enzymes du CYP450 hépatique impliquées dans le métabolisme des médicaments⁴⁰. La taille des cercles reflète la quantité moyenne de chaque isoforme dans le foie humain.

L'expression de certaines enzymes du CYP450 est hautement régulée, alors que les niveaux d'autres isoformes varient considérablement⁴⁰. Par exemple, en raison d'un polymorphisme génétique, le profil d'activité du CYP2D6 à travers la population présente une importante variabilité interindividuelle: certains individus ne l'expriment pas et d'autres possèdent une activité qui est augmentée par un facteur 10^4 ⁴². Ce type de différence peut fortement influencer l'effet thérapeutique d'un médicament, de même que les effets indésirables associés.

L'activité des enzymes du CYP450 peut également être modifiée par des substances inductrices ou inhibitrices agissant selon divers mécanismes. En effet, la synthèse protéique de nombreuses isoformes est médiée par des récepteurs nucléaires possédant une affinité pour les xénobiotiques⁴³. Notamment, le récepteur AhR (*Aryl hydrocarbon receptor*), lorsque lié au benzo[a]pyrène, forme un complexe qui se déplace au noyau pour activer la transcription du gène codant le CYP1A1⁴⁴. Quant à l'inhibition des enzymes du CYP450, des mécanismes différents sous-tendent la régulation de chaque isoforme : inactivation directe, médiateurs sériques, inhibition post-transcriptionnelle, etc⁴⁵⁻⁴⁸.

Parmi les enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments, les enzymes du CYP450 représentent la super-famille la plus conservée entre les espèces. De légères différences existent toutefois dans les séquences d'acides aminés primaires, pouvant entraîner des modifications majeures de l'affinité au substrat et de l'activité catalytique⁴⁹. Le **tableau II** présente les familles, les sous-familles et les enzymes principales métabolisant les xénobiotiques chez l'humain, la souris et le rat⁴¹.

Familles	Sous-familles	Enzymes		
		Humain	Souris	Rat
CYP1	A	1A1, 1A2	1a1, 1a2	1A1, 1A2
	B	1B1	1b1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13, 2A18	2a4, 2a5, 2a12, 2a22	2A2, 2A3
	B	2B6, 2B7	2b9, 2b10, 2b13, 2b19, 2b20x, 2b23	2B1, 2B2, 2B3
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2c29, 2c37, 2c38, 2c39, 2c40, 2c44, 2c50, 2c51x, 2c54, 2c55, 2c65, 2c66, 2c67, 2c68, 2c69, 2c70	2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22, 2C23
	D	2D6	2d9, 2d10, 2d11, 2d12, 2d13, 2d22, 2d26, 2d34, 2d40	2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18
	E	2E1	2e1	2E1
	F	2F1	2f2	2F4
	G	2G1	2g1	2G1
	J	2J2	2j5, 2j6, 2j7, 2j8, 2j9, 2j11, 2j12, 2j13	2J3
	R	2R1	2r1	2R1
	S	2S1	2s1	2S1
T		2t4		
U	2U1	2u1		
W	2W1	2w1		

Familles	Sous-familles	Enzymes		
		Humain	Souris	Rat
CYP3	A	3A3X, 3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3a11, 3a13, 3a16, 3a25, 3a41, 3a44, 3a57, 3a59	3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23
CYP4	A	4A11, 4A20X, 4A22	4a10, 4a12a, 4a12b, 4a14, 4a29, 4a30b, 4a31, 4a32	4A1, 4A2, 4A3, 4A8
	B	4B1	4b1	4B1
	F	4F2, 4F3, 4F8, 4F11, 4F12, 4F22	4f13, 4f14, 4f15, 4f16, 4f17, 4f18, 4f37, 4f39, 4f40	4F1, 4F4, 4F5, 4F6, 4F19
	V	4V2	4v3	
	X	4X1	4x1	4X1
	Z	4Z1		4Z1

Tableau II Quatre familles d'enzymes du CYP450 majeures impliquées dans le métabolisme des médicaments chez les humains, les souris et les rats⁴¹

1.2.3.2 Les enzymes de phase II

Outre les réactions de phase I, les réactions de phase II (**Tableau III**) contribuent également à l'ajout de groupements polaires aux molécules afin de permettre leur excrétion en milieu aqueux (urinaire ou biliaire). Elles sont catalysées par diverses enzymes nécessitant des cofacteurs, localisées au niveau cytoplasmique pour la plupart⁵⁰.

Réaction	Enzyme	Localisation	Substrats
H ₂ O	Époxyde hydrolase	Microsomes Cytosol	Époxydes
Glutathion	Glutathion transférases	Microsomes	Électrophiles
Acide glucuronique (UDPGA)	Glucuronosyl- transférases	Microsomes	Phénols, thiols, amines, acides carboxyliques
Acide sulfurique (PAPS)	Sulfo-transférase	Cytosol	Phénols, thiols, amines
Groupement méthyl (SAM)	N- et O- méthyl- transférases	Cytosol Microsomes	Phénols, amines
Acide acétique (Acétyl-CoA)	N-acétyl- transférases	Cytosol	Amines
Acides aminés (Acétyl-CoA, taurine, glycine)	Aminotransférases	Microsomes	Acides carboxyliques

Tableau III Principales réactions de phase II⁵⁰. UDPGA, acide UDP-glucuronique; PAPS, phosphoadénosine phosphosulfate; SAM, S-adénosyl méthionine; CoA, coenzyme A.

De façon similaire aux CYP450, les enzymes de phase II présentent des polymorphismes génétiques influençant l'activité métabolique chez les individus. Notamment, une mutation au niveau de la séquence codant l'enzyme UGT1A1 (UDP-glucuronyltransférase 1A1) peut entraîner une réduction de la glucuronidation, associée à une hyperbilirubinémie chez les patients⁵¹. De plus, les enzymes de phase II sont induites ou inhibées par de nombreuses substances⁵⁰.

Les réactions d'acétylation, médiées par les N-acétyltransférases (NAT), jouent également un rôle important dans le métabolisme des xénobiotiques. Par exemple, du point de vue pharmacogénétique, des variations au niveau de l'isoenzyme NAT2 influencent la vitesse d'inactivation de l'isoniazide, un agent anti-tuberculeux⁵².

1.2.4 Élimination

Les médicaments sont éliminés de l'organisme sous forme de métabolite ou bien de molécule inchangée. Les mécanismes d'élimination peuvent être décrits selon cette équation⁵³ :

$$\text{Clairance systémique (CL}_{\text{SYS}}) = \text{clairance rénale (CL}_{\text{R}}) + \text{clairance non rénale (CL}_{\text{NR}})$$

1.2.4.1 Clairance rénale

La CL_R est définie comme la quantité de médicament éliminée par unité de temps dans l'urine (mL/min), normalisée avec la concentration plasmatique :

$$CL_R = UV/P,$$

où U est la concentration dans l'urine (mg/mL), P est la concentration plasmatique (mg/mL), et V est le débit urinaire (mL/min)⁵³. L'élimination par la voie urinaire, soit la plus importante, fait intervenir trois processus distincts : la filtration glomérulaire, la sécrétion et la réabsorption tubulaires. La quantité de médicament entrant dans la lumière tubulaire par filtration dépend du débit de filtration glomérulaire et de la liaison aux protéines plasmatiques; seule la fraction libre est filtrée. Au niveau du tubule rénal proximal, une sécrétion active d'anions et de cations peut augmenter la teneur en médicament dans le tubule. Le long des tubules proximal et distal, une réabsorption passive des formes non ioniques vers la circulation sanguine est observée, toutefois, des transporteurs situés au niveau distal permettent également une réabsorption active de certaines molécules³⁴.

1.2.4.2 Clairance non rénale

La CL_{NR} inclut toutes les voies d'élimination des médicaments, à l'exception de l'élimination rénale d'une molécule inchangée. La CL_{NR} est due à l'action concertée du

métabolisme de phase I et II et des transporteurs dans le tractus gastro-intestinal et le système hépato-biliaire⁵⁴.

1.2.4.2.1 Élimination hépatique

Outre ses capacités métaboliques, le foie participe à l'excrétion des médicaments via le système biliaire. Après excrétion dans la bile, la molécule se retrouve dans la lumière intestinale, où elle peut être éliminée par la voie fécale, ou réabsorbée (cycle entéro-hépatique)³⁵. De ce fait, la clairance hépatique (CL_H) comprend la clairance métabolique et la clairance biliaire. Elle est affectée par trois facteurs : le débit sanguin hépatique (Q), la clairance intrinsèque (CL_{INT}) et la fraction libre de médicament (F_L)⁵⁵.

$$CL_H = Q \cdot CL_{INT} \cdot F_L / (Q + CL_{INT} \cdot F_L)$$

La CL_{INT} est fonction des transporteurs et des enzymes métaboliques.

1.2.4.2.2 Autres voies d'élimination

Les voies d'excrétion par la sueur, la salive et les larmes sont quantitativement négligeables. Elles dépendent principalement de la diffusion de formes non ionisées liposolubles de médicaments à travers l'épithélium des glandes, ce qui dépend du pH.

1.2.5 Transport membranaire

De l'absorption d'un médicament jusqu'à son élimination, les transporteurs membranaires exercent une influence considérable sur la biodisponibilité⁵⁶. Il existe plusieurs types de transporteurs chez l'humain permettant l'influx ou l'efflux de molécules des cellules. Par exemple, la super-famille SLC (*Solute carrier*) regroupe 43 familles, incluant les transporteurs OATPs (*organic anion transporting polypeptide*), OATs (*organic anion transporter*) et OCTs (*organic cation transporter*). Ces protéines sont impliquées dans l'influx de molécules dans le foie (OATPs) et le rein (OATs/OCTs). Quant à la famille ABC (*ATP-binding cassette*), elle inclut notamment les transporteurs MDR (*multidrug resistance* ou Pgp), MRPs (*multidrug resistance-associated protein*) et BCRP (*breast*

cancer resistance protein), qui sont associés à une résistance à plusieurs médicaments. Ils empêchent l'accumulation intracellulaire de ceux-ci et diminuent ou même abolissent leurs effets. Puisque le transport représente un élément additionnel dans la pharmacocinétique et la toxicocinétique cellulaires, le modèle à deux phases décrit précédemment est insuffisant. La **figure 1.5** illustre alors un concept de phases étendu incluant l'action des transporteurs⁵⁷.

Tout comme les enzymes participant au métabolisme, l'expression des protéines de transport est fortement influencée par les polymorphismes génétiques et les substances inductrices ou inhibitrices. Selon le rôle et la localisation des transporteurs, les changements d'expression entraîneront une réponse pharmacologique différente⁵⁸.

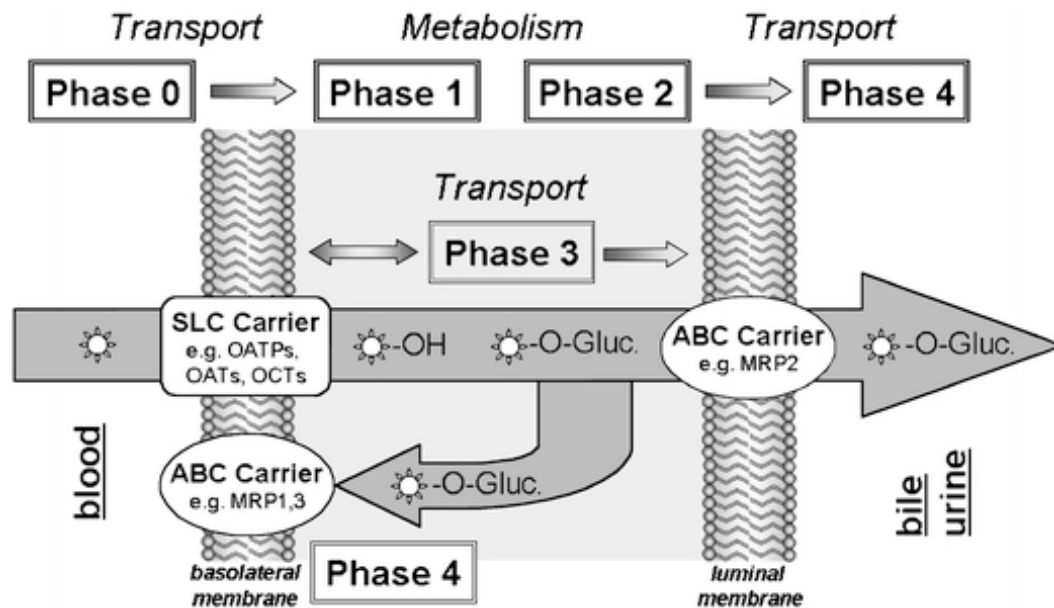


Figure 1.5 Schéma du transport de médicaments dans le foie et le rein⁵⁷. Phase 0 = capture du médicament (hors du sang), Phases 1 et 2 = biotransformation (par exemple hydroxylation et glucuronidation), Phase 3 = transport de métabolites/xénobiotiques vers l'excrétion, Phase 4 = efflux dans les fluides excrétés et/ou dans le sang. ☼ xénobiotique

1.3 La pharmacocinétique en présence d'une insuffisance rénale chronique

L'IRC peut significativement altérer la pharmacocinétique des médicaments en réduisant la clairance systémique des molécules éliminées par la voie rénale, et en affectant la liaison aux protéines plasmatiques et aux tissus⁵⁵. De plus en plus d'études montrent que l'IRC affecte non seulement la clairance rénale, mais également la clairance non rénale des médicaments largement métabolisés par le foie^{53-55, 59, 60}.

1.3.1 Modulation de l'absorption

Tout d'abord, le profil d'absorption et la biodisponibilité des médicaments peuvent être modifiés par l'IRC, dû à des changements pathophysiologiques du tractus gastro-intestinal. En effet, la vidange gastrique est ralentie, ce qui entraîne une augmentation du temps requis pour atteindre la concentration plasmatique maximale⁶¹. Quant à la biodisponibilité, elle peut être diminuée par une élévation du pH gastrique. Les niveaux élevés d'urée peuvent résulter en la conversion de cette dernière en ammoniac par l'uréase gastrique. L'augmentation de pH conséquente peut alors modifier les propriétés de dissolution ou d'ionisation de certains médicaments, conduisant à l'altération de leur biodisponibilité⁶².

1.3.2 Modulation de la distribution

Les principaux déterminants du Vd, soit la liaison aux protéines plasmatiques et la liaison tissulaire sont susceptibles d'être modifiés par l'IRC. En effet, on observe une diminution de la liaison de nombreux médicaments acides aux protéines plasmatiques⁶³. On attribue ce phénomène à des changements de conformation dans la structure de l'albumine qui entraîneraient une réduction de l'affinité de liaison de la protéine envers les médicaments^{64, 65}. L'accumulation d'inhibiteurs compétitifs endogènes identifiés comme *toxines urémiques* est une autre explication⁶⁶. Ikeda *et al.* ont démontré que le sulfate

d'indoxyle (IS), une toxine urémique, produisait une inhibition compétitive sur la liaison du furosémide à l'albumine sérique bovine⁶⁷. En ce qui concerne la liaison des médicaments basiques, malgré l'élévation des niveaux d'AGP en présence d'une IRC, elle ne semble pas affectée par la maladie^{61, 63}. La liaison tissulaire est aussi généralement non altérée par l'IRC, à l'exception de la digoxine⁶¹. Effectivement, une étude a montré que le Vd de la digoxine était diminué de 50% par l'IRT, dû à une liaison tissulaire réduite⁶⁸.

1.3.3 Modulation de l'élimination

1.3.3.1 Clairance rénale

Tel que mentionné plus haut, les répercussions de l'IRC sur la clairance rénale sont liées à une diminution du débit de filtration glomérulaire et une diminution de la sécrétion tubulaire. Sans adaptation de la dose, l'élimination réduite conduit à un allongement de la demi-vie et à une augmentation de la concentration plasmatique des médicaments et des métabolites éliminés par le rein. Un ajustement des doses est donc effectué d'après la prémisse selon laquelle la clairance rénale est proportionnelle à la clairance de la créatinine^{54, 59}.

1.3.3.2 Clairance non rénale

Actuellement, la dose des médicaments métabolisés exclusivement au niveau hépatique est peu ajustée. Toutefois, l'élimination de ces médicaments est autant affectée par l'IRC, ce qui peut contribuer à l'apparition d'effets indésirables. En fait, diverses études humaines et animales, dont les études réalisées par notre laboratoire, ont démontré qu'en présence d'IRC, la CL_{NR} des xénobiotiques était modifiée par les effets combinés sur les CYP450, les enzymes de phase II et les transporteurs^{54, 69-72}.

1.3.3.2.1 Inhibition du cytochrome P450

En premier lieu, dans un modèle de rats atteints d'IRC, l'expression protéique des CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2 hépatiques était diminuée de plus de 40 %, suite à la

diminution d'expression de l'ARNm codant ces isoformes. La régulation à la baisse était donc due à une réduction de la transcription des gènes⁶⁹. Les CYP1A1 et CYP3A étaient également régulés à la baisse dans l'intestin⁷³. Une étude *in vivo* chez les rats utilisant des substrats spécifiques radiomarqués a démontré par test d'exhalation que le CYP2C11 et le CYP3A2 présentaient une activité métabolique diminuée de 35%⁷⁴. Ces résultats corrélaient avec l'expression protéique. Au niveau clinique, chez les patients souffrant d'IRT, des réductions de la CL_{NR} de 30 à 90% ont été observées pour plusieurs médicaments métabolisés principalement par les CYP450⁵⁹. Ces effets se manifestent par une augmentation de la biodisponibilité. Par exemple, pour le propranolol, la biodisponibilité augmente par un facteur trois avec la progression de l'IRC, par contre, ce phénomène est renversé par la dialyse⁷⁵. Par ailleurs, une diminution d'activité du CYP3A pourrait réduire le métabolisme de premier passage intestinal et conduire à une élévation de la biodisponibilité des médicaments⁵⁴.

