

Université de Montréal

**Les répercussions de l'insuffisance rénale chronique sur
le transport des médicaments**

par

Judith Naud

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Pharmacologie

Mai 2012

© Judith Naud, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Les répercussions de l'insuffisance rénale chronique sur le transport des médicaments.

Présentée par :
Judith Naud

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martin Sirois, président-rapporteur
Dr Vincent Pichette, directeur de recherche
Dr Éric Thorin, membre du jury
Dr Paul Isenring, examinateur externe
Dr Édouard Kouassi, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'insuffisance rénale chronique (IRC) affecte 13 % de la population américaine et son incidence ne cesse d'augmenter. Malgré un ajustement des doses de médicaments administrés en fonction du taux de filtration glomérulaire du patient urémique, près de 40 % des patients reçoivent une dose trop élevée en raison de modifications de l'élimination extrarénale des médicaments chez ces patients. Il est connu que l'IRC affecte l'élimination métabolique des médicaments par les cytochromes P450 et les enzymes de biotransformation de phase II. Nous avons aussi démontré, chez le rat, que l'IRC affecte l'expression et l'activité de transporteurs de médicaments intestinaux entraînant une augmentation de la biodisponibilité de certains médicaments. On retrouve des transporteurs de médicaments dans de nombreux organes comme le foie, les reins et la barrière hématoencéphalique (BHE) où ils jouent des rôles importants dans les éliminations biliaire et rénale et la pénétration des médicaments au cerveau.

Le but de ce travail était de mesurer, chez des rats néphrectomisés, les impacts de l'IRC sur l'expression protéique et génique et l'activité des transporteurs de médicaments hépatiques, rénaux et cérébraux. Les transporteurs étudiés sont de la famille des transporteurs ABC (P-glycoprotéine, *multidrug-resistance related protein*, *breast cancer resistance protein*) ou des *solute carriers* (*organic anion transporter*, *organic anion transporting protein*). Aussi, une étude réalisée chez l'humain visait à évaluer la pharmacocinétique de deux médicaments : la fexofénadine, un médicament majoritairement transporté, et le midazolam, un substrat du cytochrome P450 3A4, chez des sujets dialysés.

Nos résultats montrent que, chez le rat, l'IRC entraîne des modulations de l'expression des transporteurs d'influx et d'efflux hépatiques pouvant entraîner des diminutions du métabolisme hépatique et de l'excrétion biliaire des médicaments. Dans le rein, nous avons démontré des modulations de l'expression des transporteurs de médicaments. Nous avons aussi démontré que l'IRC diminue l'élimination urinaire de la rhodamine 123 et favorise l'accumulation intrarénale de médicaments transportés comme la benzylpénicilline et la digoxine. À la BHE, nous avons démontré des diminutions de

l'expression des transporteurs de médicaments. Toutefois, nous n'avons pas observé d'accumulation intracérébrale de trois substrats utilisés (digoxine, doxorubicine et vérapamil) et même une diminution de l'accumulation intracérébrale de la benzylpénicilline. Il semble donc que, malgré les modulations de l'expression des différents transporteurs de médicaments, l'intégrité et la fonction de la BHE soient conservées en IRC.

Chez l'humain, nous avons démontré une augmentation de la surface sous la courbe de la fexofénadine chez les sujets dialysés, comparativement aux témoins, suggérant une altération des mécanismes de transport des médicaments chez ces patients. Nous n'avons, toutefois, pas observé de modification de la pharmacocinétique du midazolam chez les patients dialysés, suggérant une activité métabolique normale chez ces patients.

Un ou des facteurs s'accumulant dans le sérum des sujets urémiques semblent responsables des modulations de l'expression et de l'activité des transporteurs de médicaments observées chez le rat et l'humain. Ces travaux mettent en évidence une nouvelle problématique chez les sujets urémiques. Nous devons maintenant identifier les mécanismes impliqués afin d'éventuellement développer des stratégies pour prévenir la toxicité et la morbidité chez ces patients.

Mots-clés : Barrière hématoencéphalique, biodisponibilité, cerveau, élimination biliaire, foie, Mrp, Oat, Oatp, P-gp, réabsorption tubulaire, rein, sécrétion tubulaire, transport des médicaments

Abstract

Chronic renal failure (CRF) affects 13% of the American population and its incidence is rising. Despite dose adjustment of drugs administered to CRF patients according to their glomerular filtration rate, nearly 40% of patients receive up to 6,45-times the recommended dose due to modifications in the extra-renal elimination of drugs. It is known that CRF affects the metabolic elimination of drugs via cytochrome P450s and Phase II biotransformation enzymes. Also, we showed modulations in the expression and activity of intestinal drug transporters in CRF rats that could lead to increases in the bioavailability of drugs. Drug transporters are expressed in various organs including the liver, the kidneys and the blood-brain barrier (BBB) where they play important roles in the biliary and renal elimination, and the brain penetration of drugs.

The objective of this work was to measure, using a rat model of CRF, the impacts of CRF on the protein and mRNA expression and the activity of liver, kidney and brain drug transporters. We studied ABC transporters (P-glycoprotein, multidrug-resistance related protein, breast cancer resistance protein) and solute carriers (organic anion transporters, organic anion transporting proteins). Also, a study conducted in human aimed to evaluate the pharmacokinetics of two drugs: fexofenadine, a transported drug, and midazolam, a substrate of cytochrome P450 3A4, in dialyzed patients.

In rats, our results show modulations in the expression and activity of hepatic influx and efflux drug transporters that could lead to decreases in the hepatic metabolism and biliary excretion of drugs. In the kidney, we demonstrated modulations in the expression of drug transporters in CRF rats. We also demonstrated that CRF causes a reduction of the urinary elimination of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, and the intra-renal accumulation of at least two transported drugs: benzylpenicillin and digoxin. Finally, we demonstrated decreases in the expression of influx and efflux drug transporters at the BBB of CRF rats. However, these decreases did not correlate with *in vivo* changes since BBB permeability of benzylpenicillin was decreased in CRF rats while digoxin, doxorubicin and

verapamil permeabilities were unchanged. It thus appears that, even with decreased drug transporters, BBB integrity and function is conserved in CRF.

In human, we showed an increase in the area under the curve of fexofenadine in dialyzed subjects compared to healthy controls, suggesting alterations of drug transport mechanisms in these patients. However, we observed no modifications in the pharmacokinetics of midazolam in dialyzed patients, suggesting a normal metabolic activity in these patients.

Results from in vitro studies suggest that one or many uremic factors accumulating in the serum of uremic rats and patients are responsible for the observed modulations in drug transporter expression and activity observed in rat and human. This work demonstrates the impacts of CRF on the expression and activity of drug transporters and how they could affect drug pharmacokinetics in patients. Now, the mechanisms leading to these modulations need to be identified in order to eventually develop strategies to prevent drug toxicity and morbidity in uremic patients.

Keywords : Biliary elimination, bioavailability, blood-brain barrier, brain, drug transport, kidney, liver, Mrp, Oat, Oatp, P-gp, tubular reabsorption, tubular secretion

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations et des sigles	xii
Remerciements	xvi
INTRODUCTION	1
1. L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE.....	1
2. LA CINÉTIQUE DES MÉDICAMENTS.....	3
2.1. <i>L'ABSORPTION DES MÉDICAMENTS</i>	3
2.2. <i>L'ABSORPTION DES MÉDICAMENTS EN INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE</i>	6
2.3. <i>LA DISTRIBUTION DES MÉDICAMENTS</i>	9
2.4. <i>L'ÉLIMINATION HÉPATIQUE DES MÉDICAMENTS</i>	11
2.5. <i>L'ÉLIMINATION RÉNALE DES MÉDICAMENTS</i>	15
2.6. <i>LA PÉNÉTRATION DES MÉDICAMENTS À TRAVERS LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE</i>	17
3. LES TRANSPORTEURS DE MEDICAMENTS.....	19
3.1. <i>LES « ABC-TRANSPORTERS »</i>	20
3.2. <i>LES « SOLUTE CARRIERS »</i>	39
3.3. <i>LES TRANSPORTEURS DANS LES DIFFÉRENTS ORGANES À L'ÉTUDE</i>	61
4. HYPOTHESE	65
5. OBJECTIFS	66
MÉTHODOLOGIE	68

1. LE MODÈLE DE RAT URÉMIQUE.....	68
2. MESURE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DES TRANSPORTEURS DANS LES TISSUS	68
3. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN.....	69
4. MESURE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES TRANSPORTEURS DANS LES TISSUS	69
5. MESURE, IN VIVO, DE L'ACTIVITÉ DES TRANSPORTEURS DE MÉDICAMENTS.....	70
5.1 <i>EXCRÉTION DE RHODAMINE 123</i>	70
5.2 <i>ACCUMULATION INTRARÉNALE ET INTRACÉRÉBRALE DE MÉDICAMENTS RADIOMARQUÉS.....</i>	70
6. EFFET DU SÉRUM DE RATS URÉMIQUES SUR L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS DE MÉDICAMENTS.....	71
7. EFFET DU SÉRUM DE RATS URÉMIQUES SUR L'ACTIVITÉ DE LA P-GLYCOPROTÉINE RÉNALE	72
PRÉSENTATION DES MANUSCRITS.....	74
Effects of chronic renal failure on liver drug transporters.....	75
1. ABSTRACT	78
2. INTRODUCTION.....	79
3. MATERIALS AND METHODS.....	81
4. RESULTS.....	86
5. DISCUSSION.....	88
6. REFERENCES.....	91
7. FOOTNOTES	94
8. TABLES.....	95
9. FIGURES AND LEGENDS	97
Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats.	102
1. ABSTRACT	105
2. INTRODUCTION.....	106
3. MATERIALS AND METHODS.....	108
4. RESULTS.....	114
5. DISCUSSION.....	117
6. AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS	121
7. REFERENCES.....	122
8. FOOTNOTES	127
9. TABLES.....	128