1.3.3.2.2 Inhibition des enzymes de phase II

Les principales réactions de conjugaison impliquées dans le métabolisme hépatique, soit la glucuronidation et l'acétylation, sont également réduites en présence d'IRC. En effet, la glucuronidation de la zidovudine et de la morphine sont atteintes, tel que reflété par l'augmentation de la surface sous la courbe chez les patients souffrant d'IRC^{76, 77}. Une étude récente chez des rats urémiques a révélé une diminution d'expression protéique des isoenzymes NAT1 et NAT2, responsables de l'acétylation. L'activité enzymatique de la NAT2 a également diminué de 50%⁷¹. Ces données appuient les travaux de Kim *et al.*, qui montrent une réduction de CL_{NR} de 50% chez les patients atteints d'IRC portant le phénotype « acétyleur rapide »⁷⁸.

1.3.3.2.3 Régulation des transporteurs d'efflux et d'influx

En plus de la diminution de l'activité métabolique enzymatique occasionnée par l'IRC, d'autres mécanismes, tels que des altérations des systèmes de transport, contribuent à la réduction de la CL_{NR} ⁵⁵.

À priori, suite à l'ingestion d'un médicament, les transporteurs situés au niveau intestinal peuvent moduler son absorption. Chez les rats urémiques, l'activité de la Pgp et du MRP2 sont réduites^{72, 79}. Puisqu'il s'agit de transporteurs d'efflux, c'est-à-dire qu'ils rejettent les molécules dans le tractus gastro-intestinal, leur inhibition peut entraîner une biodisponibilité plus élevée⁵⁹. Un transporteur d'influx, l'Oatp2, demeure inchangé chez les rats atteints d'IRC⁷².

Les transporteurs rénaux jouent un rôle considérable dans l'excrétion rénale des xénobiotiques. Avec le développement de l'IRC, le transport actif d'ions organiques du sang à la cellule rénale est fortement inhibé, tel qu'illustré par l'accumulation plasmatique de toxines urémiques (sulfate d'indoxyle (IS), acide carboxy-méthyl-propyl-furanpropionique (CMPF), l'acide 5-dihydroxy-indole acétique (IA) et acide hippurique (HA))⁵⁵. Des études montrent qu'une diminution de l'expression des transporteurs d'influx Oat1 et Oct2 est également observée chez des rats néphrectomisés^{80, 81}. En ce qui concerne les transporteurs d'efflux, situés sur la membrane apicale du tubule proximal, l'expression protéique de la Pgp demeure inchangée par l'IRC chez le rat, cependant l'expression du Mrp2 est augmentée⁸². Cela pourrait constituer une réponse adaptative afin de protéger l'organisme contre l'accumulation de toxines, en favorisant leur élimination⁵⁵.

Enfin, l'IRC peut affecter l'extraction hépatique de certains médicaments. Des études réalisées chez le rat rapportent une diminution d'expression protéique des transporteurs d'influx Oatp1, Oatp2 et Oatp4^{70, 83}. Cette régulation à la baisse pourrait être à l'origine de la diminution de la clairance de la cérivastatine observée par Vormfelde *et al*⁸⁴. Cette molécule est généralement transportée du sang vers le foie par les OATPs, par conséquent, une diminution d'expression de ces transporteurs entraînerait l'accumulation plasmatique du médicament. Les pompes d'efflux situées sur la membrane baso-latérale ou canaliculaire des hépatocytes permettent le retour des médicaments et leurs métabolites dans la circulation sanguine, ou leur élimination dans la bile. Ainsi, le transport d'une molécule sera déterminé par son affinité avec la Pgp ou avec la variété de transporteurs

MRPs. Selon une étude de Naud et al., des rats urémiques présentent une activité Pgp augmentée de 45%, ce qui favoriserait l'excrétion dans la bile⁷⁰.

1.4 Hormone parathyroïdienne et métabolisme hépatique

Malgré la multitude de travaux démontrant les altérations de la CL_{NR} par l'IRC, les mécanismes sous-jacents demeurent imprécis. Diverses hypothèses ont toutefois été émises quant aux facteurs régulant le métabolisme hépatique.

Actuellement, la diminution de l'expression des enzymes du CYP450 en présence d'IRC s'explique majoritairement par une accumulation de substances inhibitrices endogènes modulant leur expression. Tel que démontré précédemment, des hépatocytes de rats normaux incubés avec du sérum de rats urémiques présentent une expression réduite de plusieurs isoformes du CYP450⁸⁵. Or, quels facteurs présents dans le sérum influencent ces enzymes? Notre laboratoire s'est intéressé à la question.

D'une part, nous avons déterminé à l'aide de fractionnements de sérum que les médiateurs urémiques modulant le CYP3A2 chez le rat avaient un poids moléculaire variant entre 10 et 30 kDa⁸⁵. D'autre part, il a été suggéré par *Klin et al.* que l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} dans les hépatocytes en présence d'IRC était due à un excès de PTH⁸⁶ associé au fait que l'IRC s'accompagne fréquemment d'une hyperparathyroïdie secondaire. Puisque l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules est associée à une inhibition de la synthèse d'ARNm de certaines protéines comme la lipase hépatique, il est possible que d'autres protéines hépatiques puissent être affectées de façon similaire⁸⁷. La PTH possède un poids moléculaire d'environ 10 kDa (9500 Da)⁸⁸, ce qui correspond à la fraction de sérum 10-30 kDa. De ce fait, nous avons étudié l'implication de la PTH dans la régulation du CYP450 à l'aide d'un modèle de rats parathyroïdectomisés atteints d'IRC⁸⁹.

Les résultats ont démontré que la PTH jouait effectivement un rôle majeur dans la diminution de l'expression des enzymes du CYP450⁸⁹. Le même modèle a été utilisé afin de déterminer si la PTH exerçait un effet similaire sur l'enzyme NAT2. Les résultats ont également identifié la PTH comme un médiateur important à la baisse d'expression de la

NAT2⁷¹. Or, le mécanisme d'action de la PTH dans chaque cas reste à préciser. Par ailleurs, le modèle de parathyroïdectomie n'est pas optimal. En effet, la réalisation de cette procédure étant très délicate chez le rat, il est possible que l'extirpation des glandes parathyroïdes ne soit pas complète et qu'il persiste un peu de PTH circulante malgré l'intervention. Il devient alors difficile d'évaluer correctement l'effet de l'absence de PTH, d'où la nécessité d'employer un modèle qui permet la suppression totale de la PTH. La méthode idéale à envisager consiste donc en la délétion du gène codant pour cette hormone. Toutefois, ce type de manipulation génétique se réalise plus aisément chez la souris.

1.5 Hypothèse et objectifs

Le modèle expérimental d'IRC ayant précédemment été privilégié au laboratoire est la néphrectomie 5/6 chez le rat. Cependant, tel que mentionné ci-dessus, ce modèle possède des limitations. En effet, l'étude des mécanismes d'action peut être facilitée par la délétion de gènes, qui s'exécute davantage chez la souris. Ainsi, afin de confirmer le rôle de la PTH dans la diminution des enzymes du CYP450, nous avons utilisé un modèle murin transgénique. Les travaux ont été effectués en deux temps.

Premièrement, à l'aide de souris C57BL/6 de type sauvage, nous devions induire l'IRC et confirmer la diminution des enzymes du CYP450 et des enzymes de phase II observées auparavant chez le rat. Nous avons donc adapté le modèle de néphrectomie 5/6 à la souris, en pratiquant une néphrectomie 3/4. L'expression protéique et génique des Cyp1a2, Cyp2c29, Cyp2d, Cyp2e1 et Cyp3a11, soit des isoformes principalement impliquées dans le métabolisme des médicaments, ont été étudiées. De même, l'activité enzymatique du Cyp3a a été analysée. Enfin, l'expression de l'enzyme Nat2 a également été mesurée. Ces résultats sont présentés sous forme d'article.

Par la suite, afin de déterminer le rôle de la PTH dans la diminution des enzymes du CYP450, nous avons utilisé des souris mutantes pour le gène codant la PTH. Si cette hormone est effectivement responsable de la réduction d'expression, chez une souris dépourvue de PTH, l'effet devrait être prévenu. Ainsi, nous devions d'abord caractériser le

modèle transgénique, puis induire une IRC aux souris. L'expression protéique et génique des isoformes Cyp1a2, Cyp2c29 et Cyp3a11 ont été analysées. Ces résultats sont présentés à la suite de l'article et feront peut-être l'objet d'une autre publication.

2. Résultats

2.1 Article

Downregulation of liver drug metabolizing enzymes in a murine model of chronic renal failure

Mélina Dani^{1,2}, Caroline Boisvert^{1,2}, Josée Michaud^{1,2}, Judith Naud^{1,2}, Stéphane Lefrançois¹, Francois A. Leblond¹ and Vincent Pichette^{1,2}.

¹Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada H1T 2H4.

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

Footnotes: This work was supported by the Canadian Institute of Health Research and Fonds de la recherche en Santé du Québec (FRSQ). Vincent Pichette is scholar of the FRSQ and Mélina Dani, Josée Michaud and Judith Naud are fellows of the FRSQ. This work was presented in part at the American Society of Nephrology, Renal Week in 2009, and at the IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics in 2008.

a) **Running title:** Drug metabolizing enzymes in renal failure

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

c)

Number of text pages: 15

Number of tables: 0

Number of figures: 3

Number of references: 27

Number of words (*Abstract*): 249

Number of words (*Introduction*):

Number of words (*Discussion*):

ABSTRACT

Drug metabolism could be altered in patients with chronic renal failure (CRF). In rat, this phenomenon is secondary to a decrease in liver cytochrome P450 (CYP450) and phase II enzymes, particularly N-acetyltransferase 2 (NAT2). This study attempted to determine the effects of CRF on liver CYP450 isoforms and NAT2 expressions using a CRF mouse model. Two groups of mice were studied: CRF induced by 3/4 nephrectomy and control. Liver protein expression and mRNA levels of the major CYP450 isoforms involved in drug metabolism (Cyp1a2, 2c29, 2d, 2e1 and 3a11) and Nat2 were measured by Western blot and real-time PCR, respectively. Cyp3a activity was also assessed by the N-demethylation of erythromycin. Results showed a significant reduction in the protein expression of Cyp1a2 (55%), 2c29 (30%), and 3a11 (40%) in CRF mice compared with control animals. There was no significant modification in protein expression of Cyp2d and 2e1. Furthermore, real-time PCR revealed a marked reduction in mRNA levels of Cyp1a2, 2c29, and 3a11 (60%, 55%, 40%, respectively) in CRF mice. When compared with control animals, CRF mice displayed a 25% reduction in N-demethylation of erythromycin. As for NAT2, protein expression decreased by 30% and mRNA levels by 20%. In conclusion, this study demonstrates that protein expression of liver Cyp1a2, Cyp2c29 and Cyp3a11 are downregulated in CRF mice, secondary to reduced gene expression. Phase II enzymes are similarly affected by CRF. Our results support the use of knockout mice to determine the mechanisms underlying CRF-induced down-regulation of liver drug metabolizing enzymes.

INTRODUCTION

Patients with chronic renal failure (CRF), in addition to a decrease in the urinary excretion of drugs, they also show a reduction in the metabolic clearance, particularly of drugs metabolized by the enzymes of the cytochrome P450 (CYP450) (Dreisbach et al., 2008; Nolin et al., 2008; Sun and Benet, 2006; Dreisbach and Lertora, 2003)^{59, 90}. Although the precise isoforms downregulated in humans are still unknown, animal studies have shown that CRF induced a downregulation of several CYP450 isoforms in the liver: CYP3A1, 3A2, and 2C11. The mechanism underlying this decrease in CYP450 protein expression appears to be related to reduced gene expression (Leblond et al., 2000; Leblond et al., 2001; Nolin et al., 2008). Phase II enzymes, namely N-acetyltransferases (NATs), are equally down-regulated in the presence of CRF due to a decrease in gene expression (Simard et al., 2008).

The knowledge of which drug metabolizing enzyme is reduced by CRF is critical in order to predict which drugs are at risk of accumulation. Since all animal studies have been conducted in rats, the results may not necessarily be applicable to other species. Thus, there may be species-specific differences in CRF modulation of liver CYP450 and NATs. Moreover, there are no reports on the effects of CRF on drug metabolizing enzymes in the mouse, which is an ideal model to directly evaluate the role of different factors due to the availability of knockout mice.

In the present study, the effects of CRF on protein expression, gene expression, and activity of the major liver CYP450 isoforms involved in drug metabolism were investigated in a CRF mouse model. Similarly, the protein and gene expression of NAT2 were also investigated using this model. Renal failure was induced following a 3/4 nephrectomy, an adaptation of the 5/6 nephrectomy used on rats⁹¹.

METHODS

Experimental Model

Male C57BL/6 mice (Charles River, Hollister, CA), weighing 20-25 g were housed in the Research Centre animal care facility and maintained on a Teklad diet (Harlan Laboratories Inc., Montreal, Québec, Canada) and water *ad libitum*. An acclimatization period of at least 7 days was provided to the animals before any experimental work was undertaken. All of the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals. Studies were performed using two groups of mice: CRF (n=12) and control (n=12). Chronic renal failure was induced by two-stage three-quarters nephrectomy. To do so, we adapted the 5/6 nephrectomy model (Leblond et al., 2001; Leblond et al., 2002) commonly used for the rat with slight modifications. Briefly, a lumbar incision was made and two-quarters of the left kidney were removed with a scalpel on day 1. A second lumbar incision was made on the opposite side on day 15 and a right total nephrectomy was performed. After surgery, CRF animals were fed mouse chow and water *ad libitum*. Mice from the control group underwent two sham laparotomies (day 1 and 15). Body weight was measured every other day for the length of the study. Control mice were pair-fed the same amount of mouse chow that was ingested by the CRF mice on the previous day. On day 49, five weeks after the total nephrectomy, mice were sacrificed by decapitation. Sera were stored at -80°C for the measurement of serum creatinine and urea.

Preparation of Liver Microsomes and Cytosols

Mouse livers were immediately excised after death, and microsomes isolated by differential centrifugation (Tindberg et al., 1996) as previously described (Leblond et al., 2001). The pellets containing the microsomes were stored at -80°C in 0.1 M Tris (pH 7.4), 20% glycerol, 10 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA) until analysis. Microsomal protein content was measured using micro BCA Protein Assay⁹², using bovine serum albumin as standard protein (Pierce, Rockford, IL). Cytosolic proteins were dosed using the Bradford method (Coomassie Plus Protein Assay Reagent), with bovine serum albumin as standard (Pierce).

Western Blot Analysis

Protein expression of the major drug metabolising enzymes was analyzed by Western Blot. Mouse Cyp1a2, Cyp2c29 and Cyp2e1 were detected using polyclonal goat anti-rat 1A1, 2C11 and 2E1 (Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd., Japan), respectively. Cyp2d was detected using a rabbit anti-human 2D (Oxford Biochemical Research Inc., Oxford, MI), Cyp3a11 was detected using a polyclonal goat anti-mouse 3A (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) and Nat2 was detected using specific polyclonal rabbit anti-rat NAT2 as described previously (Stanley et al., 1996; Simard et al., 2008). β -Actin was detected using a mouse anti-chicken β -actin (Neo-Markers, Fremont, CA). Immune complexes were revealed by corresponding secondary antibodies: swine anti-goat IgG (Biosource International, Cammarillo, CA), donkey anti-goat IgG (US Biological, Swampscott, MA), goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) coupled to peroxidase and the

Luminol derivative of Lumi-Light Western blotting substrate (Roche Diagnostics, Laval, Quebec, Canada). Immune reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry on a LAS-3000 LCD camera coupled to the analysis program MultiGauge Fuji (Stanford, CT).

mRNA Isolation and Real-Time PCR Analysis

Liver RNA extractions were done using the RNeasy Midi and Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). One μg of total RNA was used to synthesize cDNA by reverse transcription using Omniscript RT kit (Qiagen) and random primers (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Multiplex quantitative PCR analysis was performed using FAM[™] dye-labeled probes for mouse *Cyp1a2*, *Cyp2c29*, *Cyp3a11* and *Nat2* as well as a Yakima Yellow[®] dye-labeled probe for mouse glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*). Experiments were conducted on the iCycler Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) using Bio-Rad's IQ Multiplex Powermix. Specific primers for *Cyp3a11* and *Gapdh* were previously published (Richardson and Morgan, 2005; Mikula et al., 2005). Specific probes were designed according to published cDNA sequences using the Jellyfish computer program (LabVelocity Inc., Los Angeles, CA). As for *Cyp1a2*, *Cyp2c29* and *Nat2*, the primer-probe sets used were pre-designed TaqMan[®] Gene Expression Assays obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA). PCR conditions were optimized to 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec. Resulting data were processed by the delta C_t method (Livak and Schmittgen, 2001).

***In Vitro* Metabolism of Erythromycin**

In order to evaluate the metabolic activity of CYP3A in liver microsomes, erythromycin N-demethylation was determined as described elsewhere (Wang et al., 1997; Guevin et al., 2002; Michaud et al., 2005). Briefly, 1 mM erythromycin (Sigma-Aldrich Corp.) was incubated with 1.5 mg of mouse liver microsomal proteins (either from control or CRF) at 37°C for 30 min in the presence of an NADPH-generating system consisting of the following: 20 mM glucose 6-phosphate, 2 mM NADP, and 0.14 units/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich Corp.) in a total volume of 0.5 mL. Resulting production of formaldehyde was measured by the NASH reaction and read on spectrophotometer at 405 nm.

Blood Chemistries and Statistical Analysis

Blood chemistries (urea, creatinine) were determined with an Architect C1600 clinical analyser (Abbott, Saint-Laurent, Quebec, Canada). The results are expressed as mean \pm SEM. Differences between groups were assessed using an unpaired *t* test. The threshold of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Biochemical Parameters and Body Weight in Control and CRF Mice

When compared with control animals, CRF mice had higher levels of plasma creatinine (93.1 ± 7.6 compared to 56.7 ± 1.5 $\mu\text{mol /L}$, $p < 0.01$) and blood urea nitrogen (BUN) (97.6 ± 6.3 compared to 28.3 ± 1.2 mg/dL , $p < 0.01$). There was no significant difference in body weight between control and CRF mice (27.1 ± 1.4 vs 23.6 ± 0.8 g).

Protein Expression of Liver Cytochrome P450 Isoforms in Control and CRF Mice

The level of protein expression of Cyp1a2, 2c29 and 3a11 in CRF mice ($n=8$) were reduced by 55% ($p < 0.05$), 30% ($p < 0.05$), and 40% ($p < 0.01$), respectively, in comparison with control animals (**Figure 1**). On the other hand, the levels of Cyp2d and 2e1 were not modified in CRF mice in comparison with control animals.

mRNA Encoding Liver Cytochrome P450 Isoforms in Control and CRF Mice

In order to evaluate whether cytochrome P450 isoforms in the presence of CRF were down-regulated due to a decrease in their synthesis or an increase in their degradation, mRNA encoding the different isoforms were evaluated by real-time PCR. A significant decrease in mRNA levels of Cyp1a2 (60%, $p < 0.01$), 2c29 (55%, $p < 0.01$) and 3a11 (40%, $p < 0.01$) isoforms was observed in mice with CRF ($n=12$) when compared to control mice (**Figure 2**). Thus, this decrease in mRNA encoding for P450 isoforms could explain the decrease in their protein expression.

***In Vitro* Metabolism of Erythromycin**

The *in vitro* N-demethylation of erythromycin was assessed in liver microsomes to determine the repercussion of cytochrome CYP450 reduction in the presence of CRF on the metabolism of drugs. The Cyp3a family primarily mediates this enzymatic reaction. The N-demethylation of erythromycin was reduced by 25% ($p < 0.05$) in mice with CRF ($n=8$) when compared to control animals (1.3 ± 0.1 vs 1.7 ± 0.1 nmol mg^{-1} of microsomal protein min^{-1} , $p < 0.01$).

Protein and mRNA expression of NAT2 in Control and CRF mice

Nat2 protein expression was decreased by 30% in mice with CRF ($n=8$) compared with control animals ($p < 0.05$; **Figure 3**). To evaluate whether the downregulation of Nat2 in the liver of CRF mice was related to a decrease in protein synthesis, we evaluated mRNA levels by multiplex quantitative PCR. A 20% decrease in mRNA encoding Nat2 was revealed in animals with CRF ($n=12$) compared with controls ($p < 0.05$; **Figure 3**). Thus, the decrease in Nat2 protein levels observed in CRF is caused by reduced gene expression.

DISCUSSION

This study demonstrates that, in the mouse, CRF is associated with an important reduction of selected liver CYP450 isoforms (Cyp1a2, 2c29 and 3a11) secondary to reduced gene expression. The repercussions on drug metabolism are significant since we observed a 25% reduction of erythromycin biotransformation by the Cyp3a family. Moreover, diminished protein and mRNA levels of Nat2 suggest that, in addition to CYP450, specific phase II enzymes are also altered in the presence of CRF.

Although several reports have demonstrated a decrease of liver CYP450 in the presence of CRF, very few have focussed on which specific isoforms were affected by the disease. Past studies have shown that uremic rats have reduced CYP2C11, 3A1 and 3A2 (Leblond et al., 2000; Leblond et al., 2001; Nolin et al., 2008). Similarly, the present study has illustrated decreased Cyp2c29 and 3a11 in mice with CRF, confirming the results obtained in rats. It is interesting to note that these two aforementioned isoforms are responsible for the metabolism of many drugs and could thus explain the reduction in the metabolic clearance of drugs described in patients with CRF (Dreisbach et al., 2008; Sun and Benet, 2006; Nolin et al., 2008; Nolin, 2008). Indeed, some of these drugs, such as warfarin and erythromycin, are less metabolized in patients with renal failure in comparison with controls (Dowling et al., 2003; Dreisbach et al., 2003; Nolin et al., 2006). This probably reflects a decrease in CYP2C and 3A in patients, as shown in CRF animals. However, we also observed a reduction of Cyp1a2 in mice with CRF, something that was not found in rats. This may be attributed to species-specific differences in regulation of CYP450 isoforms (Martignoni et al., 2006).

Phase II enzymes, especially NATs, metabolize several commonly used drugs in patients with CRF. Previous studies have shown that CRF was associated with a decrease in acetylation of drugs, implying that phase II enzymes could also be modified in CRF (du Souich and Erill, 1978; Kim et al., 1993). The results of the present study clearly support this hypothesis since we found a decrease in *Nat2* expression in animals with CRF. Yet, the mechanism underlying CYP450 and NAT2 down-regulation in the presence of CRF remains unclear. This study confirms nonetheless the correlation between reduced protein expression and mRNA, suggesting that CRF inhibits *Cyp450* and *Nat2* gene expression in the liver.

Very few CRF studies using a murine model have been published. Therefore, no specific procedure to induce CRF has been generally adopted. The possible techniques are diverse: bilateral electrocauterization of the renal cortex (Gagnon and Duguid, 1983)⁹³, unilateral cauterization of the right renal cortex followed by a contralateral nephrectomy (Gagnon and Ansari, 1990), or unilateral nephrectomy and partial infarction of the remnant kidney (Kren and Hostetter, 1999)⁹⁴. When choosing a CRF model, one must consider its simplicity, reproducibility, and similarity to the human pathology. Since the previous models do not reflect the most observed cases of CRF in humans, we induced CRF by 3/4 nephrectomy. This was an adaptation of the 5/6 nephrectomy model, most commonly used in the rat. We clearly demonstrated the efficacy and reproducibility of this model to induce CRF.

In conclusion, this study demonstrates that protein expressions of liver Cyp1a2, 2c29 and 3a11 are down-regulated in mice with CRF, along with Nat2. These effects are all secondary to reduced gene expression. These results support the use of knockout mice to characterize the mechanism underlying CRF-induced inhibition of hepatic metabolism.

REFERENCES

- Dowling TC, Briglia AE, Fink JC, Hanes DS, Light PD, Stackiewicz L, Karyekar CS, Eddington ND, Weir MR and Henrich WL (2003) Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* **73**:427-434.
- Dreisbach AW and Lertora JJ (2003) The effect of chronic renal failure on hepatic drug metabolism and drug disposition. *Semin Dial* **16**:45-50.
- Dreisbach AW, Japa S, Gebrekal AB, Mowry SE, Lertora JJ, Kamath BL and Rettie AE (2003) Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* **73**:475-477.
- Dreisbach AW, Lertora JJ, Dreisbach AW and Lertora JLL (2008) The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**:1065-1074.
- du Souich P and Erill S (1978) Metabolism of procainamide in patients with chronic heart failure, chronic respiratory failure and chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* **14**:21-27.
- Gagnon RF and Duguid WP (1983) A reproducible model for chronic renal failure in the mouse. *Urol Res* **11**:11-14.
- Gagnon RF and Ansari M (1990) Development and progression of uremic changes in the mouse with surgically induced renal failure. *Nephron* **54**:70-76.
- Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA and Pichette V (2002) Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* **137**:1039-1046.
- Kim YG, Shin JG, Shin SG, Jang IJ, Kim S, Lee JS, Han JS and Cha YN (1993) Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther* **54**:612-620.

Kren S and Hostetter TH (1999) The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int* **56**:333-337.

Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP and Pichette V (2000) Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos* **28**:1317-1320.

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

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

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.

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

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

Michaud J, Naud J, Chouinard J, Desy F, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A and Pichette V (2006) 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.

Mikula M, Dzwonek A, Hennig EE and Ostrowski J (2005) Increased mitochondrial gene expression during L6 cell myogenesis is accelerated by insulin. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:1815-1828.

Nolin TD, Appiah K, Kendrick SA, Le P, McMonagle E and Himmelfarb J (2006) Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity. *J Am Soc Nephrol* **17**:2363-2367. Epub 2006 Aug 2369.

Nolin TD, Naud J, Leblond FA and Pichette V (2008) Emerging evidence of the impact of kidney disease on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacol Ther* **83**:898-903. Epub 2008 Apr 2002.

Nolin TD (2008) Altered nonrenal drug clearance in ESRD. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **17**:555-559.

Richardson TA and Morgan ET (2005) Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* **314**:703-709.

Simard E, Naud J, Michaud J, Leblond FA, Bonnardeaux A, Guillemette C, Sim E and Pichette V (2008) Downregulation of hepatic acetylation of drugs in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* **19**:1352-1359. Epub 2008 Apr 1316.

Stanley LA, Coroneos E, Cuff R, Hickman D, Ward A and Sim E (1996) Immunochemical detection of arylamine N-acetyltransferase in normal and neoplastic bladder. *J Histochem Cytochem* **44**:1059-1067.

Sun H, Frassetto L and Benet LZ (2006) Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* **109**:1-11.

Tindberg N, Baldwin HA, Cross AJ and Ingelman-Sundberg M (1996) Induction of cytochrome P450 2E1 expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Mol Pharmacol* **50**:1065-1072.

Wang RW, Newton DJ, Scheri TD and Lu AY (1997) Human cytochrome P450 3A4-catalyzed testosterone 6 beta-hydroxylation and erythromycin N-demethylation. Competition during catalysis. *Drug Metab Dispos* **25**:502-507.

FIGURES

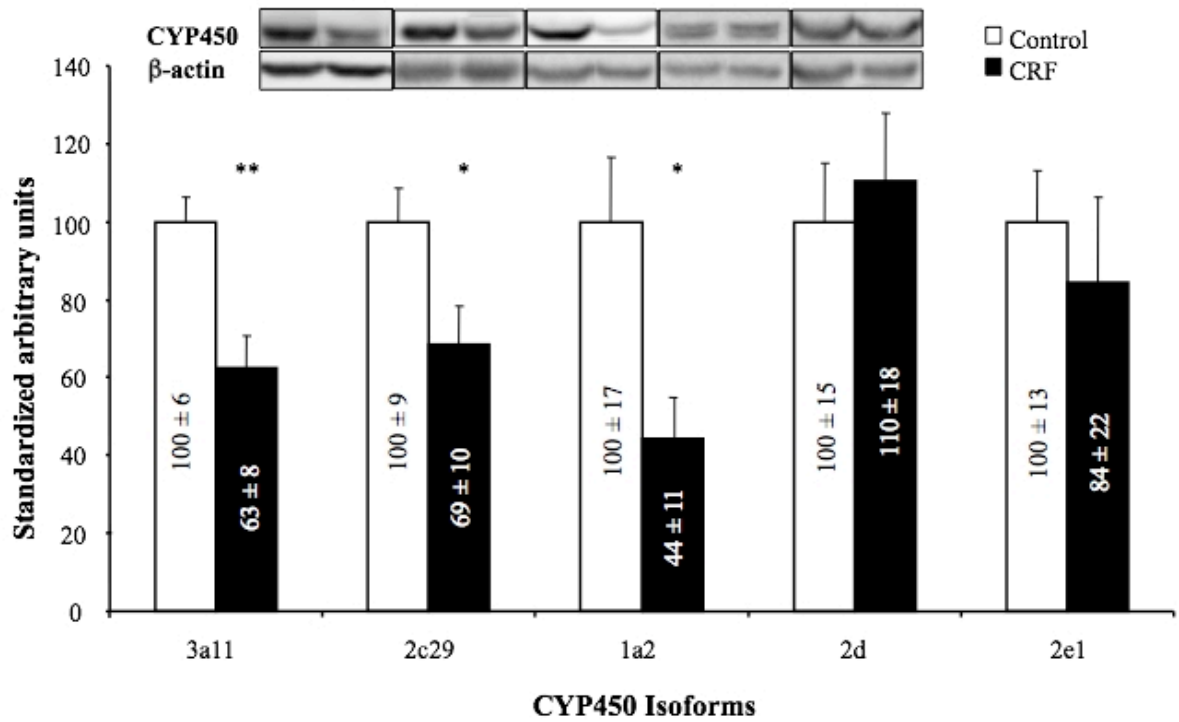


Figure 1: Protein expression of hepatic cytochrome P450 isoforms in microsomes from control and mice with CRF. Protein bands are expressed in arbitrary units (%). The densitometry values of control mice were arbitrarily defined as 100%. Data are the mean \pm SEM of eight experiments in each group. *p<0.05 when compared with control. **p<0.01 when compared with control. Representative blots are also shown.

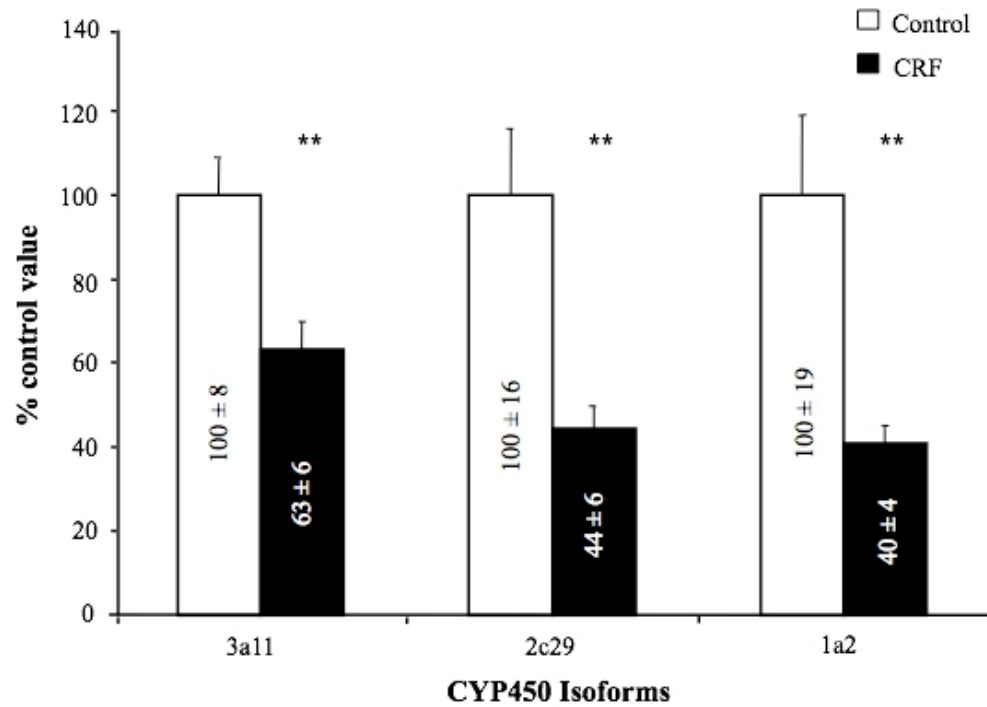


Figure 2: mRNA encoding hepatic cytochrome P450 isoforms in control and CRF mice. Control results were defined as 100%. Data are the mean \pm SEM of twelve experiments in each group. ** $p < 0.01$ versus CTL mice.

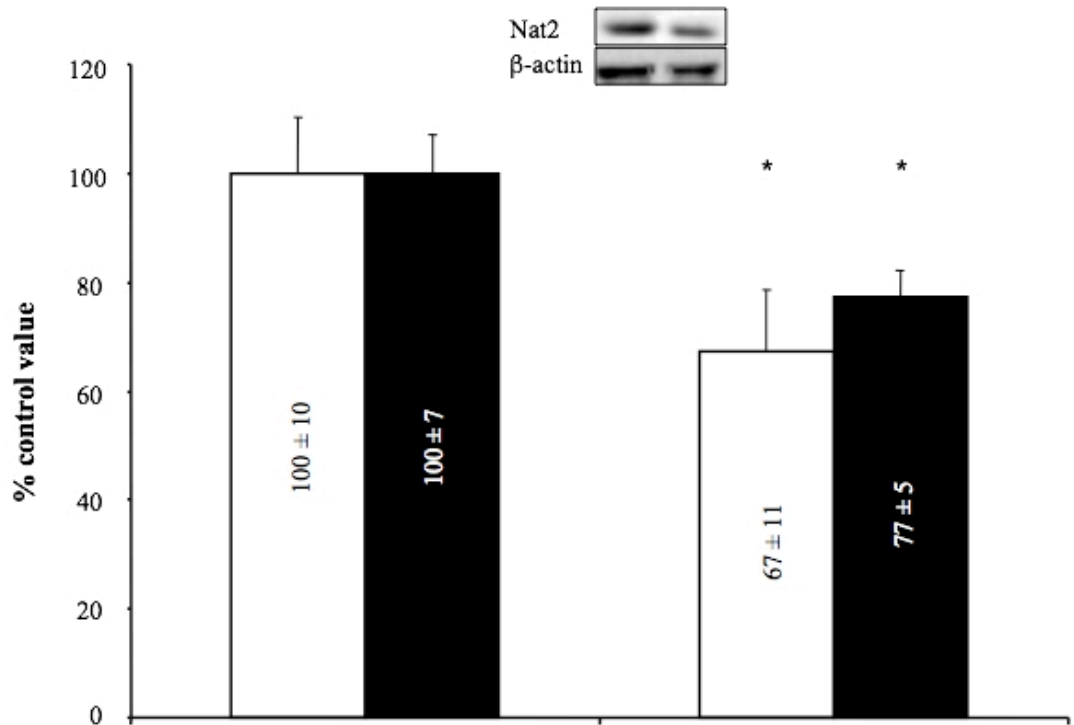


Figure 3: Expression of liver Nat2 protein (white bar) and mRNA (black bar) in control and CRF mice. Protein expression was measured by western blot in cytosols and specific mRNA was quantified by real-time PCR. Control results were defined as 100%. Data are the mean \pm SEM of eight experiments in each group for protein expression, and twelve experiments in each group for mRNA levels. * $p < 0.05$ when compared with control. Representative blots are also shown.