10. FIGURES AND LEGENDS	130
Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats	137
1. ABSTRACT	140
2. INTRODUCTION.....	141
3. MATERIALS AND METHODS.....	143
4. RESULTS.....	149
5. DISCUSSION.....	151
6. AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS	155
7. REFERENCES.....	156
8. FOOTNOTES	163
9. Tables	164
10. FIGURES AND LEGENDS	166
ESRD impairs nonrenal clearance of fexofenadine but not midazolam	174
1. ABSTRACT	176
2. INTRODUCTION.....	177
3. RESULTS.....	179
4. DISCUSSION.....	181
5. CONCISE METHODS	187
6. ACKNOWLEDGMENTS.....	192
7. REFERENCES.....	193
8. TABLES.....	198
9. FIGURES AND LEGENDS	200
DISCUSSION.....	206
1. LES ETUDES CHEZ LE RAT	207
<i>1.1 LES IMPACTS DE L'IRC SUR LE TRANSPORT DES MEDICAMENTS DANS LE FOIE DE RATS</i>	<i>207</i>
<i>1.2. LES IMPACTS DE L'IRC SUR LE TRANSPORT DES MEDICAMENTS DANS LE REIN DE RATS</i>	<i>213</i>
<i>1.3. LES IMPACTS DE L'IRC SUR LE TRANSPORT DES MEDICAMENTS DANS LE CERVEAU DE RATS</i>	<i>219</i>
<i>1.4. QUELS FACTEURS URÉMIQUES?</i>	<i>223</i>
2. IMPACTS DE L'IRC SUR LA PHARMACOCINÉTIQUE DES MÉDICAMENTS CHEZ L'HUMAIN	229
CONCLUSION.....	237

BIBLIOGRAPHIE242

Liste des tableaux

<i>Tableau I Les stades et la prévalence de l'IRC dans la population américaine.</i>	2
<i>Tableau II Les transporteurs ABC ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.</i>	22
<i>Tableau III Certains substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-gp.</i>	24
<i>Tableau IV Certains substrats, inhibiteurs et inducteurs des MRP ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.</i>	28
<i>Tableau V Certains substrats et inhibiteurs de BCRP.</i>	37
<i>Tableau VI Certains substrats, inhibiteurs et inducteurs des OATP ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.</i>	41
<i>Tableau VII Les transporteurs d'anions organiques ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.</i>	52
<i>Tableau VIII Nucleotide sequences of PCR primers. (DMD 2008, liver drug transporters)</i>	95
<i>Tableau IX Characteristics of control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)</i>	96
<i>Tableau X TaqMan gene expression assays used for Real-time PCR. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	128
<i>Tableau XI Characteristics of control and CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	129
<i>Tableau XII TaqMan gene expression assays used for Real-time PCR. (DMD 2012, brain drug transporters)</i>	164
<i>Tableau XIII Characteristics of control and CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)</i>	165
<i>Tableau XIV Pharmacokinetic parameter estimates of fexofenadine after oral administration of 120 mg. (JASN 2009)</i>	198
<i>Tableau XV Pharmacokinetic parameter estimates of midazolam and 1'-hydroxymidazolam after oral administration of midazolam 2 mg. (JASN 2009)</i>	199

Liste des figures

<i>Figure 1 Le métabolisme présystémique des médicaments.</i>	5
<i>Figure 2 Topologie transmembranaire type des transporteurs ABC. Exemple du transporteur ABCB1 ou P-glycoprotéine.</i>	21
<i>Figure 3 Topologie transmembranaire prédite de la «breast cancer resistance protein» (BCRP).</i>	36
<i>Figure 4 Topologie transmembranaire prédite des transporteurs OATP.</i>	40
<i>Figure 5 Topologie transmembranaire prédite des transporteurs de la famille des SLC22. Exemple type des OAT.</i>	50
<i>Figure 6 Mécanisme de transport actif tertiaire par les OAT1 et 3, exemple de la sécrétion urinaire d'anions organiques.</i>	55
<i>Figure 7 Les transporteurs de médicaments exprimés dans l'intestin.</i>	61
<i>Figure 8 Les transporteurs de médicaments exprimés dans le foie.</i>	62
<i>Figure 9 Les transporteurs de médicaments exprimés dans les reins.</i>	63
<i>Figure 10 Les transporteurs de médicaments exprimés dans le cerveau, à la barrière hématoencéphalique.</i> ..	64
<i>Figure 11 Protein expression of hepatic transporters in control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters).</i>	97
<i>Figure 12 mRNA expression of hepatic drug transporters in CTL and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters).</i>	98
<i>Figure 13 In vivo excretion of rhodamine 123 in control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)</i>	99
<i>Figure 14 P-gp, Mrp2 and Oatp2 protein expression in hepatocytes incubated with serum from control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)</i>	101
<i>Figure 15 Renal drug transporters. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	130
<i>Figure 16 Protein expression of select kidney drug transporters and cytochrome P450 in CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	131
<i>Figure 17 mRNA expression of select kidney drug transporters and cytochrome P450 in CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	133
<i>Figure 18 In vivo accumulation of radiolabeled drugs in the kidney of rats with surgically induced chronic renal failure. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	134
<i>Figure 19 Protein expression of select renal drug transporters and cytochrome P450 in HK-2 cells incubated with the serum of CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	135
<i>Figure 20 Apical to basolateral transport of rhodamine in HK-2 cells incubated with the serum of CRF or CTL rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)</i>	136
<i>Figure 21 Blood-brain-barrier drug transporters. (DMD 2012, brain drug transporters)</i>	166

<i>Figure 22 Protein expression of various brain drug transporters in CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters).....</i>	<i>168</i>
<i>Figure 23 mRNA expression of various brain drug transporters in CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters).....</i>	<i>170</i>
<i>Figure 24 In vivo accumulation of radiolabeled drugs in the brain of rats with surgically-induced chronic renal failure. (DMD 2012, brain drug transporters)</i>	<i>171</i>
<i>Figure 25 Protein expression of various drug transporters in rat brain endothelial (RBEC) cells incubated with the serum of CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)</i>	<i>172</i>
<i>Figure 26 Protein expression of various drug transporters in astrocytes incubated with the serum of CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)</i>	<i>173</i>
<i>Figure 27 OATP, P-gp, and CYP3A interplay in the disposition of drugs.....</i>	<i>200</i>
<i>Figure 28 Effect of ESRD on the pharmacokinetics of fexofenadine. (JASN 2009)</i>	<i>202</i>
<i>Figure 29 Effect of ESRD on the pharmacokinetics of midazolam and 1`-hydroxymidazolam (JASN 2009) .</i>	<i>203</i>
<i>Figure 30 Expression of Oatp, P-gp, and Cyp3a in rat hepatocytes and enterocytes incubated with serum from patients with ESRD (JASN 2009).....</i>	<i>204</i>
<i>Figure 31 Les impacts de l'insuffisance rénale chronique sur la pharmacocinétique des médicaments</i>	<i>238</i>

Liste des abréviations et des sigles

- λ_z : constante d'élimination
- ^{14}C : carbone 14
- ^3H : tritium
- ABC : ATP-binding cassette
- ATP : adénosine triphosphate
- AH : acide hippurique
- AMPc : adénosine 3', 5'— monophosphate
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ATP : adénosine triphosphate
- AUC : *area under the curve*
- $\text{AUC}_{0 \text{ to } 12}$: *area under the curve from time 0 to 12 hours*
- $\text{AUC}_{0 \text{ to } \infty}$: *area under the curve from time 0 to infinity*
- BBB : *blood-brain barrier*
- Bcrp : *breast cancer resistance protein*
- BHE : barrière hématoencéphalique
- BMI : *body mass index*
- BUN : *blood urea nitrogen*
- C_{12} : concentration plasmatique 12 heures post-administration
- C_b : concentration biliaire
- C_{max} : concentration plasmatique maximale
- $\text{C}_{\text{p,ss}}$: concentration plasmatique à l'état d'équilibre
- C_u : concentration urinaire
- CAR : *constitutive androstane-receptor*
- CKD : *chronic kidney disease*
- CL/F : *clearance after oral administration of a drug*
- CL : clairance
- CL_b : clairance biliaire
- CL_{NR} : clairance non rénale
- CL_o : clairance après l'administration orale d'un médicament