2.2 Étude avec le modèle murin transgénique

Les souris mutantes pour le gène codant la PTH ($PTH^{-/-}$) proviennent du Dr Goltzman du *Calcium Research Laboratory* de l'Université McGill⁹⁵. Elles ont été générées par recombinaison homologe à l'aide de cellules souches embryonnaires D3, de fond génétique 129/Sv⁹⁶. En premier lieu, le gène codant la PTH murine a été introduit dans un vecteur pPNT⁹⁷, soit un plasmide d'origine bactérienne, remplaçant ainsi l'exon 3 de la séquence codante par un gène de résistance à la néomycine (Neo^r). Le vecteur a été électroporé dans des cellules D3, puis les clones dotés d'une résistance au G418 (conférée par le gène Neo^r) ont été sélectionnés. Ces derniers ont été injectés dans des blastocystes murins de souche BALB/C, générant ainsi des chimères. Les mâles chimériques ont été accouplés à des femelles de souche C57BL/6J, puis les souris ont été reproduites jusqu'à l'obtention d'un homozygote de l'allèle PTH nul (**Figure 2.1**)⁹⁵.

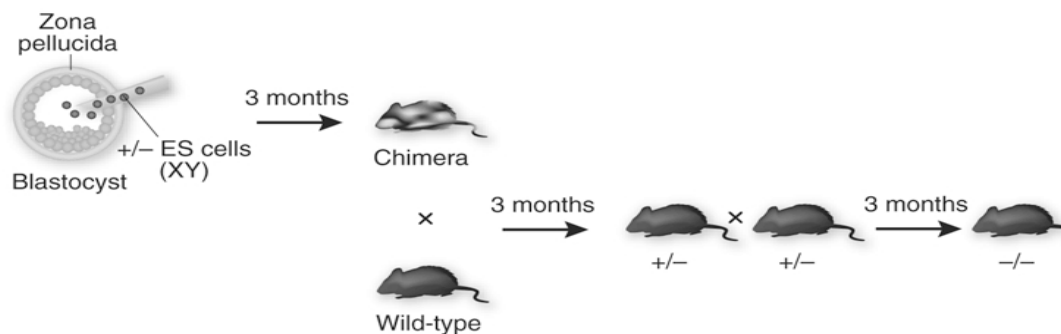


Figure 2.1 Obtention de souris transgéniques à partir de cellules souches embryonnaires⁹⁸

Afin de déterminer le génotype de chaque souris, une biopsie de la queue a été effectuée à l'âge de 3 semaines. Le tissu a été soumis à une digestion à la protéinase K (Novagen, Gibbstown, NJ) pour ensuite isoler l'ADN au phénol-chloroforme⁹⁹. Les extraits d'ADN ont été amplifiés par PCR (**Tableau IV**) puis migrés sur gel d'agarose 2% afin de déceler si les souris portaient le gène PTH et/ou le gène Neo^r . La présence du gène Neo^r reflète une incorporation du plasmide pPNT dans le génome, correspondant conséquemment au génotype $PTH^{+/-}$ ou $PTH^{-/-}$. L'absence du gène PTH confirme alors le

génotype $PTH^{-/-}$. Si le gène PTH est présent seul, la souris porte le génotype $PTH^{+/+}$ (Figure 2.2).

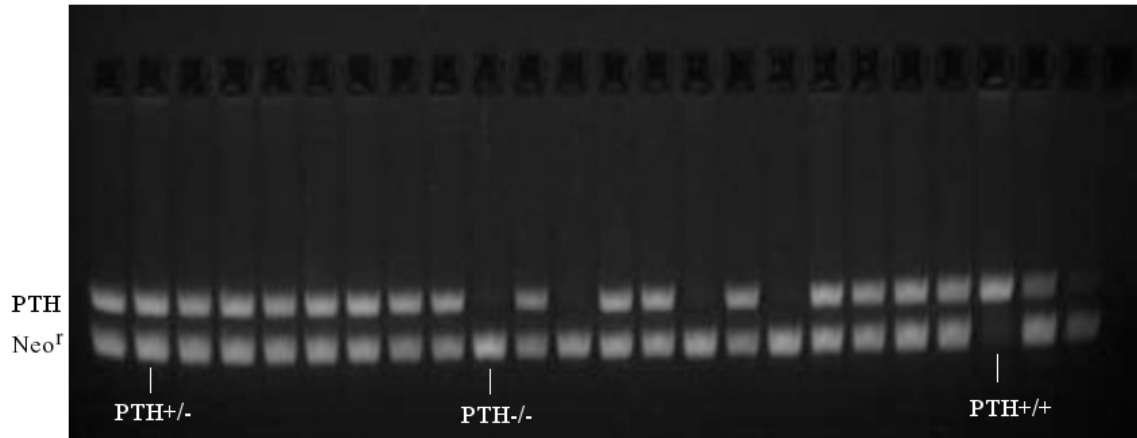


Figure 2.2 Gel d'agarose révélé à la lumière ultraviolette présentant un exemple de génotypage

Gènes	Séquence de nucléotides (5'-3')
<i>Pth</i> ^a	Amorce sens : GATGTCTGCAAACACCGTGGCTAA Amorce anti-sens : TCCAAAGTTTCATTACAGTAGAAG
<i>Neo</i> ^{r,b}	Amorce sens : CAGACAATCGGCTGCTCTGATG Amorce anti-sens : CTCGATGCGATGTTTCGCTTG

Tableau IV Séquences nucléotidiques des amorces de PCR

^a Les amorces du gène PTH proviennent de séquences publiées précédemment¹⁰⁰. ^b Les amorces du gène Neo^r proviennent de séquences publiées précédemment¹⁰¹.

2.2.1 Caractérisation du modèle

Originellement, les souris transgéniques avaient été développées dans le but d'étudier l'implication de la PTH dans la régulation de l'ostéogenèse⁹⁵. De ce fait, aucune information quant au phénotype biochimique et au phénotype des enzymes du métabolisme hépatique des souris n'était disponible. Nous avons donc procédé à une caractérisation phénotypique du modèle.

2.2.1.1 Paramètres biochimiques

Nous avons d'abord sélectionné les souris mâles portant les génotypes $PTH^{+/+}$ et $PTH^{-/-}$, et elles ont été sacrifiées par décapitation afin de recueillir le sang. Les échantillons ont été centrifugés à $600 \times g$ durant 10 minutes, puis les sérums ont été isolés. Les niveaux plasmatiques de différents marqueurs de l'IRC et de minéraux dont la concentration est régulée par la PTH ont été mesurés (**Tableau V**). Les valeurs ont été obtenues à l'aide d'un autoanalyseur Architect C1600 (Abbott, Saint-Laurent, Québec, Canada).

	Souris $PTH^{+/+}$	Souris $PTH^{-/-}$
Créatinine ($\mu\text{mol/L}$)	$61,4 \pm 4,5$	$63,9 \pm 4,1$
BUN (mg/dL)	$20,25 \pm 1,62$	$21,01 \pm 1,26$
Calcium (mmol/L)	$2,50 \pm 0,04$	$2,00^* \pm 0,05$
Phosphore (mmol/L)	$3,02 \pm 0,18$	$4,26^* \pm 0,16$

Tableau V Caractéristiques biochimiques des souris $PTH^{-/-}$. BUN, *Blood urea nitrogen*. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type. * $P < 0,001$ vs. témoins.

Les résultats ne démontrent aucune modification significative des concentrations de créatinine et de BUN chez les souris $PTH^{-/-}$ (n=11) en comparaison avec les souris $PTH^{+/+}$ (n=8). La fonction rénale n'est donc pas altérée par le génotype $PTH^{-/-}$. Cependant, les souris $PTH^{-/-}$ présentent une hypocalcémie et une hyperphosphatémie associées à l'absence de PTH.

2.2.1.2 Expression du CYP450 hépatique

Par ailleurs, afin de s'assurer de la validité du modèle expérimental, des isoformes du CYP450 hépatique impliquées dans le métabolisme des médicaments ont été étudiées. L'expression protéique (**Figure 2.3**) et génique (**Figure 2.4**) ont été évaluées par immunobuvardage de type Western, et par PCR quantitative en temps réel (qPCR), respectivement, tel que décrit précédemment¹⁰². Les résultats indiquent que les quantités de protéines et d'ARNm demeurent inchangées chez les souris *PTH*^{-/-} par rapport aux souris témoins, et ce pour le Cyp3a11 et le Cyp2c29. Conséquemment, les souris transgéniques sont un modèle adéquat pour étudier l'effet de l'IRC sur le CYP450 hépatique, puisqu'à la base, elles ne présentent aucune différence avec les témoins.

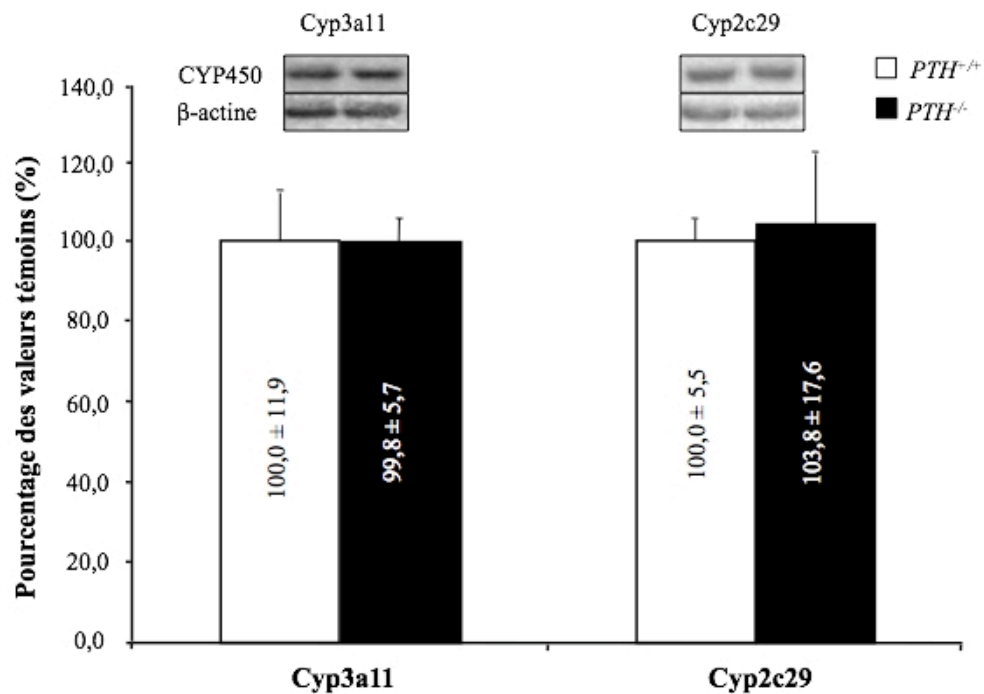


Figure 2.3 Expression protéique des isoformes du CYP450 hépatique dans les microsomes de souris *PTH*^{-/-} (n=11) et leurs témoins *PTH*^{+/+} (n=8). Les valeurs témoins ont été arbitrairement définies comme égales à 100%. Les données sont exprimées en moyenne ± erreur type. Les images des bandes correspondant aux différentes protéines sont également montrées.

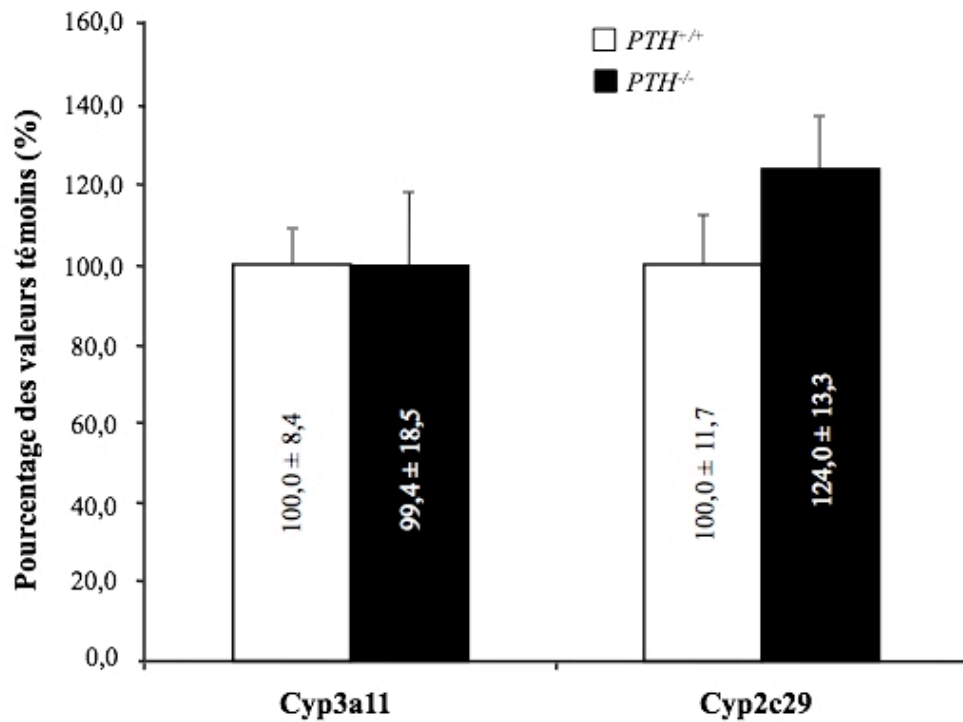


Figure 2.4 ARNm codant pour les isoformes du CYP450 hépatique chez les souris $PTH^{-/-}$ (n=7) et leurs témoins $PTH^{+/+}$ (n=8). Les valeurs témoins ont été arbitrairement définies comme égales à 100%. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type.

2.2.2 Effets de l'IRC sur les enzymes du CYP450 hépatique

Sachant que les souris transgéniques ne présentaient aucune différence avec les souris de type sauvage concernant l'expression du Cyp3a11 et du Cyp2c29 hépatiques, nous avons sélectionné les mâles $PTH^{-/-}$ et $PTH^{+/+}$ afin de leur induire une IRC chirurgicalement. Le modèle employé était la néphrectomie subtotale 3/4, tel que décrit précédemment¹⁰². Les souris témoins n'ont subi que des laparotomies blanches. Le **tableau VI** présente les paramètres biochimiques des souris cinq semaines après la chirurgie.

	Témoins <i>PTH</i> ^{+/+}	IRC <i>PTH</i> ^{+/+}	Témoins <i>PTH</i> ^{-/-}	IRC <i>PTH</i> ^{-/-}
Poids (g)	27,7 ± 0,7	25,0 ± 0,4	27,4 ± 0,9	25,0 ± 0,9
BUN (mg/dL)	26,3 ± 2,3	88,7* ± 19,3	25,8 ± 1,8	99,4** ± 12,2
Créatinine (µmol/L)	61,2 ± 5,2	102,7 ± 20,6	89,7 ± 25,1	101,1 ± 12,3
Calcium (mmol/L)	2,33 ± 0,04	2,47 ± 0,04	1,82*** ± 0,14	1,64*** ± 0,08
Phosphore (mmol/L)	3,01 ± 0,22	3,18 ± 0,21	4,67*** ± 0,23	5,08*** ± 0,56

Tableau VI Caractéristiques biochimiques des souris *PTH*^{+/+} et *PTH*^{-/-} témoins et atteintes d'IRC. BUN, *blood urea nitrogen*. Les données sont exprimées en moyenne ± erreur type (n=8 souris par groupe) et l'analyse statistique a été effectuée à l'aide d'un test d'ANOVA. **P*<0,05 vs. témoins *PTH*^{+/+}. ***P*<0,05 vs. témoins *PTH*^{-/-}. ****P*<0,05 vs. témoins *PTH*^{+/+} et IRC *PTH*^{+/+}.