CL_u : clairance urinaire
CMPF : acide 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoïque
CRF : *chronic renal failure*
CTL : contrôle
CYP : cytochrome P450
DPDPE : D-pénicillamine (2, 5)— enképhaline
EHBR : rat Eisai hyperbilirubinémique
ErBT : *erythromycin breath test* (test d'exhalation à l'érythromycine)
ESRD : *end-stage renal disease*
F : biodisponibilité
GMPc : guanosine 3', 5' — monophosphate
GFR : *glomerular filtration rate*
HK-2 : *Human Kidney-2* (lignée cellulaire)
HPLC : *high pressure liquid chromatography*
IL-1 β : interleukine-1 β
IL-6 : interleukine-6
IRC : insuffisance rénale chronique
IS : indoxyl sulfate
LPS : lipopolysaccharide (endotoxine)
Mdr : *multidrug resistance*
Mrp : *multidrug-resistance related protein*
NAT : N-acétyltransférase
NBD : *nucleotide binding domain*
Npt1 : *type 1 sodium-dependent phosphate transporter*
NS : non significatif
Oat : *organic anion transporter*
Oatp : *organic anion transporting polypeptide*
Oct : *organic cation transporter*
Octn : *novel organic cation transporter*
P450 : cytochrome P450
P_{app} : perméabilité apparente

P-gp : P-glycoprotéine
PABA : acide para-aminobenzoïque
PAH : acide para-aminohippurique
PBS : *phosphate buffered saline*
PCR : réaction de polymérase en chaîne
PhIP : 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4-5-b]pyridine
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PMSF : phénylméthylsulfonylfluoride
PTH : hormone parathyroïdienne
PXR : *pregnane-X-receptor*
qPCR : réaction de polymérase en chaîne quantitative
RBEC : *rat brain endothelial cells* (cellules endothéliales de cerveau de rat)
Rho-123 : rhodamine 123
 S_{CR} : créatinine sérique
SD : écart-type
Slc : *solute carrier*
SSC : surface sous la courbe
 SSC_{0-12} : surface sous la courbe de temps 0 à temps 12 h
 $SSC_{0-\infty}$: surface sous la courbe de temps 0 à l'infini
t : temps
 $t_{1/2}$: temps de demie-vie
 t_{max} : temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale
TMD : domaine transmembranaire
TFG : taux de filtration glomérulaire
TNF - α : facteur de nécrose tumorale α
TR- : rat Groninger Yellow/*transporter deficient*
UGT : uridine diphosphate-glucuronosyl transférase
Urat1 : transporteur d'urate 1
 V_b : volume biliaire
 V_d : volume de distribution

V_u : volume urinaire

VDR : *vitamin-D-receptor*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Merci à Dr Vincent Pichette de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir offert un projet aussi intéressant, d'avoir cru en moi et de m'avoir apporté un soutien constant tout au long de mes études.

Merci à Dr Thomas D Nolin de m'avoir invitée à participer à son étude sur la pharmacocinétique des médicaments chez les patients dialysés. Ce fut une occasion incroyable de transposer mon travail chez les animaux à la réalité humaine.

Merci à tous les coauteurs des articles présentés dans cette thèse. Chacun de vous avez apporté votre grain de sel à ce travail. Votre aide, vos commentaires et suggestions ont été grandement appréciés.

Merci à Dr Francois Leblond pour sa générosité dans le soutien technique et intellectuel qu'il m'a apporté de même que pour son incroyable expertise dans d'innombrables domaines.

Merci à tous les étudiants, stagiaires et membres du laboratoire de Vincent Pichette que j'ai côtoyés dans les dernières années. Votre aide technique et morale a été cruciale à la réussite de ce projet. Vous m'avez tous apporté beaucoup.

Merci à Julie Dubeau et au personnel de l'animalerie de l'HMR, car ils ont été indispensables à la réussite de ce projet.

Merci à Stéphanie Leblond pour la préparation des figures représentant les transporteurs de médicaments dans les différents organes. On n'a pas tous ton talent!

Merci à toute ma famille, particulièrement mes parents et mes sœurs. Ils ont été un soutien incroyable et m'ont encouragée tout au long de mon parcours. Merci aussi d'avoir parfait vos connaissances en pharmacologie en acceptant de relire et corriger ma thèse. Je vous aime tous.

Merci à mes amis, particulièrement Val, CB et Christian, vous m'avez encouragée et permis de ventiler mon stress. J'adore passer du temps en votre compagnie. Je vous aime tous.

Merci à Novalie, Myriam, Marina, Laurianne, Chloé et les autres. Votre amour, vos sourires et votre curiosité face au monde qui nous entoure illuminent mes journées comme personne d'autre ne peut le faire. Vous êtes mes amours et je vous adore.

Un merci particulier à Dr Martin Sirois, Dr Éric Thorin, Dr Paul Isenring et Dr Édouard Kouassi pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de cette thèse de doctorat.

Finalement, je remercie les Fonds de recherche en santé du Québec, Letko & Brosseau Inc., la fondation J.A. De Sève et la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal pour le soutien financier qu'ils m'ont accordé.

Introduction

1. L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est caractérisée par une perte de néphrons fonctionnels entraînant une diminution de la filtration glomérulaire et de la sécrétion tubulaire. Les causes sont multiples, les plus courantes étant : le diabète, l'hypertension, les maladies rénales ischémiques et les glomérulonéphrites^{1,2}. L'incidence de l'IRC augmente régulièrement depuis les dernières décennies. En effet, au Canada en 2009, on dénotait 37 744 patients traités en dialyse, le stade terminal de l'IRC, une augmentation de plus de 300 % par rapport à 1990 alors que seulement 11 042 Canadiens souffraient d'insuffisance rénale terminale³. De plus, depuis 1990, le taux de prévalence des patients en dialyse est passé de 211,6 par million d'habitants à 661,2 par million d'habitants, une augmentation de 212 %³. Aux États-Unis, l'incidence et la prévalence de tous les stades de l'IRC ne cessent d'augmenter atteignant, en 2000, environ 26 millions d'adultes américains, soit environ 13 % de la population américaine, comparativement à 10 % en 1994, incluant près de 50 % des adultes de plus de 70 ans⁴. Une prévalence semblable a été rapportée en Chine et en Australie où 13 et 16 % de la population, respectivement, sont atteints d'IRC aux différents stades⁵. La hausse de la prévalence de l'IRC a été associée à la hausse de la prévalence du diabète, de l'hypertension artérielle et de l'obésité, les plus grands facteurs de risque de l'IRC^{2,4}.

L'IRC est séparée en 5 stades selon le taux de filtration glomérulaire (TFG) du patient. Les stades 1 et 2 sont caractérisés par la présence d'un dommage rénal sans modification du taux de filtration glomérulaire ou avec une légère diminution. Des complications de l'IRC commencent à apparaître au stade 3 alors que le patient présente un TFG inférieur à 60 mL/min/1,73m² pendant une période d'au moins 3 mois. Au stade terminal (stade 5), le patient présente un TFG inférieur à 15 ml/min/1,73 m² et doit avoir recours à la dialyse^{1,2,6,7}. Seule une greffe rénale peut guérir l'IRC⁷. Les différents stades sont présentés dans le tableau I de même que leur prévalence dans la population américaine selon des articles de Levey *et al.* en 2002 et 2009^{1,2}

Tableau I Les stades et la prévalence de l'IRC dans la population américaine.

Stade d'IRC ou antécédents	Description	Taux de filtration glomérulaire (TFG) (mL/min/1.73m ²)	Prévalence N [milliers] (%)	Termes cliniques	Plan d'action clinique
Antécédents	À risque élevé <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 60 ans • Hypertension • Diabète • Maladie cardiovasculaire 	N/A	50 600 (23,2) 65 000 (32,3) 20 600 (9,6) 71 300 (34,2)	Facteurs de risque de l'IRC	Traitement des facteurs de risque et éducation et sensibilisation des patients
Stade 1	Dommage rénal avec TFG normal ou élevé	≥90	3 600 (1,78)	Albuminurie, protéinurie, hématurie	Traitement des facteurs de risque et éducation et sensibilisation des patients
Stade 2	Dommage rénal et TFG un peu diminué	60-89	6 500 (3,24)	Albuminurie, protéinurie, hématurie	Estimation de la progression
Stade 3	TFG modérément diminué	30-59	15 000 (7,69)	IRC modérée	Traitement des complications
Stade 4	TFG sévèrement diminué	15-29	700 (0,35)	IRC sévère	Préparation à la dialyse et à la greffe rénale
Stade 5	Défaillance rénale	<15	400 (0,20)	Urémie, IRC terminale	Dialyse et greffe rénale

Bien sûr, la conséquence directe et attendue de l'IRC sur la pharmacocinétique des médicaments est une diminution de la clairance rénale due à une diminution du TFG. C'est pourquoi les doses de médicaments administrés sont depuis plusieurs décennies ajustées en fonction du TFG du patient⁸. Malgré tout, les patients souffrant d'IRC sont plus à risque de subir des effets indésirables ou de la toxicité, incluant de la néphrotoxicité, comparativement à des patients ayant une fonction rénale normale⁹⁻¹². En effet, une étude a démontré que 40 % des patients avec une clairance de créatinine de moins de 40 mL/min, soit aux troisième, quatrième et cinquième stades de l'IRC, recevaient une dose trop élevée de médicaments (1,07 à 6,45 fois la dose recommandée) malgré un ajustement de la dose en fonction du taux de filtration glomérulaire du patient^{13, 14}. Dans un contexte où les patients au stade 5 de l'IRC prennent en moyenne 11 médicaments différents chaque jour pour traiter les causes de l'IRC ainsi que les états pathologiques qui en découlent comme l'hyperparathyroïdie ou l'anémie⁷, un dosage approprié des médicaments est essentiel pour

éviter l'apparition d'effets indésirables, pour minimiser le temps et les coûts associés au traitement des patients souffrant de ces effets et pour assurer le bien-être des patients. Il est donc important de bien comprendre comment l'IRC affecte la pharmacocinétique des médicaments.