Les résultats démontrent une augmentation significative des valeurs de BUN chez les souris néphrectomisées, comparativement à leurs témoins respectifs. Cela reflète une perte de fonction rénale et confirme l'efficacité du modèle chirurgical. Les valeurs de créatinine semblent également plus élevées chez les souris atteintes d'IRC, cependant l'augmentation n'est pas statistiquement significative, la créatinine n'étant pas un marqueur optimal pour évaluer le niveau d'IRC chez la souris (voir section 4.2.2.1). Quant au calcium et au phosphore, on observe une hypocalcémie et une hyperphosphatémie chez les souris *PTH*^{-/-} (témoins et atteintes d'IRC) en comparaison avec les souris *PTH*^{+/+}, tel que noté lors de la caractérisation phénotypique (**Tableau V**). Les changements apparaissent toutefois plus marqués pour les souris *PTH*^{-/-} souffrant d'IRC, puisque la pathologie engendre généralement une hypocalcémie et une hyperphosphatémie, comme il a déjà été mentionné plus haut (section 1.1.2.2).

Les effets de l'IRC sur l'expression protéique et génique du CYP450 hépatique (Cyp3a11 et 2c29) ont été évalués dans le but d'étudier l'implication de la PTH dans la diminution de l'expression des enzymes du CYP450 observée chez la souris C57BL/6. Ainsi, nous avons d'abord comparé les résultats obtenus chez les souris *PTH*^{-/-} avec ceux des souris C57BL/6. Les données présentées à la **figure 2.5** montrent les niveaux de protéines et d'ARNm de l'isoforme Cyp3a11 mesurés par immunobuvardage de type Western et par qPCR, respectivement. L'expression protéique est significativement diminuée chez les souris C57BL/6 atteintes d'IRC, en comparaison avec les souris C57BL/6 témoins. Or, chez les souris *PTH*^{-/-} avec une IRC, cette diminution semble contrecarrée. Quant à l'expression d'ARNm, elle est également réduite de façon significative chez les souris C57BL/6 souffrant d'IRC, cependant cette réduction est prévenue par l'absence de PTH. Ces résultats suggèrent que la PTH est responsable de la diminution de l'expression du Cyp3a11 hépatique chez la souris atteinte d'IRC.

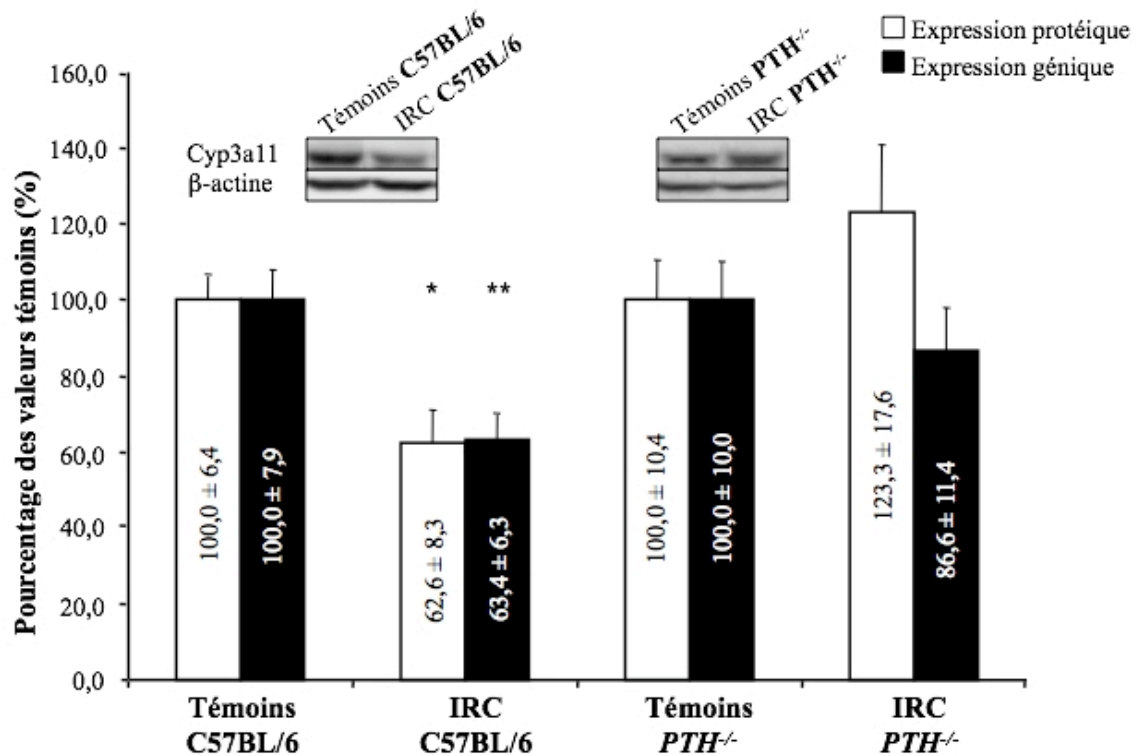


Figure 2.5 Expression protéique (□) et génique (■) du Cyp3a11 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris exprimaient (C57BL/6) ou non ($PTH^{-/-}$) le gène PTH . Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type. Les valeurs des témoins C57BL/6 (n=8) ont été définies comme égales à 100% pour les souris C57BL/6 atteintes d'IRC (n=8). Les valeurs des témoins $PTH^{-/-}$ (n=7) ont été définies comme égales à 100% pour les souris $PTH^{-/-}$ atteintes d'IRC (n=9). Les images des bandes correspondant aux différentes protéines sont également montrées. * $P < 0,05$ vs. témoins C57BL/6. ** $P < 0,005$ vs. témoins C57BL/6.

L'isoforme Cyp2c29 a également été étudiée (**Figure 2.6**). De façon similaire au Cyp3a11, les résultats révèlent une baisse marquée d'expression protéique et génique chez les souris C57BL/6 souffrant d'IRC, en comparaison avec les témoins. Cependant, comparées aux témoins, chez les souris *PTH*^{-/-} avec une IRC ni l'expression du Cyp2c29 ni celle de son gène ne sont diminuées. Ces résultats suggèrent que la PTH est également responsable de la diminution de l'expression du Cyp2c29 chez les souris avec une IRC.

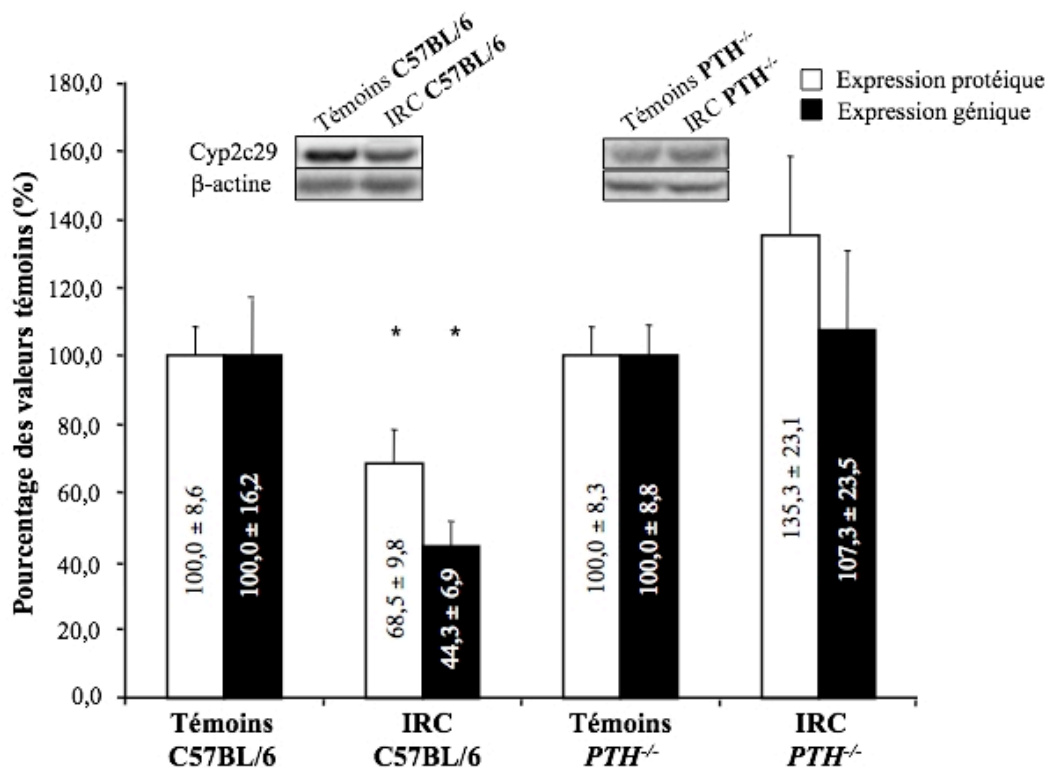


Figure 2.6 Expression protéique (□) et génique (■) du Cyp2c29 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris portaient (C57BL/6) ou non (*PTH*^{-/-}) le gène *PTH*. Les données sont exprimées en moyenne ± erreur type. Les valeurs des témoins C57BL/6 (n=8) ont été définies comme égales à 100 % pour les souris C57BL/6 atteintes d'IRC (n =8). Les valeurs des témoins *PTH*^{-/-} (n=10) ont été définies comme égales à 100% pour les souris *PTH*^{-/-} atteintes d'IRC (n=10). Les images des bandes correspondant aux différentes protéines sont également montrées. **P*<0,05 vs. témoins C57BL/6. ***P*<0,005 vs. témoins C57BL/6.

2.2.3 Difficulté à moduler les enzymes du CYP450 chez les souris *PTH*^{+/-} atteintes d'IRC

À la lumière de ces résultats, nous avons subséquemment comparé les souris *PTH*^{-/-} avec les souris correspondantes de type sauvage (*PTH*^{+/+}) afin de valider les résultats. En effet, puisque les souris *PTH*^{-/-} avaient été comparées avec des souris C57BL/6 provenant de l'élevage Charles River (Hollister, CA), il nous a paru scientifiquement impératif de les comparer également avec des souris issues de la même colonie, soit les *PTH*^{+/+}. En effet, tel que décrit dans la section 2.2, les souris *PTH*^{-/-} et *PTH*^{+/+} avaient été développées à partir de blastocytes murins de souche BALB/C, puis avaient ensuite été reproduites jusqu'à l'obtention de souris de fond génétique C57BL/6. Ainsi, nous voulions nous assurer que les souris *PTH*^{+/+} ne présentaient aucune différence avec les souris C57BL/6 provenant de chez Charles River.

La **figure 2.7** illustre l'expression protéique et génique de l'isoforme Cyp3a11 mesurées par immunobuvardage de type Western et par qPCR, respectivement. Étonnamment, le niveau de protéines est inchangé entre les souris *PTH*^{+/+} témoins (n=8) et avec une IRC (n=7). De même, l'expression d'ARNm se trouve également inchangée chez les souris *PTH*^{+/+} souffrant d'IRC (n=5) comparativement aux témoins (n=6). Ainsi, malgré les valeurs équivalentes parmi les souris *PTH*^{-/-} témoins (n=7) et atteintes d'IRC (n=9), autant pour l'expression protéique que génique, il est impossible de déterminer l'implication de la PTH dans la régulation du Cyp3a11.

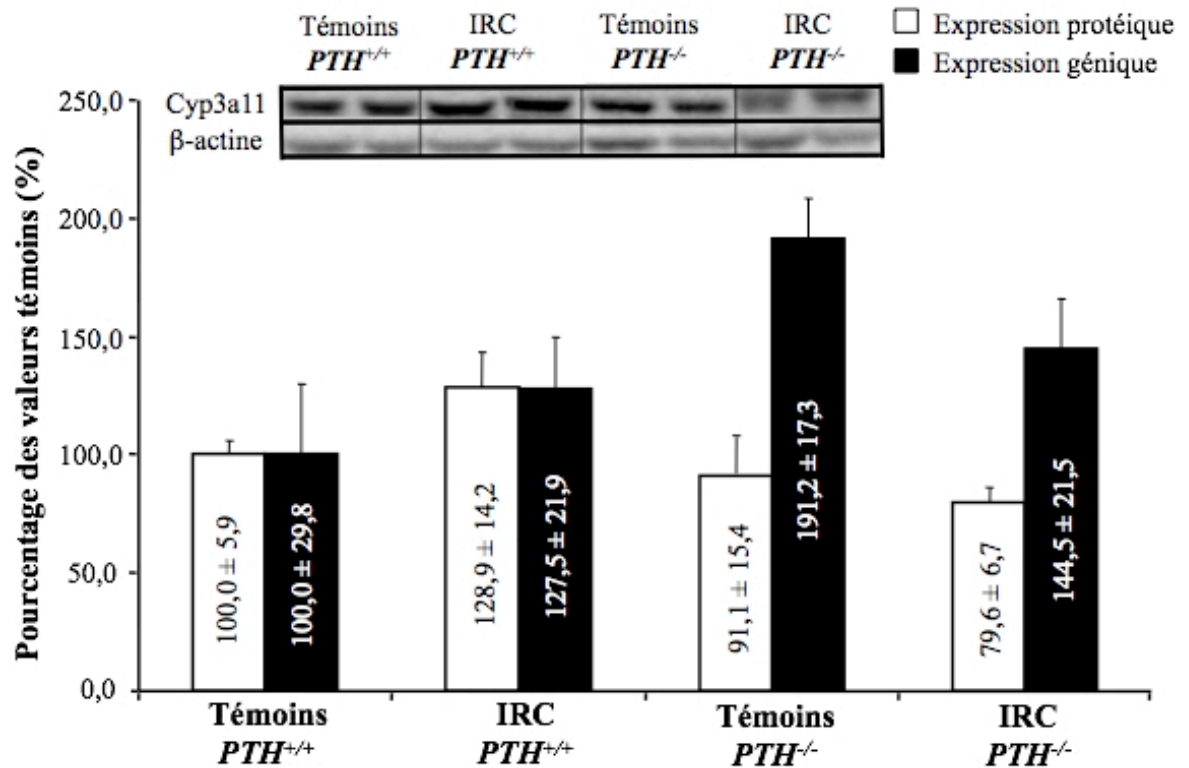


Figure 2.7 Expression protéique (□) et génique (■) du Cyp3a11 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris exprimaient ($PTH^{+/+}$) ou non ($PTH^{-/-}$) le gène *PTH*. Les données sont exprimées en moyenne \pm erreur type et l'analyse statistique a été effectuée avec le test d'ANOVA. Les valeurs des témoins $PTH^{+/+}$ ont arbitrairement été définies comme égales à 100%. Les images des bandes correspondant aux différentes protéines sont également montrées.

En ce qui concerne l'isoforme Cyp2c29, sa régulation semble similaire au Cyp3a11. En effet, d'après la **figure 2.8**, son expression protéique demeure inchangée chez les souris $PTH^{+/+}$ avec IRC (n=8) comparativement aux témoins (n=7). Or, l'expression génique est significativement augmentée chez les souris $PTH^{+/+}$ souffrant d'IRC (n=5) en comparaison avec les témoins (n=6), ce qui contredit les résultats obtenus chez les souris C57BL/6 (**figure 2.6**). Enfin, les souris $PTH^{-/-}$ souffrant d'IRC (n=9) expriment les mêmes quantités

de protéines et d'ARNm que les témoins $PTH^{-/-}$ (n=7). Puisque le Cyp2c29 n'est pas diminué par l'IRC chez les $PTH^{+/+}$, on ne peut pas conclure que la PTH est impliquée dans sa modulation.

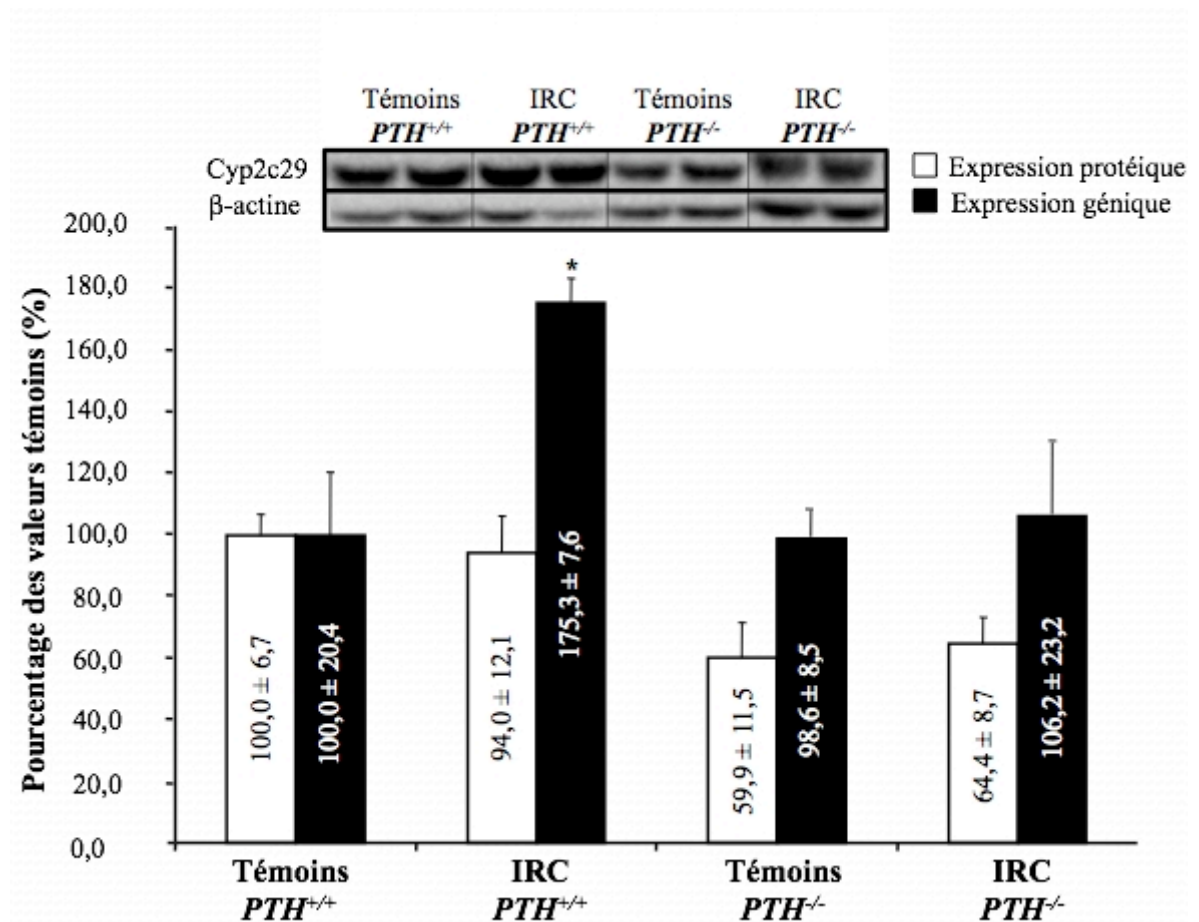


Figure 2.8 Expression protéique (□) et génique (■) du CYP2C29 dans les microsomes hépatiques de souris témoins et souffrant d'IRC. Les souris portaient ($PTH^{+/+}$) ou non ($PTH^{-/-}$) le gène PTH . Les données sont exprimées en moyenne ± erreur type et l'analyse statistique a été effectuée par ANOVA. Les valeurs des témoins $PTH^{+/+}$ ont arbitrairement été définies comme égales à 100%. Les blots correspondants sont également montrés. * $P < 0,05$ vs. témoins $PTH^{+/+}$.