Les impacts de l'IRC sur la pharmacocinétique des médicaments sont présentés dans la section 2. Le transport des médicaments est directement impliqué dans ces processus pharmacologiques. Les différentes familles de transporteurs sont présentées de façon exhaustive dans la section 3.

2. LA CINÉTIQUE DES MÉDICAMENTS

La pharmacocinétique d'un médicament comprend son absorption, sa distribution et son élimination. Il a été démontré que l'IRC affecte chacune de ces étapes compromettant ainsi l'administration des médicaments^{7, 8, 14-24}. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs études ont démontré que l'IRC affecte non seulement l'élimination rénale des médicaments, mais aussi leur absorption, leur distribution ainsi que leur élimination non rénale. Chaque étape est présentée en détail ci-dessous.

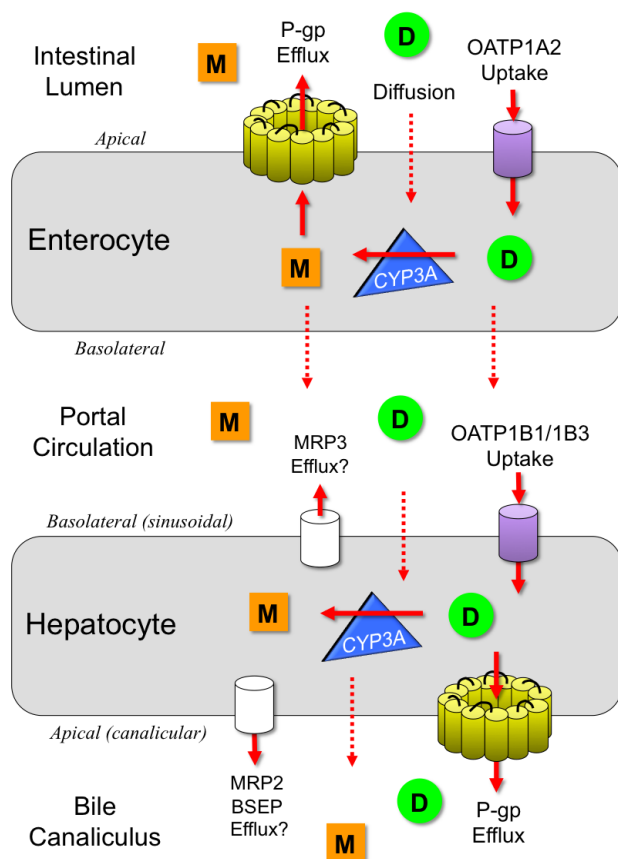
2.1. L'ABSORPTION DES MÉDICAMENTS

L'absorption d'un médicament est une étape clé de sa pharmacocinétique, car elle influence directement sa biodisponibilité (F). La biodisponibilité d'un médicament correspond à la proportion d'une dose donnée qui atteint la circulation sanguine systémique et elle dépend de plusieurs facteurs. Dans le cas d'un médicament administré par voie orale, les propriétés physico-chimiques du médicament telles que son poids moléculaire, son pKa, sa lipophilicité et son hydrosolubilité sont très importantes de même que la physiologie du tractus gastro-intestinal soit le pH, le transit, la vidange gastrique et l'interaction des médicaments avec divers aliments²⁵. Les deux autres facteurs majeurs pouvant influencer la biodisponibilité d'un médicament administré par voie orale sont son métabolisme présystémique et son transport actif²⁶⁻²⁹.

Lors de leur arrivée dans le tractus gastro-intestinal, pour être absorbés, les médicaments doivent pénétrer à l'intérieur des entérocytes par diffusion passive ou encore par transport actif par des transporteurs d'influx (p.ex. organic anion transporting polypeptide [OATP]). Une fois dans les entérocytes, les médicaments peuvent être biotransformés par les enzymes intestinales du cytochrome P450 (CYP), particulièrement le CYP3A. La molécule mère (ou son métabolite) peut ensuite être A) rejetée dans la lumière intestinale par transport actif par des transporteurs d'efflux (p.ex. P-glycoprotéine [P-gp], multidrug resistance-related protein 2 [MRP2]) et réintégrer le cycle en pénétrant de nouveau dans les entérocytes par diffusion passive ou transport actif ou B) transférée dans la veine porte par diffusion passive ou par transport actif par des transporteurs d'efflux (p.ex. MRP3). La circulation portale dirige ainsi les médicaments au foie où ils peuvent diffuser librement ou être transportés activement dans les hépatocytes par des transporteurs tels que les OATP, puis être biotransformés par les CYP ou les enzymes du métabolisme de phase II. La molécule mère (ou son métabolite) peut ensuite être excrétée dans la bile par transport actif (P-gp, MRP), ce qui la rend disponible à une réabsorption intestinale (ceci correspond au cycle entéro-hépatique), ou atteindre la circulation sanguine systémique par diffusion passive ou transport actif hors de l'hépatocyte (MRP)^{24, 30}. Toutes ces étapes correspondent au métabolisme présystémique (ou de premier passage) des médicaments et sont schématisées dans la Figure 1 où le médicament est représenté par un D dans un cercle et son métabolite est représenté par un M dans un carré orange.

La biodisponibilité d'un médicament correspond à la quantité d'une dose donnée atteignant (intacte) la circulation sanguine systémique après avoir franchi toutes ces étapes. Il est donc évident que toute modification de l'expression et de l'activité des enzymes de biotransformation intestinales et des transporteurs intestinaux de médicaments par l'insuffisance rénale chronique pourra affecter la biodisponibilité des médicaments.

Figure 1 Le métabolisme présystémique des médicaments.



2.1.1 LA BIOTRANSFORMATION INTESTINALE

Il existe deux mécanismes principaux de biotransformation : les mécanismes de phase I et de phase II. La phase I consiste en une réaction d'oxydoréduction entre les médicaments et les enzymes du cytochrome P450 afin d'augmenter leur hydrosolubilité et, ainsi, permettre leur élimination rénale ou biliaire. L'oxydation par le CYP peut aussi servir d'étape préparatoire à la conjugaison avec de grosses protéines hydrosolubles, toujours dans le but de faciliter l'excrétion des médicaments liposolubles. Il s'agit du mécanisme de phase II où les principales réactions sont la glucuronidation, la sulfatation, l'acétylation, la méthylation et la conjugaison au glutathion.

Le système de biotransformation prédominant dans l'intestin est le CYP que l'on retrouve dans le réticulum endoplasmique des entérocytes^{28, 31, 32}. Le CYP intestinal est le premier site de biotransformation pour les médicaments administrés par voie orale. En effet, il est impliqué dans le métabolisme présystémique, c'est-à-dire la biotransformation d'une fraction des doses administrées avant leur entrée dans la circulation systémique²⁷. Chez l'humain, l'isoforme 3A du CYP est la plus abondante et représente environ 80 % du CYP total de l'intestin³³. Cette isoforme est aussi celle ayant le plus vaste spectre de substrats. En effet, elle participe à la biotransformation de près de 60 % des médicaments biotransformés par les CYP. Parmi ses substrats, on compte l'érythromycine, le midazolam, la nifédipine et la cyclosporine³⁴. Le CYP2C9 représente environ 14 % du CYP intestinal total³³. Ses substrats comptent le tolbutamide, la phénytoïne et la warfarine³⁴. Plusieurs autres CYP sont exprimés dans l'intestin. Parmi eux, on retrouve le CYP1A, le CYP2C19 et le CYP2D6, mais leur niveau d'expression est faible et ils représentent chacun moins de 2 % du CYP intestinal total^{33, 35, 36}.

Toutes modifications du CYP450 intestinal pourraient aussi avoir d'importantes répercussions sur la biodisponibilité des médicaments par diminution de leur biotransformation dans l'étape intestinale du métabolisme de premier passage²⁷.

2.2. L'ABSORPTION DES MÉDICAMENTS EN INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE

Au début de mes études de doctorat, aucune étude *in vivo* chez l'humain n'avait démontré les répercussions de l'IRC sur le métabolisme de premier passage intestinal des médicaments. Toutefois, il avait déjà été démontré que la biodisponibilité de plusieurs médicaments incluant le dextropropoxyphène, la dihydrocodéine, l'érythromycine, l'oxprénolol, le propranolol, le bufuralol, plusieurs médicaments immunosuppresseurs ainsi que plusieurs inhibiteurs de protéases du VIH était augmentée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique^{11, 37-43}. Plusieurs de ces médicaments sont des substrats des CYP (p.ex. propranolol) et/ou des transporteurs de médicaments intestinaux (p.ex. immunosuppresseurs), et sont sujets au métabolisme de premier passage^{44, 45}. Puisque leur biodisponibilité est augmentée lors de l'IRC, il est possible que leur métabolisme intestinal

soit diminué et/ou que leur transport intestinal soit modifié par l'IRC. L'expression et l'activité des enzymes de biotransformation et des transporteurs de médicaments intestinaux en insuffisance rénale ont été évaluées à l'aide de modèles animaux. Les principales études sont présentées dans les sections suivantes.