3. Discussion

Cette étude visait d'une part de confirmer, dans un modèle murin, la diminution d'expression des enzymes du métabolisme hépatique en présence d'IRC et d'autre part, elle avait pour but de déterminer le rôle de la PTH dans cette diminution, à l'aide d'un modèle de souris mutantes pour le gène codant cette hormone. Nous avons ainsi démontré chez la souris C57BL/6 que l'IRC était associée à une réduction de l'expression de certaines isoformes du CYP450 hépatique impliquées dans le métabolisme des médicaments (Cyp1a2, 2c29 et 3a11), et que ce phénomène était dû à une diminution d'expression de l'ARNm codant ces isoformes. Ces modifications entraînent également des répercussions sur l'activité métabolique, tel que reflété par une diminution de 25% de la N-déméthylation de l'érythromycine par la famille Cyp3a. De plus, nous avons montré une réduction des niveaux de protéines et d'ARNm de la Nat2, suggérant que l'expression des enzymes de phase II étaient également diminuée par l'IRC chez la souris.

En outre, nous avons émis l'hypothèse que la diminution d'expression des enzymes du CYP450 hépatique observée chez les souris C57BL/6 atteintes d'IRC serait contrecarrée chez les souris transgéniques *PTH*^{-/-}. En comparant les souris *PTH*^{-/-} avec les souris C57BL/6, les résultats suggèrent que la PTH est responsable de la réduction des enzymes du CYP450 (Cyp2c29 et 3a11). Or, dans un souci de validation des résultats, nous avons également étudié l'expression des enzymes du CYP450 chez des souris de type sauvage issues de la même colonie que les souris *PTH*^{-/-}, soit les souris *PTH*^{+/+}. Étonnamment, après l'induction de l'IRC chez les souris *PTH*^{+/+}, aucune diminution des enzymes du CYP450 n'a été observée en comparaison aux témoins. De ce fait, il est encore prématuré de conclure que la PTH est impliquée dans la diminution d'expression des enzymes du CYP450 hépatique en présence d'IRC chez la souris, d'où la nécessité de poursuivre les études avec le modèle transgénique.

3.1 Modèle murin C57BL/6

3.1.1 Induction et marqueurs de l'insuffisance rénale chronique

Parmi les nombreuses études portant sur l'IRC, très peu ont utilisé un modèle expérimental murin. En effet, la méthode chirurgicale employée généralement pour l'induction de l'IRC, soit la néphrectomie subtotale 5/6 (Nx 5/6), a été développée chez le rat. Ainsi, suite à l'essai de différentes procédures publiées précédemment (données non montrées), notre laboratoire a choisi d'adapter le modèle de Nx 5/6 pour l'étude chez la souris, mais en effectuant une néphrectomie subtotale 3/4.

3.1.1.1 Induction de l'IRC

Tout d'abord, Gagnon et Duguid ont démontré en 1983 que l'électrocautérisation bilatérale du cortex rénal entraînait une augmentation sérique marquée et soutenue de la concentration du BUN et de la créatinine⁹³. Toutefois, ce modèle n'a pas été retenu, en raison de la difficulté à induire une IRC suffisamment sévère. La méthode d'électrocautérisation unilatérale du cortex rénal droit suivie d'une néphrectomie totale controlatérale permettait d'obtenir des valeurs de BUN supérieures, d'environ 105 mg/dL¹⁰³. Cependant, la réduction de la masse rénale par coagulation est imprécise et peut donner lieu à une variabilité importante des concentrations de BUN, en comparaison à la coupe au scalpel avec compression¹⁰³⁻¹⁰⁵. Notre modèle de néphrectomie subtotale engendre une urémie similaire, avec des valeurs de BUN environnant 97,6 mg/dL. Ainsi, l'induction de l'IRC par ce modèle est préférable puisqu'elle est reproductible.

Or, selon le modèle de Nx 5/6, qui consiste en une néphrectomie partielle gauche suivie d'une néphrectomie totale controlatérale, la proportion du rein gauche devant être retirée est de 2/3, soit un tiers à chaque pôle. Sept jours de récupération sont alloués entre

les deux étapes. Cependant, cette procédure réalisée telle quelle chez la souris entraîne une diminution significative du taux de survie. C'est pourquoi nous avons choisi de ne retirer qu'un quart du rein à chaque pôle, d'où l'appellation « néphrectomie 3/4 », et de permettre aux souris de récupérer durant une période de 14 jours. Le taux de survie associé à cette chirurgie a ainsi passé de 25% à 50%.

3.1.1.2 Marqueurs biochimiques de l'IRC

Afin d'évaluer le degré d'IRC, nous avons également mesuré la concentration sérique de créatinine, un marqueur classique de dysfonction rénale, selon une méthode colorimétrique basée sur la réaction de Jaffé¹⁰⁶. Elle mesure l'intensité de coloration du complexe que forme l'acide picrique et la créatinine en milieu alcalin¹⁰⁷. Or, une étude a démontré que cette technique entraînait une surestimation importante des valeurs de créatinine chez la souris¹⁰⁸. De plus, la présence d'hémoglobine dans le sérum peut interférer avec les mesures¹⁰⁹. Pour la présente étude, les échantillons de sérum de souris utilisés présentaient souvent de l'hémolyse, ainsi, il est possible que les valeurs de créatinine présentées dans l'article (section *RESULTS*) soient biaisées. Bien que la concentration de créatinine soit plus élevée chez les souris atteintes d'IRC par rapport aux témoins, nous favorisons le BUN pour estimer la sévérité de l'IRC chez les souris. Par ailleurs, la cystatine C serait un marqueur plus approprié pour la souris, puisque sa production est stable et non influencée par des facteurs non rénaux tels que l'apport protéique¹¹⁰.

3.1.2 Expression des enzymes du CYP450 hépatique chez les souris C57BL/6

Malgré les nombreux travaux démontrant la diminution du CYP450 hépatique en présence d'IRC, la présente étude est la première à observer ce phénomène dans un modèle murin. Jusqu'à présent, le modèle expérimental préconisé était le rat.

3.1.2.1 Comparaison avec les études effectuées chez les rats

Des publications précédentes ont montré une diminution d'expression protéique et génique des isoformes CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2 chez le rat atteint d'IRC^{69, 74}. De plus, une étude *in vivo* utilisant des substrats de ces isoformes, soit l'aminopyrine (CYP2C11) et l'érythromycine (CYP3A2) a décelé une diminution d'activité enzymatique marquée des enzymes du CYP450, corrélant avec la réduction d'expression protéique. De façon similaire, la présente étude a révélé une diminution d'expression des isoformes hépatiques Cyp2c29 et Cyp3a11 chez des souris souffrant d'IRC, en comparaison avec les témoins (**Figures 1 et 2**). Ces résultats confirment alors ceux obtenus chez les rats. Or, nous avons également observé une diminution de l'expression protéique et génique de l'isoforme Cyp1a2. Toutefois, les travaux précédents n'ont indiqué aucune modification de l'expression de cette isoforme chez les rats^{69, 74}. Ce phénomène peut être expliqué par des différences inter-espèces influençant la régulation des enzymes du CYP450⁴⁹. En effet, une étude de Shi *et al.* a comparé des souris C57BL/6 avec des souris chimériques portant les gènes CYP1A1 et CYP1A2 humains. Une augmentation de 2 fois l'expression d'ARNm codant pour le Cyp1a2 murin a été observée par rapport à l'expression du CYP1A2 humain suite à une induction au TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)¹¹¹. En outre, des différences quant à l'inhibition du CYP1A2 ont également été rapportées. Notamment, chez le rat, la furafylline ne peut inhiber le CYP1A2 que si sa concentration est 1000 fois

supérieure à celle requise pour inhiber l'isoenzyme humaine. Cela suggère que le site actif présente une différence majeure dans sa géométrie entre les orthologues du CYP1A2¹¹².

3.1.2.2 Répercussions cliniques

Nous avons également démontré *in vitro* que l'activité métabolique du Cyp3a était réduite de 25% chez la souris atteinte d'IRC ($1,3 \pm 0,1$ vs. $1,7 \pm 0,1$ nmol mg⁻¹ de protéines microsomales min⁻¹, $p < 0,01$). Ces résultats sont similaires à la diminution d'activité enzymatique du CYP3A2 de 35% observée précédemment dans des hépatocytes de rats normaux incubés avec du sérum de patients souffrant d'IRC⁸⁵. Le même groupe a aussi montré que les niveaux protéiques et géniques des CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2 étaient diminués de plus de 35% en présence de sérum de patients urémiques⁸⁵. Michaud *et al.* ont par ailleurs illustré que l'effet inhibiteur du sérum de patient disparaissait suite à une transplantation rénale¹¹³. Cela suggère que le sérum urémique contient des médiateurs agissant comme inhibiteurs du CYP450.

Les résultats mentionnés ci-haut pourraient expliquer les diminutions de clairance non rénale ayant été observées dans des études précédentes chez des patients atteints d'IRC. Notamment, une augmentation de la surface sous la courbe lors de l'administration de nicardipine, un médicament métabolisé par le CYP3A, a été décelée chez des patients ayant une fonction rénale déficiente¹¹⁴. Dowling *et al.* ont démontré par test d'exhalation que le métabolisme de l'érythromycine était réduit de 28% chez des patients souffrant d'IRT en comparaison aux témoins, reflétant une diminution de l'activité enzymatique du CYP3A⁹⁰. Sachant que la famille CYP3A prend part au métabolisme de plus de 50% des médicaments sur le marché⁴⁹, ces conclusions sont d'une importance clinique majeure.

3.1.2.3 Expression du CYP450 chez la souris « humanisée »

Des différences considérables existent entre les humains et les souris quant à l'expression des formes orthologues du CYP450. Ainsi, l'extrapolation du métabolisme hépatique de la souris à l'humain est assujettie à l'erreur⁴¹. L'utilisation de souris transgéniques dites « humanisées » peut remédier à cette difficulté. Huit différentes isoformes humaines ont été démontrées comme fonctionnelles dans ces souris chimériques, soit les CYP1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 et 3A5. Des modèles humanisés d'enzymes de phase II dont les N-acétyltransférases ont également été développés¹¹⁵. Il serait ainsi possible d'étudier l'effet de l'IRC sur le métabolisme hépatique humain à l'aide de ces souris.

3.1.3 Expression de la Nat2 hépatique chez les souris C57BL/6

Outre l'expression du CYP450, nous nous sommes intéressés au métabolisme de phase II chez la souris atteinte d'IRC. Plus précisément, l'expression de la Nat2 hépatique a été étudiée, l'acétylation représentant une des principales réactions de conjugaison.

Une étude précédente effectuée par *Simard et al.* a montré une diminution significative à la fois de l'expression de la NAT1 et de la NAT2 chez les rats urémiques. Ces réductions de plus de 30% étaient accompagnées d'une diminution d'activité enzymatique de la NAT2 de 50% par rapport aux témoins⁷¹. Dans la présente étude, nous avons noté une baisse d'expression protéique de la Nat2 hépatique de 30%, ce qui corrèle avec les résultats obtenus chez les rats. De plus, le mécanisme sous-jacent semble être la réduction de synthèse d'ARNm, tel qu'en témoigne la diminution de 20% de l'ARNm (**Figure 3**). Par contre, nous n'avons pas analysé l'activité enzymatique : des expériences supplémentaires seront requises. L'étude de *Simard et al.* a également observé l'effet du sérum de rats atteints d'IRC sur l'expression de NAT1 et 2 dans des hépatocytes de rats

normaux. Les résultats ont indiqué une diminution marquée de chaque isoenzyme, suggérant que le sérum contenait des médiateurs induisant cette régulation à la baisse⁷¹.

D'autres travaux portant sur les enzymes de phase II en présence d'IRC ont été réalisées chez le rat, concernant la glucuronidation. En effet, Yu *et al.* ont étudié différentes isoformes d'UDP-glucuronyltransférases (UGT), mais n'ont décelé aucune différence significative entre les niveaux protéiques ou l'activité catalytique des enzymes chez des rats atteints d'IRC comparés aux témoins. Cependant, l'échantillon était peu nombreux (n=4 rats par groupe)¹¹⁶. En revanche, chez l'humain, une étude pharmacocinétique a montré que la clairance non rénale de la zidovudine, un médicament métabolisé par glucuronidation, était affectée par l'IRC, laissant supposer qu'une diminution des UGTs était en cause⁷⁷. Or, aucune étude s'intéressant à l'effet de l'IRC sur la glucuronidation n'a été publiée chez la souris. Des études subséquentes à l'aide de ce modèle animal permettraient l'utilisation de souris transgéniques pour déterminer quel mécanisme entraîne l'inhibition des enzymes métaboliques telles que les N-acétyltransférases et les glucuronyltransférases.

3.2 Modèle murin transgénique *PTH*^{-/-}

Sachant que chez le rat, la PTH est impliquée dans la régulation à la baisse des enzymes du CYP450 hépatique⁸⁹, nous avons tenté de confirmer cette diminution dans notre modèle murin transgénique mutant pour le gène codant la PTH.

3.2.1 Conséquences phénotypiques de l'absence de PTH

La PTH exerçant diverses fonctions dans l'organisme, en absence de cette hormone, les souris *PTH*^{-/-} pourraient présenter un phénotype différent des souris de type sauvage *PTH*^{+/+}.

3.2.1.1 Calcémie et phosphatémie

Nous avons noté une hypocalcémie et une hyperphosphatémie chez les souris *PTH*^{-/-} (**Tableau V**). Ces résultats correspondaient à ce qui était attendu, compte tenu de l'absence de PTH. En effet, tel que mentionné précédemment, cette hormone agit au niveau des os, des reins et de l'intestin pour maintenir la concentration plasmatique de calcium normale. De plus, elle produit l'effet inverse sur la concentration de phosphore, en réduisant sa réabsorption rénale (section 1.1.2.1). Ainsi, chez les souris n'exprimant pas la PTH, ces phénomènes ne peuvent avoir lieu, expliquant alors l'hypocalcémie et l'hyperphosphatémie.

Or, la diminution de la concentration de calcium sérique décrite ne semblait pas exercer un impact physiologique considérable sur les souris. En effet, la supplémentation de l'eau de boisson n'a pas été nécessaire, puisque l'hypocalcémie n'était pas létale. Selon l'étude de Michaud *et al.*, les rats parathyroïdectomisés nécessitaient obligatoirement un apport supplémentaire en gluconate de calcium afin d'éviter la tétanie⁸⁹. Cela laisse supposer ou bien l'existence d'un mécanisme d'adaptation, ou bien que la calcémie est ajustée à un niveau viable par un facteur autre que la PTH chez les souris mutantes. Une étude de Miao *et al.* a démontré que la délétion du gène *PTH* n'affectait pas la production du PTHrP (*PTH-related peptide*), un peptide initialement identifié comme le facteur responsable de l'hypercalcémie humorale maligne¹¹⁷. Il a également été montré que des souris mutantes pour le gène codant le PTHrP étaient incapables d'assurer le transport normal du calcium au placenta, engendrant une hypocalcémie¹¹⁸. De ce fait, le PTHrP semble jouer un rôle important dans le maintien de la calcémie, et pourrait permettre une compensation pour l'absence de PTH chez nos souris transgéniques. Par ailleurs, des souris *PTH*^{-/-} alimentées avec une diète faible en Ca²⁺ présentent une élévation des quantités circulantes de 1,25(OH)D₃, dues à une augmentation de transcription du gène *Cyp27b1* au

niveau du tubule rénal proximal¹¹⁷. Nous pourrions émettre l'hypothèse que l'hypocalcémie présente chez nos souris *PTH*^{-/-} pourrait provoquer une augmentation de production de vitamine D, favorisant l'absorption du Ca²⁺ au niveau intestinal. Cette hypothèse reste à confirmer expérimentalement.