2.2.1 LES FACTEURS PHYSIOLOGIQUES AFFECTANT L'ABSORPTION DES MÉDICAMENTS EN IRC

L'IRC affecte la physiologie du tractus gastro-intestinal de plusieurs façons. Tout d'abord, il a été rapporté que plusieurs patients souffrent d'un ralentissement de la motilité intestinale⁴⁶. Toutefois, ce ralentissement ne devrait pas affecter la biodisponibilité des médicaments puisqu'un changement de la motilité gastrique affecte le temps nécessaire pour atteindre la concentration sanguine maximale, mais pas la biodisponibilité^{21, 47, 48}. De plus, l'IRC entraîne une augmentation du pH gastrique due à un excès d'urée dans la salive qui est transformée en ammoniacque par l'uréase gastrique^{47, 49}. Le pH gastrique peut aussi être augmenté par la prise de plusieurs médicaments couramment utilisés en IRC comme les antiacides, les inhibiteurs de la pompe à protons et les inhibiteurs du récepteur H₂ de l'histamine qui réduisent la biodisponibilité des médicaments absorbés en milieu acide^{21, 47}. L'alcalinisation du tractus gastro-intestinal peut affecter l'ionisation et la dissolution des médicaments dont l'absorption est optimale dans un environnement acide, par exemple le furosémide, et en réduire la biodisponibilité^{21, 47, 48}. Au contraire, une augmentation de la biodisponibilité de certains médicaments faiblement acides comme l'ibuprofène et le tolbutamide qui sont mieux absorbés en environnement plus alcalin a été observée en IRC⁴⁷.

2.2.2 LA BIOTRANSFORMATION INTESTINALE DES MÉDICAMENTS EN IRC

Les impacts de l'IRC sur la biotransformation intestinale des médicaments par les CYP ont été étudiés au début des années 2000 dans un modèle de rats ayant subi une néphrectomie 5/6 qui consiste à retirer chirurgicalement les 2/3 d'un rein et à retirer l'autre rein entier une semaine plus tard. Chez ces rats, le CYP intestinal total était réduit de 30 % comparativement aux rats témoins⁵⁰. Plus spécifiquement, les auteurs ont rapporté que l'expression protéique des Cyp1a et Cyp3a intestinaux était diminuée de 43 % et 71 %, respectivement.

respectivement⁵⁰. Ces diminutions étaient associées à une diminution de plus de 30 % de l'ARNm de chacune des 2 isoformes⁵⁰. Finalement, les tests d'activité *in vitro* mesurant la O-dééthylation de l'éthoxyrésorufine et la N-déméthylation de l'érythromycine dans des microsomes intestinaux ont démontré une baisse d'au moins 25 % de l'activité métabolique des Cyp1a et Cyp3a⁵⁰. Il a donc été suggéré que ces changements de l'expression et de l'activité des CYP intestinaux pouvaient expliquer l'augmentation de la biodisponibilité de plusieurs médicaments en IRC^{20, 50}. Toutefois, un autre groupe étudiant les effets de l'insuffisance rénale aiguë induite par le cisplatine chez des rats a démontré que la biodisponibilité du tacrolimus (un substrat du Cyp3a) était augmentée de 35 % chez ces animaux sans qu'il y ait de changement de la biotransformation du tacrolimus par le Cyp3a^{42, 51}. Selon les auteurs, l'augmentation de la biodisponibilité du tacrolimus était plutôt due à une augmentation de la quantité absorbée de tacrolimus⁵¹.

2.2.3 LE TRANSPORT INTESTINAL DES MÉDICAMENTS EN IRC

L'étude des effets de l'insuffisance rénale sur le transport intestinal des médicaments a commencé au début des années 2000. Les premières études ont démontré *in vitro*, puis *in vivo*, une diminution de l'activité de la P-gp, sans diminution de son expression protéique, dans une monocouche de cellules Caco-2 incubées avec du sérum de rats souffrant d'insuffisance rénale aiguë et dans l'intestin de rats souffrant d'insuffisance rénale aiguë induite par le glycérol^{52, 53}. Veau *et al.* ont obtenu des résultats similaires chez des rats souffrant d'IRC induite par néphrectomie 5/6 chez lesquels ils ont démontré *ex vivo* une diminution de l'activité de la P-gp, mais pas de son expression protéique ou génique intestinale⁵⁴. Plus tard, nous avons confirmé la réduction de l'activité de la P-gp intestinale en IRC⁵⁵. Toutefois, nous avons aussi observé une diminution de l'expression protéique des transporteurs d'efflux P-gp, Mrp2 et Mrp3, sans modification de leur expression génique, dans l'intestin de rats néphrectomisés⁵⁵. L'expression des transporteurs d'influx Oatp2 et Oatp3 n'était toutefois pas affectée par l'IRC⁵⁵. Ces résultats ont aussi été confirmés *in vitro* en incubant des entérocytes de rats ainsi que des cellules Caco-2 avec du sérum provenant des rats souffrant d'IRC⁵⁵. Une diminution de l'activité de la P-gp en IRC pourrait expliquer

l'augmentation de la quantité absorbée et de la biodisponibilité du tacrolimus décrite ci-dessus puisque le tacrolimus est un substrat de la P-gp⁵¹.

Les résultats d'études *in vitro* et dans des modèles animaux démontrent donc que des diminutions de l'expression et de l'activité des CYP et des transporteurs de médicaments intestinaux causées par l'IRC pourraient entraîner une augmentation de la biodisponibilité de médicaments administrés par voie orale chez des patients souffrant d'insuffisance rénale.

2.3. LA DISTRIBUTION DES MÉDICAMENTS

Le volume de distribution (V_d) d'un médicament est aussi très important pour déterminer la dose qui doit être administrée. Il permet de déterminer la capacité d'un médicament à pénétrer dans les différents organes. Le V_d , de façon abstraite, représente le volume fictif de liquide ou de tissus nécessaire pour obtenir une concentration de médicament égale à celle retrouvée dans le sang pour une dose donnée^{7, 18}. Le V_d dépend de la liaison du médicament aux protéines tissulaires et de la liaison aux protéines plasmatiques. En effet, un haut taux de liaison aux protéines tissulaires a pour effet d'abaisser les concentrations plasmatiques des médicaments et d'augmenter le V_d , alors qu'un haut taux de liaison aux protéines plasmatiques a pour effet d'augmenter les concentrations plasmatiques de médicaments et de faire paraître le V_d plus petit. C'est toutefois seulement la fraction libre d'un médicament, c'est-à-dire la portion de médicament non liée aux protéines plasmatiques et tissulaires, qui peut passer au travers des membranes cellulaires et produire l'effet recherché. Aussi, seule la fraction libre peut être extraite du sang par le foie et/ou les reins et être biotransformée et/ou excrétée dans l'urine ou la bile. Un changement physiopathologique qui entraînerait une augmentation ou une réduction de la fraction libre et pourrait causer de la toxicité ou une perte d'efficacité, surtout pour des médicaments à faible indice thérapeutique.

2.3.1 LA DISTRIBUTION DES MÉDICAMENTS EN IRC

Il a été démontré que l'IRC affecte la liaison aux protéines plasmatiques de plusieurs médicaments^{18, 46, 56}. Les médicaments acides, par exemple la pénicilline, le furosémide, les barbituriques, les sulphonamides et la phénytoïne, sont surtout liés à l'albumine plasmatique⁵⁷. Les patients insuffisants rénaux souffrent d'hypoalbuminémie due à une augmentation de l'albuminurie ou à la malnutrition. De plus, l'urémie causée par l'IRC entraîne la carbamylation de l'albumine, ce qui réduit l'affinité de l'albumine pour les médicaments acides^{11, 21, 46, 47, 56, 58} et les patients prennent de nombreux médicaments pouvant compétitionner pour les sites de liaison de l'albumine avec des molécules acides organiques endogènes s'accumulant à cause de la fonction rénale réduite^{11, 21, 46, 47, 56}. Par exemple, des réductions de 16 % et 20 % de la liaison aux protéines plasmatiques de la phénytoïne et de la théophylline ont été rapportées chez des patients dialysés. Ces réductions ont été attribuées à une compétition entre les médicaments et l'acide hippurique s'accumulant en IRC pour la liaison à l'albumine plasmatique⁵⁶. Il semble donc clair que la liaison des médicaments acides à l'albumine peut être réduite en IRC.

Toutefois, les médicaments basiques (alcalins), par exemple le propranolol, la morphine et la vancomycine, se lient surtout à l' α 1-glycoprotéine, dont les concentrations plasmatiques sont élevées chez les patients souffrant de maladie rénale^{21, 47}. Bien qu'une augmentation de la liaison aux protéines plasmatiques de médicaments basiques (propranolol, cimétidine, clonidine, imipramine) ait été rapportée *in vitro* dans du sérum de patients dialysés⁵⁹, la liaison aux protéines plasmatiques des médicaments basiques ne semble pas être modifiée *in vivo* chez les patients souffrant d'IRC^{18, 21}.

Il ne faut pas oublier qu'une réduction de la liaison aux protéines plasmatiques d'un médicament entraîne une augmentation de sa concentration libre et peut entraîner une augmentation de son efficacité thérapeutique ou de la toxicité. Toutefois, la fraction ainsi libérée du médicament devient disponible pour la liaison aux protéines tissulaires. Ceci aurait pour effet d'augmenter le V_d du médicament. La fraction libérée serait aussi disponible pour l'extraction rénale ou hépatique, ce qui aurait pour effet d'augmenter la

clairance du médicament. Une diminution de la liaison aux protéines plasmatiques aurait donc théoriquement peu d'impact sur l'exposition aux médicaments²¹. La clairance de nombreux médicaments est réduite en IRC, l'élimination de la nouvelle fraction libre du médicament ne peut donc pas nécessairement contrebalancer l'augmentation de la fraction libre et empêcher l'apparition de toxicité. Par exemple, la fraction libre du cérvastatin est augmentée chez les patients insuffisants rénaux et on observe aussi une forte augmentation de sa surface sous la courbe qui est plus que doublée chez ces patients comparativement aux témoins⁶⁰. Cette augmentation de l'exposition au cérvastatin en IRC a été attribuée à une diminution de clairance hépatique due à une diminution de l'entrée du cérvastatin dans les hépatocytes par les OATP, l'étape limitante de l'élimination de plusieurs statines^{61, 62}.

2.4. L'ÉLIMINATION HÉPATIQUE DES MÉDICAMENTS

L'élimination hépatique d'un médicament peut se diviser en trois étapes. Tout d'abord, le médicament doit être importé dans les hépatocytes par diffusion passive ou par transport actif par des transporteurs d'influx tel que l'OATP. Le médicament peut ensuite être biotransformé par les enzymes de phase I et de phase II hépatiques. Finalement, le médicament, biotransformé ou non, peut être rejeté dans la bile par des transporteurs d'efflux tels que la P-gp ou les MRP. Les médicaments biotransformés peuvent aussi être retournés dans la circulation systémique et éliminés par les reins. Comme mentionné précédemment, il est connu, que l'IRC peut affecter la biotransformation et le transport intestinal des médicaments, au moins dans des modèles animaux, il est donc tout à fait possible que ces processus soient aussi modifiés dans le foie en IRC.

2.4.1 LA BIOTRANSFORMATION HÉPATIQUE DES MÉDICAMENTS EN IRC

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

clairances biliaire et métabolique du repaglinide chez les patients souffrant d'IRC²¹. De plus, une étude *in vivo* portant sur le métabolisme de l'érythromycine, mesuré par test d'exhalation, a permis de démontrer une diminution de 28 % de sa biotransformation dans des cas de maladies rénales au stade terminal⁶³. Le test d'exhalation de l'érythromycine consiste à administrer, par voie intraveineuse, de la N-méthyl-érythromycine marquée au carbone 14 (¹⁴C) sur son groupement méthyle. La biotransformation de l'érythromycine par le CYP3A4 entraîne la libération du groupement méthyle. On retrouve le ¹⁴C ainsi libéré dans le CO₂ expiré par le patient. Il a été démontré que la quantité de ¹⁴C expiré est directement proportionnelle à l'activité du CYP3A4⁶⁴. Les résultats de Dowling *et al.* suggèrent donc une réduction de 28 % de l'activité du CYP3A4 chez les patients atteints de maladies rénales au stade terminal, cette isoforme étant responsable du métabolisme de la majorité des xénobiotiques chez l'humain⁶³.

Des observations semblables ont été rapportées pour les réactions de phase II. Par exemple, la diacéréine, un anti-inflammatoire non stéroïdien majoritairement métabolisé par le foie par deux réactions de phase II, *c.-à-d.* 60 % de chaque dose administrée est glucuronidé, 20 % est sulfaté alors que seulement 20 % est éliminé inchangé par les reins, voit sa pharmacocinétique affectée par l'IRC⁶⁵. En effet, une étude de Debord *et al.* (1994)⁶⁶ démontre que le métabolisme non rénal de la diacéréine est diminué de 40 % chez les patients souffrant d'IRC sévère. La diminution du métabolisme non rénal de la diacéréine observée est assez importante pour que l'auteur recommande une diminution de 50 % de la dose administrée chez un patient souffrant d'IRC par rapport à un patient en santé⁶⁶. D'autres études ont aussi démontré que la glucuronidation de la morphine et de la zidovudine était aussi diminuée en IRC. En effet, un groupe a observé une clairance métabolique réduite de la morphine chez des patients avec insuffisance rénale sévère ou dialysés⁶⁷ et un autre groupe a rapporté une clairance non rénale de la zidovudine diminuée de 48 % chez des sujets souffrant d'insuffisance rénale sévère⁶⁸. De plus, plusieurs études ont démontré que l'acétylation était réduite chez les patients ayant une fonction rénale réduite comme démontré par la diminution de la clairance non rénale du procaïnamide⁶⁹⁻⁷¹ et de l'isoniazide⁷². La clairance de l'isoniazide est normalisée après une greffe rénale⁷².

De nombreuses études dans des modèles animaux ont tenté de démontrer les effets de l'IRC sur la biotransformation hépatique des médicaments. La plupart des groupes se sont concentrés sur le Cyp3a puisqu'il est le plus abondant dans le foie et puisqu'il est le CYP le plus impliqué dans le métabolisme des médicaments actuellement sur le marché^{34, 73, 74}. Plusieurs groupes ont démontré d'importantes réductions de l'expression et de l'activité *in vivo* et *in vitro* des Cyp2c11, Cyp3a1 et Cyp3a2 dans le foie de rats néphrectomisés⁷⁵⁻⁷⁹ résultant d'une diminution de l'expression génique des différentes enzymes en réponse à des facteurs urémiques présents dans le sérum de rats néphrectomisés et de patients souffrant d'insuffisance rénale terminale^{75, 80, 81}. De plus, l'hémodialyse semble pouvoir retirer les facteurs responsables de ces diminutions puisque le sérum de patients souffrant d'insuffisance rénale terminale prélevé immédiatement après l'hémodialyse n'a pas d'effet modulateur sur l'expression du CYP dans des hépatocytes de rats⁷⁷.

Quelques groupes ont étudié les impacts de l'IRC sur le métabolisme de phase II hépatique dans des modèles animaux. L'expression et l'activité des enzymes catalysant la glucuronidation, les uridines diphosphate-glucuronosyl transférases (UGT), et les enzymes catalysant l'acétylation, les N-acétyltransférases (NAT), ont été mesurées dans le foie de rats IRC. Alors que les UGT ne sont pas affectées par l'IRC dans un modèle de rat⁸², des réductions de plus de 30 % des expressions protéiques et géniques de Nat1 et Nat2 ont été rapportées dans le foie de rats néphrectomisés⁸³. De plus, la N-acétylation de l'acide *para*-aminobenzoïque (PABA) par Nat2, mesurée *in vitro* dans des cytosols de foie de rat, était réduite de 50 % chez ces mêmes rats⁸³. Encore une fois, l'incubation d'hépatocytes de rats avec du sérum d'animaux néphrectomisés pouvait entraîner la diminution de l'expression protéique des NAT⁸³. Ceci suggère que des facteurs urémiques présents dans le sérum d'animaux néphrectomisés causent les changements de l'expression des NAT.

Plusieurs facteurs urémiques pourraient être impliqués dans la diminution de l'expression et de l'activité des CYP et des NAT. Un de ceux-ci est l'hormone parathyroïdienne (PTH) dont les concentrations plasmatiques sont fortement augmentées en IRC à cause d'une hyperparathyroïdie secondaire⁸⁴. En effet, la PTH peut moduler

l'expression du Cyp3a dans des hépatocytes de rat de façon dose-dépendante. De plus, chez des rats ayant subi une parathyroïdectomie (ablation des glandes parathyroïdes) avant l'induction de l'insuffisance rénale, la diminution de l'expression et de l'activité du Cyp3a et des NAT est moindre que chez des animaux souffrant seulement d'IRC^{83, 84}. Ceci indique que la parathyroïdectomie semble prévenir la diminution de l'expression et de l'activité du Cyp3a et des NAT chez le rat néphrectomisé suggérant l'implication de la PTH dans ces diminutions^{83, 84}.

D'autres facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires qui sont fortement augmentées en IRC⁸⁵⁻⁸⁸ et capables de moduler l'expression du CYP hépatique⁸⁹, de même que des toxines urémiques telles que l'indoxyl sulfate (IS) et l'acide 3-carboxy-4-méthyl-5-propyl-2-furan-propanoïque (CMPF) pourrait aussi être impliquées dans la réduction de l'activité des CYP en IRC. En effet, l'IS peut inhiber la biotransformation du losartan par les Cyp2c et Cyp3a dans des microsomes de foie de rat de façon non compétitive⁹⁰. De plus, il a été démontré que l'IS et le CMPF peuvent, à de fortes concentrations, directement inhiber l'activité du Cyp3a dans des microsomes de foie de rat tel que mesuré par la N-déméthylation de l'érythromycine⁹¹.