3.2.1.2 Expression du CYP450 hépatique

L'effet de l'absence de PTH sur l'expression des enzymes du CYP450 a aussi été évalué. Tel qu'attendu, les enzymes du CYP450 hépatique ne semblent pas être modifiées par le génotype homozygote négatif (**Figure 2.3**). En effet, chez l'humain, la PTH est reconnue comme un élément régulateur des CYP27B1 et CYP24A1 situés au niveau rénal¹¹⁹, toutefois, aucune étude indique que la PTH à des concentrations normales puisse réguler des isoformes hépatiques. L'étude de Michaud *et al.* illustre une diminution du CYP3A2 dans des hépatocytes de rats normaux en présence de concentrations de PTH élevées simulant l'hyperparathyroïdie⁸⁹.

3.2.2 Absence de PTH et insuffisance rénale chronique

La délétion du gène *PTH* a engendré chez les souris mutantes une réponse différente à l'induction d'IRC.

3.2.2.1 Paramètres biochimiques

Tout d'abord, le **tableau VI** indique que les souris atteintes d'IRC (*PTH*^{+/+} et *PTH*^{-/-}) présentent effectivement une atteinte rénale, tel que reflété par l'augmentation marquée des mesures de BUN par rapport à leurs témoins. Cependant, contrairement aux résultats obtenus chez les souris C57BL/6 (**Tableau II**), les valeurs de créatinine sérique n'augmentent pas de façon significative. Cela appuie notre remarque que la créatinine n'est pas à un marqueur adéquat pour estimer le degré d'IRC chez la souris (section 3.1.1.2).

De façon générale, l'IRC entraîne une déficience en vitamine D associée à une réabsorption intestinale de calcium réduite, favorisant l'hypocalcémie. De plus, la perte de fonction rénale conduit à une rétention de phosphore provoquant une hyperphosphatémie (section 1.1.2.2). C'est en effet ce que nous observons chez les souris $PTH^{-/-}$ atteintes d'IRC comparées aux témoins $PTH^{-/-}$: les souris avec une IRC présentent une concentration sérique de calcium plus faible et une concentration sérique de phosphore plus élevée que les témoins (**Tableau VI**). Or, tel que mentionné précédemment, le génotype homozygote négatif seul (sans IRC) entraîne une hypocalcémie et une hyperphosphatémie : les souris $PTH^{-/-}$ témoins présentent une concentration de calcium réduite et une concentration de phosphore augmentée par rapport aux témoins $PTH^{+/+}$. Les valeurs de calcémie et de phosphatémie obtenues pour les souris $PTH^{-/-}$ témoins au **tableau VI** sont également semblables à celles obtenues au **tableau V** (1,82 et 4,67 mmol/L vs. 2,00 et 4,26 mmol/L).

En ce qui concerne les souris $PTH^{+/+}$, les données semblent correspondre à la littérature. Chez les souris atteintes d'IRC, nous observons pour le calcium et le phosphore une augmentation par rapport aux témoins (**tableau VI**). Sachant que l'IRC est associée à l'hyperparathyroïdie secondaire, l'augmentation légère de la calcémie pourrait être expliquée par une augmentation de sécrétion de PTH¹²⁰. Une étude populationnelle a indiqué que les niveaux de phosphore augmentaient progressivement dès que le DFG s'abaissait à 50-60 mL/min/1,73m² ¹²¹. De ce fait, les résultats obtenus suggèrent que les niveaux de phosphore élevés aient favorisé l'apparition de l'hyperparathyroïdie secondaire. Par contre, les changements observés ne sont pas statistiquement significatifs. Cela sous-entend alors que la sévérité de l'IRC induite chez les souris $PTH^{+/+}$ est modérée, plutôt que sévère. D'ailleurs, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative, nous pouvons remarquer que l'élévation du BUN chez les souris $PTH^{+/+}$ semble moindre que chez les souris $PTH^{-/-}$.

Les valeurs de BUN obtenues chez les souris $PTH^{+/+}$ pourraient soulever le doute quant à la reproductibilité du modèle chirurgical de néphrectomie 3/4. Or, de plus en plus d'études semblent indiquer que le fond génétique d'une souris peut fortement influencer sa réponse à l'induction d'IRC. En effet, Fogo *et al.* ont démontré à l'aide du modèle de néphrectomie 5/6 que les souris de souche C57BL/6 ne développaient qu'une faible glomérulosclérose (< 5%) en comparaison aux souris de souche 129/Sv (42%)¹²². Cette résistance à l'IRC peut s'expliquer par des polymorphismes dans les gènes codant la rénine : la souche C57BL/6 possède un seul gène (*Ren-1^c*) alors que d'autres souches telles que 129/Sv en possèdent deux (*Ren-1^d* et *Ren-2*). En présence de deux gènes, divers changements sont observés dont une augmentation de 10 fois de l'activité rénine plasmatique et de l'hypertension dépendant de l'angiotensine II¹²³. Ainsi, les souris $PTH^{+/+}$ étant de fond génétique C57BL/6, il est possible que nos résultats aient été modifiés par une résistance à l'IRC.

3.2.2.2 Expression des enzymes du CYP450 hépatique chez les souris $PTH^{-/-}$

En premier lieu, nous avons comparé l'expression des enzymes du CYP450 hépatique des souris mutantes avec celle des souris C57BL/6 (**Figures 2.5 et 2.6**). Les résultats semblaient à première vue confirmer notre hypothèse selon laquelle la PTH joue un rôle majeur dans la diminution des enzymes du CYP450 en présence d'IRC. Cependant, les données obtenues en comparant les souris $PTH^{-/-}$ aux souris $PTH^{+/+}$ issues de la même colonie ne nous permettent pas d'appuyer cette conclusion (**Figures 2.7 et 2.8**). En effet, à la fois pour le Cyp3a11 et le Cyp2c29, aucune diminution n'est observée chez les souris $PTH^{+/+}$ atteintes d'IRC comparées aux témoins. Nous pouvons même noter une induction significative du Cyp2c29. Or, si à la base, les enzymes du CYP450 ne sont pas régulées négativement par l'IRC chez les souris $PTH^{+/+}$, il nous est impossible de conclure qu'une baisse serait attribuable à la PTH. Pourquoi le CYP450 hépatique des souris $PTH^{+/+}$ n'est-il

pas modulé de la même façon que celui des souris C57BL/6, s'il s'agit théoriquement de souris génétiquement identiques? Nous supposons conséquemment que la lignée transgénique n'était pas uniquement de fond génétique C57BL/6.

3.2.2.2.1 Contamination génétique et difficulté de reproduction de la colonie

Lors de la réception des géniteurs de la colonie, deux des quatre mâles hétérozygotes envoyés n'avaient pas survécu au transport. Une fois la reproduction entamée, nous avons remarqué que la naissance de souris $PTH^{-/}$ ne respectait pas les proportions mendéliennes, contrairement à ce qu'obtenait le groupe du Dr Goltzman¹¹⁷. Puisque la fréquence d'apparition des homozygotes négatifs était largement inférieure à 25%, nous supposons que les mâles restants portaient vraisemblablement une tare génétique limitant la survie de ces derniers. Ainsi, le nombre de souris disponibles pour l'étude était faible, compte tenu du fait que nous n'utilisions que les mâles pour l'induction d'IRC.

L'importance du fond génétique sur le phénotype d'une souris mutante est maintenant bien établie. Ainsi, au moment de la génération d'un modèle de souris transgénique, un certain nombre de rétrocroisements sont nécessaires pour assurer la pureté de la lignée. Après 10 générations, la probabilité qu'une région particulière de la souche donneuse soit retenue est réduite à 0,1%, et la souris est alors considérée comme « congénique »¹²⁴. Afin de développer les souris $PTH^{-/}$, des chimères 129/Sv – BALB/C ont été accouplés à des femelles C57BL/6 (section 3). Miao *et al.* ont par la suite effectué six rétrocroisements avant de réaliser leurs expériences¹¹⁷. Nous pouvons donc présumer que le fond génétique des souris n'était pas constitué de la souche C57BL/6 à 100%, et que la possibilité de contamination par la souche 129/Sv ou Balb/c était toujours présente. Effectivement, plusieurs souris ayant été utilisées pour notre étude portaient sans doute une région chromosomique étrangère, tel que reflété par la couleur de leur pelage. Les souris de souche C57BL/6 sont de couleur noire, alors que les souris de souche BALB/C ont un

phénotype albinos. Un croisement de ces deux souches produit une souris de phénotype agouti. Or, de nombreuses souris issues de nos accouplements avaient un phénotype agouti, indiquant une contamination par la souche BALB/C. Incidemment, les souris *PTH*^{+/+} n'étaient pas génétiquement identiques aux souris C57BL/6 provenant de l'élevage Charles River, ce qui pourrait expliquer la différence de régulation des enzymes du CYP450 observée.

3.2.2.2.2 Variabilité inter-souches

Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences supplémentaires sont requises : nous devons induire une IRC à des souris de souche BALB/C et comparer l'expression des enzymes du CYP450 hépatique à celle des souris C57BL/6. Aucune donnée n'existe concernant les différences inter-souches de régulation des enzymes du CYP450 hépatique chez la souris en présence d'IRC. Toutefois, Muller *et al.* ont démontré dans une étude récente que l'expression et l'activité du Cyp4a rénal étaient plus faibles chez les souris C57BL/6 que chez les BALB/C. Cette isoforme est responsable de l'hydroxylation de l'acide arachidonique en 20-HETE (*20 hydroxyeicosatetraenoic acid*), un facteur influençant les fonctions vasculaires et tubulaires rénales¹²⁵. D'ailleurs, une altération de l'expression du Cyp4a rénal peut contribuer au développement d'anomalies de ces fonctions chez les patients atteints d'une maladie rénovasculaire¹²⁶. De ce fait, si l'activité Cyp4a est plus élevée chez les souris de souche BALB/C, la production de 20-HETE devrait être augmentée, de même que les dommages rénaux. Or, cela ne correspond pas à ce que nous avons obtenu, puisque, tel que mentionné précédemment, le niveau d'IRC des souris *PTH*^{+/+} (des chimères BALB/C – C57BL/6) était moindre que celui des C57BL/6, suggérant que les BALB/C seraient plus résistantes à la glomérulosclérose. Une étude plus approfondie serait donc nécessaire.

3.2.2.2.3 *Changements à apporter*

Il est vrai que notre étude ne nous permet pas de conclure si la PTH est en cause dans la diminution d'expression des enzymes du CYP450 hépatique observée chez les souris C57BL/6. Des ajustements sont requis afin de répéter l'expérience. D'abord, davantage de rétrocroisements doivent être effectués jusqu'à l'élimination de la contamination du fond génétique par la souche BALB/C. Par la suite, un plus grand échantillon de souris néphrectomisées est nécessaire pour étudier l'expression des enzymes du CYP450. Or, vu la faible fréquence d'apparition des homozygotes négatifs, plus d'accouplements simultanés doivent être faits, mais l'étape de génotypage est limitante. Une méthode plus rapide permettant de génotyper davantage de souris à la fois doit être utilisée.

3.3 Mécanisme d'action proposé

Une fois les modifications apportées, si les résultats confirment le rôle de la PTH dans la diminution d'expression des enzymes du CYP450, la question du mécanisme d'action sera soulevée. Selon les études précédentes, la voie de signalisation empruntée par la PTH pour inhiber le métabolisme hépatique demeure méconnue^{71, 89}.

Des travaux récents ont révélé une implication possible de la voie NF- κ B dans la diminution d'expression des enzymes du CYP450. Lors de l'incubation d'hépatocytes de rats normaux avec de la PTH et des inhibiteurs de la voie NF- κ B (andrographolide et dithiocarbamate de pyrrolidine (PDTC)), l'effet de la PTH sur le CYP3A2 était renversé par les inhibiteurs⁸⁹. De plus, la diminution d'expression de la NAT2 exercée par la PTH était également prévenue par l'ajout d'andrographolide⁷¹.

L'exposition chronique à la PTH, comme dans le cas de l'IRC, peut entraîner une augmentation soutenue des niveaux basaux de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) ainsi qu'une surcharge de Ca^{2+} dans les hépatocytes. Chez des rats parathyroïdectomisés atteints d'IRC, les niveaux de $[Ca^{2+}]_i$ mesurés dans les hépatocytes étaient normaux. L'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ en présence d'IRC a été décrite par deux processus : une entrée de Ca^{2+} induite par la PTH, et une sortie réduite attribuable à une défaillance des pompes échangeuses d'ions¹²⁷. Le mécanisme par lequel la PTH permet l'entrée de calcium est l'activation de l'adénylate cyclase par une protéine G, stimulant la production d'AMPc qui entraîne l'activation des systèmes de transport tels les canaux calciques de type L⁸⁶. Cette entrée de calcium est un signal d'inhibition de la synthèse d'ARNm codant pour diverses protéines¹²⁸. Le lien entre ces données et la diminution d'expression des enzymes du CYP450 reste toutefois non établi. Notre laboratoire s'intéresse actuellement à la caractérisation du mécanisme de régulation des enzymes du CYP450 par la PTH en testant différentes voies de signalisation.

4. Conclusion

En conclusion, cette étude est la première à démontrer dans un modèle murin une régulation négative des enzymes du CYP450 (Cyp1a2, Cyp2c29, Cyp3a11) et de la Nat2 hépatiques induite par l'IRC, tel qu'observé précédemment chez le rat. De même, l'activité enzymatique du Cyp3a était également diminuée chez la souris atteinte d'IRC. Ces résultats ont conséquemment confirmé la validité du modèle de néphrectomie 3/4 et ont justifié l'utilisation de cette procédure pour induire une IRC à des souris $PTH^{-/-}$, en vue d'étudier le rôle de la PTH dans cette régulation à la baisse.

Or, en comparant les résultats obtenus chez les souris $PTH^{-/-}$ avec ceux des souris C57BL/6 provenant de l'élevage Charles River, nous pouvions attribuer la baisse d'expression des enzymes du CYP450 hépatique en situation d'IRC à la présence de PTH. Cependant, en comparant les résultats obtenus chez les souris $PTH^{-/-}$ avec les souris de type sauvage issues de la même colonie, soit les souris $PTH^{+/+}$, nous ne pouvions établir ce lien. En effet, les souris $PTH^{+/+}$ ne présentaient aucune diminution d'expression des enzymes du CYP450 en présence d'IRC, rendant alors l'interprétation des résultats obtenus chez les souris mutantes impossible. Nous proposons que cette divergence puisse être due à une différence quant au fond génétique des souris $PTH^{+/+}$ par rapport aux souris C57BL/6. Les souris $PTH^{-/-}$ et $PTH^{+/+}$ ont été générées à partir de blastocytes murins de souche BALB/C puis reproduites jusqu'à l'obtention de souris de fond génétique C57BL/6. Ainsi, elles auraient dû être génétiquement identiques aux souris provenant de chez Charles River. Or, des rétrocroisements supplémentaires auraient été nécessaires, puisqu'elles ne l'étaient pas.

Ainsi, il est toujours prématuré d'affirmer que la PTH est responsable de la diminution du CYP450 chez la souris souffrant d'IRC. Des expériences additionnelles à l'aide de souris $PTH^{+/+}$ et $PTH^{-/-}$ issues de plusieurs rétrocroisements nous permettraient alors de conclure à ce sujet.