2.4.2 LE TRANSPORT HÉPATIQUE DES MÉDICAMENTS EN IRC

Dans le foie, des transporteurs d'influx et d'efflux permettent aux médicaments de traverser les membranes plasmiques. Les transporteurs d'influx, situés sur la membrane basolatérale des hépatocytes, extraient leurs substrats de la circulation sanguine et les transportent jusqu'à l'intérieur des cellules hépatiques. Les médicaments sont ainsi accessibles aux enzymes de biotransformation hépatiques et aux transporteurs d'extrusion situés sur la membrane apicale des hépatocytes qui les rejettent dans la bile. Les principaux transporteurs d'influx hépatiques sont les OATP, les *organic anion transporters* (OAT) et les *organic cation transporters* (OCT). Parmi les transporteurs d'extrusion, les plus importants sont la P-gp, les MRP et la *breast cancer resistance protein* (BCRP). La P-gp et MRP2 sont toutefois les transporteurs d'efflux les plus impliqués dans l'élimination des médicaments⁹²⁻

Avant le début de mon doctorat, très peu d'études avaient évalué les répercussions de l'IRC sur le transport hépatique des médicaments. Un groupe avait rapporté que les expressions protéique et génique de Mrp2 étaient augmentées six semaines post-néphrectomie. Le même groupe n'avait toutefois pas observé de modification de la P-gp dans le foie des mêmes animaux comparativement aux témoins⁹⁵. Toutefois, les auteurs n'avaient pas mesuré l'expression et l'activité des transporteurs d'influx en IRC⁹⁵. L'activité de ces transporteurs en IRC avait été étudiée indirectement dans une étude de Sun *et al.* portant sur les effets de différentes toxines urémiques sur l'import de l'érythromycine dans des hépatocytes de rat⁹¹. Ils ont ainsi démontré que le CMPF peut directement inhiber l'import de l'érythromycine dans l'hépatocyte par Oatp2 ce qui suggérait que l'activité de l'Oatp2 hépatique pouvait être diminuée en IRC, bien qu'aucune étude *in vivo* ne l'ait confirmé⁹¹.

Une telle diminution de l'activité de l'Oatp2 hépatique en IRC laissait supposer que des diminutions du transport et de la biotransformation hépatique des médicaments sont responsables de la clairance hépatique réduite de certains médicaments en IRC⁹¹. Toutefois, plus d'études étaient nécessaires pour bien identifier les impacts de l'IRC sur le transport hépatique des médicaments.

2.5. L'ÉLIMINATION RÉNALE DES MÉDICAMENTS

L'élimination rénale des médicaments ne dépend pas seulement de leur filtration glomérulaire. En effet, la clairance rénale dépend aussi de la sécrétion tubulaire et de la réabsorption tubulaire des médicaments. La sécrétion et la réabsorption tubulaires sont toutes deux régulées par les transporteurs d'influx et d'efflux exprimés dans les cellules tubulaires rénales⁹⁶⁻¹⁰³. Parmi les transporteurs exprimés dans les cellules tubulaires rénales, on retrouve la P-gp et les MRP2, 3 et 4. La majorité sont exprimés à la membrane apicale des cellules tubulaires proximales (P-gp, MRP2, MRP4) et rejettent les substrats transportés dans l'urine. MRP3 est plutôt exprimée à la membrane basolatérale des cellules tubulaires distales et participe à la réabsorption de ses substrats de l'urine. On retrouve aussi le *type 1 sodium-dependent phosphate transporter* (NPT1), les OAT1, 2 et 3, les OATK1/K2,

les OATP1, 2, 3 et 4C1 et le transporteur d'urate URAT1. La plupart de ces transporteurs sont des transporteurs d'influx situés à la membrane basolatérale ou apicale des cellules tubulaires proximales où ils participent à l'excrétion des composés du sang ou de l'urine vers les cellules tubulaires rénales^{100, 102, 104}.

2.5.1 L'ÉLIMINATION RÉNALE DES MÉDICAMENTS EN IRC

Il est bien connu que l'IRC est caractérisée par une importante diminution du taux de filtration glomérulaire affectant directement le processus d'élimination rénale de plusieurs médicaments comme la metformine, la vancomycine et l'acétazolamide^{7, 105}. Toutefois, très peu de données ont été rapportées concernant les effets de l'IRC sur la sécrétion rénale des médicaments. Quelques études cliniques ont quand même rapporté que l'élimination rénale de médicaments éliminés majoritairement par sécrétion tubulaire était réduite en IRC ce qui avait pour effet d'augmenter leur surface sous la courbe. Parmi ces médicaments, on retrouve le sitagliptin (un substrat de OAT3 et de la P-gp), l'entecavir et le gémifloxacin (des substrats potentiels des OAT et OCT^{106, 107}), la varénicline (un substrat d'OCT2) et l'emtricitabine (un substrat potentiel des OCT¹⁰⁸)¹⁰⁵. De plus, un groupe ayant mesuré l'expression de l'ARNm des transporteurs OAT1, OAT2, OAT3 et OAT4 dans le rein de sujets humains souffrant de légère dysfonction rénale ont rapporté une diminution significative de l'expression de OAT1 comparativement à des sujets témoins sains¹⁰⁹. Ces données cliniques suggèrent que la sécrétion tubulaire active et les transporteurs de médicaments rénaux sont altérés chez les patients souffrant d'insuffisance rénale.

Peu d'études dans des modèles animaux ont tenté de confirmer cette hypothèse. Tout d'abord, une étude réalisée dans un modèle de rats néphrectomisés a démontré une augmentation de 200 % de l'expression protéique de Mrp2 dans le rein restant trois et six semaines après la néphrectomie par rapport aux rats témoins⁹⁵. Le même groupe n'a toutefois pas observé d'altération de l'expression de la P-gp chez les mêmes animaux⁹⁵. Un autre groupe a observé une diminution de 65 % de l'expression protéique de l'*organic cation transporter 2* (OCT2) dans le rein de rats deux semaines post-néphrectomie comparativement aux témoins et cette diminution était associée à une diminution de la

sécrétion tubulaire de la cimétidine¹¹⁰. Le même groupe a aussi mesuré l'expression de Oat1 et Oat3 sans observer de modification bien qu'ils aient observé une diminution de la sécrétion de para-aminohippurate, un de leurs substrats¹¹⁰. Par contre, un autre groupe ayant mesuré l'expression protéique de Oat1 et Oat3 quatre semaines post-néphrectomie ont observé une diminution d'environ 50 % de leur expression protéique comparativement aux animaux témoins¹¹¹. De plus, ils ont démontré que l'expression protéique de ces transporteurs corrélait avec le transport rénal de l'acide hippurique chez ces animaux¹¹¹. Finalement, un dernier groupe a démontré une baisse de l'expression génique de OatK1 et OatK2 dans le rein de rats quatre semaines post-néphrectomie sans changement de l'expression de Mrp2¹¹².

À ce jour, les études dans les modèles animaux semblent donc confirmer que l'IRC affecte la sécrétion tubulaire, donc les transporteurs de médicaments rénaux, bien que certains résultats soient contradictoires. D'autres études sont donc nécessaires pour bien identifier les impacts de l'IRC sur le transport actif rénal des médicaments.

2.6. LA PÉNÉTRATION DES MÉDICAMENTS À TRAVERS LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE

La barrière hématoencéphalique (BHE) est une barrière physique et biochimique hautement sélective entre le cerveau et la circulation sanguine systémique. Elle est formée par une monocouche de cellules endothéliales non fenestrées et jointes entre elles par des jonctions étanches de type zonula occludens maintenues par des facteurs trophiques relâchés par les astrocytes entourant les microvaisseaux cérébraux. Ces cellules endothéliales bordent les microvaisseaux formant un réseau de capillaires qui, chez l'humain, s'étend sur 600 km avec une distance moyenne de 40 µm entre chaque capillaire¹¹³⁻¹¹⁷. La présence de jonctions étanches zonula occludens entre les cellules endothéliales les rend quasi imperméables au passage paracellulaire de substances endogènes et exogènes forçant les molécules à emprunter un mécanisme de transport transcellulaire pour entrer au cerveau. Seules de très petites molécules gazeuses comme le CO₂ et l'O₂ de même que de très petites molécules lipidiques comme les barbituriques et l'éthanol peuvent diffuser librement à travers les

membranes plasmiques. Des systèmes de transport spécifiques incluant de nombreux récepteurs, des canaux ioniques et des transporteurs d'influx et d'efflux sont exprimés aux membranes lumineales et ablumineales de la BHE afin de réguler le trafic transcellulaire de petites molécules hydrophiles en facilitant l'entrée de nutriments comme le glucose ou les acides aminés dans le cerveau et en exportant ou en bloquant l'entrée de composés potentiellement toxique comme le glutamate^{113, 114, 116}.

Parmi les transporteurs exprimés à la BHE, on retrouve, à la membrane lumineale, les transporteurs d'efflux P-gp, MRP2, 4 et 5 qui exportent les molécules de la cellule endothéliale vers le sang^{116, 118-122}. Les transporteurs OATP2 et OAT3 sont exprimés aux membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales cérébrales et participent à l'entrée des médicaments du sang vers le cerveau et à la sortie des médicaments du cerveau vers le sang. OATP3, exprimé à la membrane lumineale effectue aussi le transport bidirectionnel de ses substrats^{116, 118, 121-128}.