Bibliographie

1. Coresh, J., Astor, B. C., Greene, T. et al.: Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*, **41**: 1, 2003
2. Levin, A., Hemmelgarn, B., Culeton, B. et al.: Guidelines for the management of chronic kidney disease.[see comment]. *CMAJ Canadian Medical Association Journal*, **179**: 1154, 2008
3. Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada 1997 to 2006. Ottawa: Canadian Institute for Health Information, 2008
4. Manns, B. J., Mendelssohn, D. C., Taub, K. J.: The economics of end-stage renal disease care in Canada: incentives and impact on delivery of care. *Int J Health Care Finance Econ*, **7**: 149, 2007
5. National Kidney, F.: K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*, **39**: S1, 2002
6. Stigant, C., Stevens, L., Levin, A.: Nephrology: 4. Strategies for the care of adults with chronic kidney disease. *CMAJ*, **168**: 1553, 2003
7. Pequignot, R., Belmin, J., Chauvelier, S. et al.: Renal function in older hospital patients is more accurately estimated using the Cockcroft-Gault formula than the modification diet in renal disease formula. *J Am Geriatr Soc*, **57**: 1638, 2009
8. Levey, A. S., Eckardt, K. U., Tsukamoto, Y. et al.: Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*, **67**: 2089, 2005
9. Cibulka, R., Racek, J.: Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure. *Physiol Res*, **56**: 697, 2007
10. Joy, M. S., Karagiannis, P. C., Peyerl, F. W. et al.: Outcomes of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease and the direct costs of treatment. *Journal of Managed Care Pharmacy*, **13**: 397, 2007
11. Hostetter, T. H.: Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol*, **23**: 194, 2003
12. Brownlee, M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**: 813, 2001

13. Alsaad, K. O., Herzenberg, A. M.: Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update. *J Clin Pathol*, **60**: 18, 2007
14. Hill, G. S.: Hypertensive nephrosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **17**: 266, 2008
15. Marin, R., Gorostidi, M., Fernandez-Vega, F. et al.: Systemic and glomerular hypertension and progression of chronic renal disease: the dilemma of nephrosclerosis. *Kidney Int Suppl*: S52, 2005
16. McClellan, W., Aronoff, S. L., Bolton, W. K. et al.: The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. *Curr Med Res Opin*, **20**: 1501, 2004
17. Thomas, R., Kanso, A., Sedor, J. R.: Chronic kidney disease and its complications. *Prim Care*, **35**: 329, 2008
18. Ratcliffe, P. J.: Molecular biology of erythropoietin. *Kidney Int*, **44**: 887, 1993
19. Wright, R. S., Reeder, G. S., Herzog, C. A. et al.: Acute myocardial infarction and renal dysfunction: a high-risk combination. *Ann Intern Med*, **137**: 563, 2002
20. Levin, A., Singer, J., Thompson, C. R. et al.: Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis*, **27**: 347, 1996
21. Goodman, W. G., London, G., Amann, K. et al.: Vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*, **43**: 572, 2004
22. Kiechl, S., Schett, G., Wenning, G. et al.: Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation*, **109**: 2175, 2004
23. Varaganam, M., Finney, H., Trevitt, R. et al.: Pretransplantation levels of C-reactive protein predict all-cause and cardiovascular mortality, but not graft outcome, in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis*, **43**: 502, 2004
24. Smith, G. L., Lichtman, J. H., Bracken, M. B. et al.: Renal impairment and outcomes in heart failure: systematic review and meta-analysis.[see comment]. *J Am Coll Cardiol*, **47**: 1987, 2006
25. Shoji, T., Ishimura, E., Inaba, M. et al.: Atherogenic lipoproteins in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*, **38**: S30, 2001
26. Ikizler, T. A., Ikizler, T. A.: Protein and energy: recommended intake and nutrient supplementation in chronic dialysis patients. *Seminars in Dialysis*, **17**: 471, 2004

27. Gardella, T. J., Juppner, H.: Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **12**: 210, 2001
28. Silver, J., Levi, R., Silver, J. et al.: Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Kidney International - Supplement*: S8, 2005
29. Pocock, G., Richards, C. D.: *Physiologie humaine*. Paris: Masson, p. 233, 2004
30. Akerstrom, G., Hellman, P., Hessman, O. et al.: Parathyroid glands in calcium regulation and human disease. *Ann N Y Acad Sci*, **1040**: 53, 2005
31. Llach, F., Velasquez Forero, F.: Secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure: pathogenic and clinical aspects. *Am J Kidney Dis*, **38**: S20, 2001
32. Kestenbaum, B., Belozeroff, V.: Mineral metabolism disturbances in patients with chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest*, **37**: 607, 2007
33. Mayersohn, M.: Drug absorption. *J Clin Pharmacol*, **27**: 634, 1987
34. Buxton, I. L. O.: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action, and Elimination. In: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition ed. Edited by L. L. Brunton. United States of America: McGRAW-HILL, 2006
35. Page, C. P., Curtis, M. J., Sutter, M. C. et al.: *Pharmacologie intégrée*, 2^e édition ed: DeBoeck Université, pp. 67-81, 1999
36. Julien, M., Kajiji, S., Kaback, R. H. et al.: Simple purification of highly active biotinylated P-glycoprotein: enantiomer-specific modulation of drug-stimulated ATPase activity. *Biochemistry (Mosc)*, **39**: 75, 2000
37. Burton, M. E., Shaw, L. M., Shentag, J. J. et al.: *Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 4th edition ed: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 231-241, 2005
38. Katzung, B. G.: *Basic and Clinical Pharmacology*, 10th edition ed: McGraw-Hill, p. 51, 2006
39. Anandatheerthavarada, H. K., Vijayasathy, C., Bhagwat, S. V. et al.: Physiological role of the N-terminal processed P4501A1 targeted to mitochondria in erythromycin metabolism and reversal of erythromycin-mediated inhibition of mitochondrial protein synthesis. *J Biol Chem*, **274**: 6617, 1999

40. Guengerich, F. P.: Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv*, **3**: 194, 2003
41. Lofgren, S., Hagbjork, A. L., Ekman, S. et al.: Metabolism of human cytochrome P450 marker substrates in mouse: a strain and gender comparison. *Xenobiotica*, **34**: 811, 2004
42. Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L. et al.: Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 11825, 1993
43. Lin, J. H., Lin, J. H.: CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. *Pharm Res*, **23**: 1089, 2006
44. Barouki, R., Morel, Y.: Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol*, **61**: 511, 2001
45. Morgan, E. T., Li-Masters, T., Cheng, P. Y.: Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology*, **181-182**: 207, 2002
46. Barakat, M. M., El-Kadi, A. O., du Souich, P.: L-NAME prevents in vivo the inactivation but not the down-regulation of hepatic cytochrome P450 caused by an acute inflammatory reaction. *Life Sci*, **69**: 1559, 2001
47. Bleau, A. M., Levitchi, M. C., Maurice, H. et al.: Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines. *Br J Pharmacol*, **130**: 1777, 2000
48. Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A. et al.: Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, **116**: 496, 2007
49. Martignoni, M., Groothuis, G. M., de Kanter, R. et al.: Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, **2**: 875, 2006
50. Liska, D. J.: The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev*, **3**: 187, 1998
51. Burchell, B.: Genetic variation of human UDP-glucuronosyltransferase: implications in disease and drug glucuronidation. *Am J Pharmacogenomics*, **3**: 37, 2003
52. Sim, E., Walters, K., Boukouvala, S.: Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metab Rev*, **40**: 479, 2008

53. Dreisbach, A. W., Lertora, J. J., Dreisbach, A. W. et al.: The effect of chronic renal failure on hepatic drug metabolism and drug disposition.[see comment]. *Seminars in Dialysis*, **16**: 45, 2003
54. Nolin, T. D.: Altered nonrenal drug clearance in ESRD. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **17**: 555, 2008
55. Sun, H., Frassetto, L., Benet, L. Z.: Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther*, **109**: 1, 2006
56. Maher, J. M., Slitt, A. L., Callaghan, T. N. et al.: Alterations in transporter expression in liver, kidney, and duodenum after targeted disruption of the transcription factor HNF1alpha. *Biochem Pharmacol*, **72**: 512, 2006
57. Petzinger, E., Geyer, J., Petzinger, E. et al.: Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **372**: 465, 2006
58. Porcelli, L., Lemos, C., Peters, G. J. et al.: Intracellular trafficking of MDR transporters and relevance of SNPs. *Curr Top Med Chem*, **9**: 197, 2009
59. Dreisbach, A. W., Lertora, J. J., Dreisbach, A. W. et al.: The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, **4**: 1065, 2008
60. Pichette, V., Leblond, F. A., Pichette, V. et al.: Drug metabolism in chronic renal failure. *Current Drug Metabolism*, **4**: 91, 2003
61. Nolin, T. D., Frye, R. F., Matzke, G. R.: Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis*, **42**: 906, 2003
62. St Peter, W. L., Redic-Kill, K. A., Halstenson, C. E.: Clinical pharmacokinetics of antibiotics in patients with impaired renal function. *Clin Pharmacokinet*, **22**: 169, 1992
63. Reidenberg, M. M., Drayer, D. E.: Alteration of drug-protein binding in renal disease. *Clin Pharmacokinet*, **9 Suppl 1**: 18, 1984
64. Koch-Weser, J., Sellers, E. M.: Drug therapy. Binding of drugs to serum albumin (second of two parts). *N Engl J Med*, **294**: 526, 1976
65. Koch-Weser, J., Sellers, E. M.: Binding of drugs to serum albumin (first of two parts). *N Engl J Med*, **294**: 311, 1976

66. Takamura, N., Maruyama, T., Otagiri, M.: Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia.[see comment]. *Clin Chem*, **43**: 2274, 1997
67. Ikeda, K., Yoshitomi, H., Nakayama, T. et al.: Plasma protein binding of frusemide in renal failure rabbits: investigation of endogenous protein binding inhibitors. *J Pharm Pharmacol*, **36**: 663, 1984
68. Lam, Y. W., Banerji, S., Hatfield, C. et al.: Principles of drug administration in renal insufficiency. *Clin Pharmacokinet*, **32**: 30, 1997
69. Leblond, F., Guevin, C., Demers, C. et al.: Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **12**: 326, 2001
70. Naud, J., Michaud, J., Leblond, F. A. et al.: Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug Metab Dispos*, **36**: 124, 2008
71. Simard, E., Naud, J., Michaud, J. et al.: Downregulation of hepatic acetylation of drugs in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **19**: 1352, 2008
72. Naud, J., Michaud, J., Boisvert, C. et al.: Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **320**: 978, 2007
73. Leblond, F. A., Petrucci, M., Dube, P. et al.: Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **13**: 1579, 2002
74. Leblond, F. A., Giroux, L., Villeneuve, J. P. et al.: Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metabolism & Disposition*, **28**: 1317, 2000
75. Bianchetti, G., Graziani, G., Brancaccio, D. et al.: Pharmacokinetics and effects of propranolol in terminal uraemic patients and in patients undergoing regular dialysis treatment. *Clin Pharmacokinet*, **1**: 373, 1976
76. Osborne, R., Joel, S., Grebenik, K. et al.: The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronides in kidney failure. *Clin Pharmacol Ther*, **54**: 158, 1993
77. Singlas, E., Pioger, J. C., Taburet, A. M. et al.: Zidovudine disposition in patients with severe renal impairment: influence of hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther*, **46**: 190, 1989
78. Kim, Y. G., Shin, J. G., Shin, S. G. et al.: Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther*, **54**: 612, 1993

79. Veau, C., Leroy, C., Banide, H. et al.: Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant*, **16**: 1607, 2001
80. Aoyama, I., Enomoto, A., Niwa, T. et al.: Effects of oral adsorbent on gene expression profile in uremic rat kidney: cDNA array analysis. *Am J Kidney Dis*, **41**: S8, 2003
81. Ji, L., Masuda, S., Saito, H. et al.: Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int*, **62**: 514, 2002
82. Laouari, D., Yang, R., Veau, C. et al.: Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**: F636, 2001
83. Holzer, B., Stieger, B., Folkers, G. et al.: Differential regulation of basolateral and canalicular transporter expression in rat liver in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther*, **77**: P34, 2005
84. Vormfelde, S. V., Muck, W., Freudenthaler, S. M. et al.: Pharmacokinetics of cerivastatin in renal impairment are predicted by low serum albumin concentration rather than by low creatinine clearance. *J Clin Pharmacol*, **39**: 147, 1999
85. Guevin, C., Michaud, J., Naud, J. et al.: Down-regulation of hepatic cytochrome p450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol*, **137**: 1039, 2002
86. Klin, M., Smogorzewski, M., Khilnani, H. et al.: Mechanisms of PTH-induced rise in cytosolic calcium in adult rat hepatocytes. *Am J Physiol*, **267**: G754, 1994
87. Smogorzewski, M. J., Massry, S. G.: Liver metabolism in CRF. *Am J Kidney Dis*, **41**: S127, 2003
88. Balducci, A., Coen, G., Manni, M. et al.: In vivo assessment of intact parathyroid hormone adsorption by different dialysis membranes during hemodialysis. *Artif Organs*, **28**: 1067, 2004
89. Michaud, J., Naud, J., Chouinard, J. et al.: Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **17**: 3041, 2006
90. Dowling, T. C., Briglia, A. E., Fink, J. C. et al.: Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther*, **73**: 427, 2003

91. McCance, R. A., Morrison, A. B.: The effects of equal and limited rations of water, and of 1, 2 and 3 per cent solutions of sodium chloride on partially nephrectomized and normal rats. *Exp Physiol*, **41**: 365, 1956
92. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. et al.: Measurement of protein using bicinchoninic acid.[erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279]. *Anal Biochem*, **150**: 76, 1985
93. Gagnon, R. F., Duguid, W. P.: A reproducible model for chronic renal failure in the mouse. *Urol Res*, **11**: 11, 1983
94. Kren, S., Hostetter, T. H.: The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int*, **56**: 333, 1999
95. Miao, D., He, B., Karaplis, A. C. et al.: Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *J Clin Invest*, **109**: 1173, 2002
96. Toumadje, A., Kusumoto, K., Parton, A. et al.: Pluripotent differentiation in vitro of murine ES-D3 embryonic stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, **39**: 449, 2003
97. Tybulewicz, V. L., Crawford, C. E., Jackson, P. K. et al.: Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*, **65**: 1153, 1991
98. Gridley, T., Woychik, R., Gridley, T. et al.: Laser surgery for mouse geneticists.[comment]. *Nat Biotechnol*, **25**: 59, 2007
99. Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**: 156, 1987
100. Xue, Y., Zhang, Z., Karaplis, A. C. et al.: Exogenous PTH-related protein and PTH improve mineral and skeletal status in 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and PTH double knockout mice. *J Bone Miner Res*, **20**: 1766, 2005
101. Traynor, T., Yang, T., Huang, Y. G. et al.: Inhibition of adenosine-1 receptor-mediated preglomerular vasoconstriction in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol*, **275**: F922, 1998
102. Dani, M., Boisvert, C., Michaud, J. et al.: Downregulation of liver drug metabolizing enzymes in a murine model of chronic renal failure. *Drug Metab Dispos*, (en préparation)

103. Gagnon, R. F., Gallimore, B.: Characterization of a mouse model of chronic uremia. *Urol Res*, **16**: 119, 1988
104. Gabizon, D., Goren, E., Shaked, U. et al.: Induction of chronic renal failure in the mouse: a new model. *Nephron*, **40**: 349, 1985
105. Gagnon, R. F., Ansari, M.: Development and progression of uremic changes in the mouse with surgically induced renal failure. *Nephron*, **54**: 70, 1990
106. Jaffé, M.: Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. *Z Physiol Chem*, **10**: 391, 1886
107. Jaudon, T., Seronie-Vivien, S., Chatelut, e. et al.: [Comparison of the modified Jaffe method and an enzymatic method for the measurement of serum creatinine: practical consequences of a method change in the milieu of laboratory of oncologic clinical biology]. *Ann Biol Clin (Paris)*, **58**: 499, 2000
108. Meyer, M. H., Meyer, R. A., Jr., Gray, R. W. et al.: Picric acid methods greatly overestimate serum creatinine in mice: more accurate results with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, **144**: 285, 1985
109. Keppler, A., Gretz, N., Schmidt, R. et al.: Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int*, **71**: 74, 2007
110. Song, S., Meyer, M., Turk, T. R. et al.: Serum cystatin C in mouse models: a reliable and precise marker for renal function and superior to serum creatinine. *Nephrol Dial Transplant*, **24**: 1157, 2009
111. Shi, Z., Chen, Y., Dong, H. et al.: Generation of a 'humanized' hCYP1A1_1A2_Cyp1a1/1a2(-/-)_Ahrd mouse line harboring the poor-affinity aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **376**: 775, 2008
112. Sesardic, D., Boobis, A. R., Murray, B. P. et al.: Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man. *Br J Clin Pharmacol*, **29**: 651, 1990
113. Michaud, J., Dube, P., Naud, J. et al.: Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol*, **144**: 1067, 2005
114. Ahmed, J. H., Grant, A. C., Rodger, R. S. et al.: Inhibitory effect of uraemia on the hepatic clearance and metabolism of nicardipine. *Br J Clin Pharmacol*, **32**: 57, 1991
115. Katoh, M., Tateno, C., Yoshizato, K. et al.: Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology*, **246**: 9, 2008

116. Yu, C., Ritter, J. K., Krieg, R. J. et al.: Effect of chronic renal insufficiency on hepatic and renal udp-glucuronyltransferases in rats. *Drug Metabolism & Disposition*, **34**: 621, 2006
117. Miao, D., He, B., Lanske, B. et al.: Skeletal abnormalities in Pth-null mice are influenced by dietary calcium. *Endocrinology*, **145**: 2046, 2004
118. Kovacs, C. S., Chafe, L. L., Fudge, N. J. et al.: PTH regulates fetal blood calcium and skeletal mineralization independently of PTHrP. *Endocrinology*, **142**: 4983, 2001
119. Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M. et al.: [Vitamin D: metabolism, regulation and associated diseases]. *Med Sci (Paris)*, **22**: 1095, 2006
120. Goodman, W. G., Quarles, L. D., Goodman, W. G.: Development and progression of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: lessons from molecular genetics. *Kidney Int*, **74**: 276, 2008
121. Hsu, C. Y., Chertow, G. M., Hsu, C.-Y. et al.: Elevations of serum phosphorus and potassium in mild to moderate chronic renal insufficiency. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **17**: 1419, 2002
122. Fogo, A., Ma, L.-J.: Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int*, **64**: 350, 2003
123. Wang, Q., Hummler, E., Nussberger, J. et al.: Blood pressure, cardiac, and renal responses to salt and deoxycorticosterone acetate in mice: role of Renin genes. *J Am Soc Nephrol*, **13**: 1509, 2002
124. Wang, S., Yu, J., Lusic, A.: The problem of passenger genes in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**: 2100, 2007
125. Muller, D. N., Schmidt, C., Barbosa-Sicard, E. et al.: Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation. *Biochem J*, **403**: 109, 2007
126. Minuz, P., Jiang, H., Fava, C. et al.: Altered release of cytochrome p450 metabolites of arachidonic acid in renovascular disease. *Hypertension*, **51**: 1379, 2008
127. Klin, M., Smogorzewski, M., Massry, S. G.: Chronic renal failure increases cytosolic Ca²⁺ of hepatocytes. *Am J Physiol*, **269**: G103, 1995
128. Smogorzewski, M. J., Massry, S. G.: Liver metabolism in CRF. *Am J Kidney Dis*, **41**: S127, 2003