2.5.1 LA PÉNÉTRATION DES MÉDICAMENTS À TRAVERS LA BARRIÈRE HÉMATOENCÉPHALIQUE EN IRC

À ce jour, aucune étude ne rapporte les impacts de l'IRC sur l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments à la BHE. Toutefois, des évidences cliniques suggèrent que leur activité pourrait être modulée par l'IRC. En effet, des cas de neurotoxicité par des céphalosporines et des antibiotiques de la famille des bêta-lactames ont été rapportés chez des patients ayant une fonction rénale réduite malgré des concentrations plasmatiques normales de médicaments¹²⁹⁻¹³¹. Les transporteurs de médicaments exprimés à la BHE empêchent normalement l'entrée de ces médicaments au cerveau¹²³. En effet, les céphalosporines et les antibiotiques de la famille des bêta-lactames sont des substrats connus de OAT3 et des MRP à la BHE et dans les reins^{123, 132-134}. Des perturbations du transport de ces antibiotiques à la BHE en insuffisance rénale causant une augmentation de leur concentration intracérébrale pourraient expliquer les cas de neurotoxicités observés malgré des concentrations plasmatiques normales.

De plus, des études ont démontré que l'inflammation intracérébrale et l'inflammation systémique pouvaient réduire l'expression de la P-gp à la BHE et dans le foie, entraînant l'accumulation de ses substrats dans le cerveau et le plasma¹³⁵⁻¹³⁷. Comme l'IRC correspond à un état inflammatoire chronique¹³⁸⁻¹⁴², il est tout à fait possible que l'expression de la P-gp soit réduite à la BHE chez des sujets souffrant d'IRC favorisant ainsi l'accumulation de médicaments dans leur cerveau. Des études sont toutefois nécessaires pour bien caractériser les impacts de l'insuffisance rénale chronique sur les transporteurs de médicaments exprimés à la BHE et sur la perméabilité de la BHE.

3. LES TRANSPORTEURS DE MEDICAMENTS

Il est donc clair que l'IRC affecte plusieurs étapes de la pharmacocinétique des médicaments. En effet, des modifications de l'absorption, de la distribution et de l'élimination des médicaments par l'IRC ont été rapportées. Les transporteurs de médicaments sont fortement impliqués dans ces processus. Ma thèse porte sur les impacts de l'IRC sur le transport des médicaments dans l'intestin, le foie, les reins et le cerveau. Cette section de l'introduction se veut donc une description détaillée des différentes familles de transporteurs de médicaments et tout particulièrement des transporteurs dont il sera question tout au long de cette thèse. On y présente les transporteurs, leurs principaux substrats et leurs fonctions physiologiques.

À ce jour, plus de 400 transporteurs membranaires ont été identifiés dans le génome humain⁹⁸. Ils sont classés en deux grandes familles : les transporteurs ABC (ABC signifiant *ATP-binding cassette*) et les « solute carriers » (SLC). Ces transporteurs sont exprimés dans les diverses membranes cellulaires du corps humain et facilitent l'entrée (l'influx) ou la sortie (l'efflux) de substrats endogènes tels des acides aminés, des nucléotides, des hormones ou des sucres dans les cellules membranaires ou dans les organelles. Certains transporteurs sont toutefois aussi reconnus pour effectuer le transport de xénobiotiques, des

substrats exogènes, en plus du transport de molécules endogènes. C'est de ces transporteurs dont il sera question dans le cadre de cette thèse. On les retrouve surtout dans des organes ayant une fonction biologique de barrières tels l'intestin, le foie, les reins, le placenta et la barrière hématoencéphalique où ils jouent un rôle important dans la biodisponibilité, l'élimination biliaire, la sécrétion et la réabsorption tubulaires rénales, l'exposition fœtale aux xénobiotiques et la distribution des médicaments au cerveau.

3.1. LES « ABC-TRANSPORTERS »

La superfamille des transporteurs ABC est une des plus importantes classes de protéines identifiées à ce jour¹⁴³. On y retrouve de nombreuses protéines impliquées dans le transport de molécules biologiques endogènes et exogènes à travers les membranes cellulaires¹⁴³. Bien qu'il existe une grande variété de transporteurs ABC, ils partagent la même structure de base, illustrée dans la Figure 2, composée de domaines transmembranaires (TMD) hydrophobes généralement formés de 6 hélices alpha et de deux domaines cytoplasmiques de liaison de nucléotides (nucleotide binding domains [NBD]) capables de lier et hydrolyser des molécules d'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport des molécules¹⁴⁴. La séquence des acides aminés des NBD est très bien conservée parmi les différentes sous-familles de transporteurs ABC et présente de 30 à 40 % d'homologie dans une région clé de 200-250 acides aminés^{143, 145}. Ce sont les TMD, avec leur grande variabilité de séquence, qui confèrent la spécificité des transporteurs ABC pour leurs substrats. En effet, les TMD forment le canal transmembranaire et contiennent les sites de liaison des substrats⁹⁶. De plus, les transporteurs ABC possèdent tous une ou plusieurs branches de N-glycosylation sur leurs boucles extracellulaires qui ne semblent pas nécessaires à l'activité des transporteurs, mais qui semblent impliquées dans l'acheminement du transporteur vers la membrane cellulaire de même que dans son insertion et sa stabilité à la membranaire cellulaire¹⁴⁶.

Figure 2 Topologie transmembranaire type des transporteurs ABC. Exemple du transporteur ABCB1 ou P-glycoprotéine.

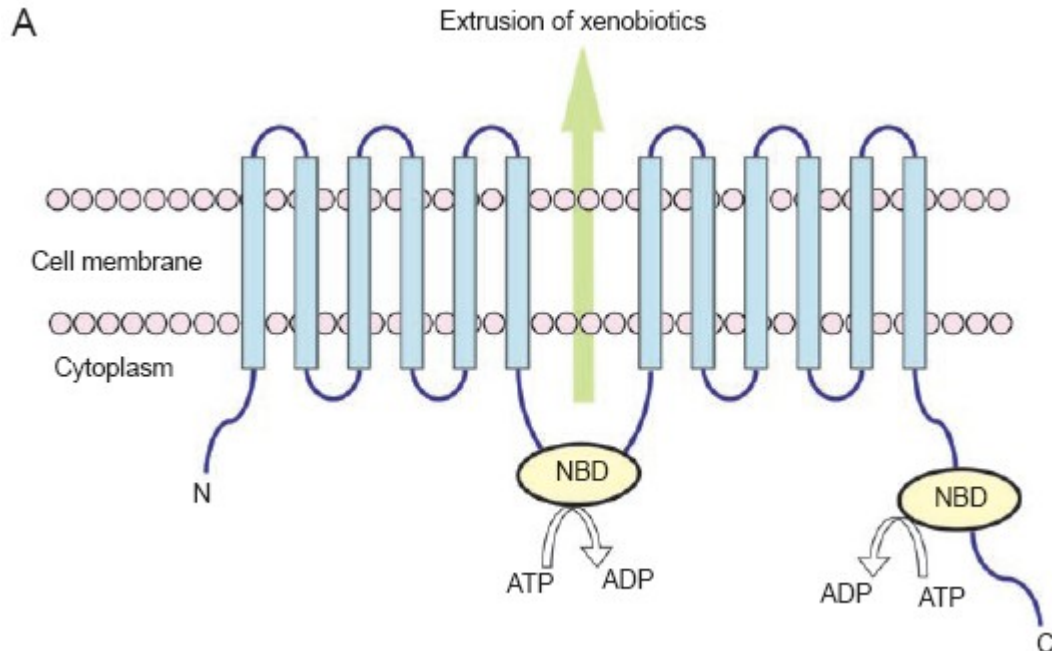


Figure reproduite de la référence¹⁴⁷

Environ une centaine de transporteurs ABC, divisés en 7 sous-familles (ABCA à ABCG), ont été identifiés, incluant 49 chez l'humain dont 12 impliqués dans le transport de médicaments^{96, 148, 149}. Trois sous-familles de transporteurs ABC, ABCB, ABCC et ABCG, sont associées au phénomène de résistance aux médicaments que ce soit dans les bactéries, les levures, les parasites ou les mammifères¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Elles ont particulièrement été associées à la résistance tumorale aux agents chimiothérapeutiques à la fois chez les humains et les rongeurs^{150, 151}. Les principaux transporteurs impliqués dans la pharmacocinétique des médicaments sont présentés dans le tableau II et les sections suivantes.

Tableau II Les transporteurs ABC ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.

Gène	Transporteur	Localisation (membrane)
<i>ABCB1</i> (humain) <i>abcb1a</i> et <i>abcb1b</i> (rongeur)	P-gp/ MDR1 (humain), Mdr1a et Mdr1b (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Astrocytes • Cellules endothéliales cérébrales (luminale) • Foie (canaliculaire) • Intestin (apicale) • Plexus choroïde (apicale) • Tubule proximal rénal (apicale)
<i>ABCC1</i> (humain) <i>abcc1</i> (rongeur)	MRP1 (humain), Mrp1 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules épithéliales de l'anse de Henle et du tubule collecteur rénal (basolatérale) • Plexus choroïde (basolatérale)
<i>ABCC2</i> (humain) <i>abcc2</i> (rongeur)	MRP2 (humain), Mrp2 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Astrocytes • Cellules endothéliales cérébrales (luminale) • Foie (canaliculaire) • Intestin (apicale) • Tubule proximal rénal (apicale)
<i>ABCC3</i> (humain) <i>abcc3</i> (rongeur)	MRP3 (humain), Mrp3 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Foie (basolatérale) • Intestin (basolatérale) • Tubule distal rénal (basolatérale)
<i>ABCC4</i> (humain) <i>abcc4</i> (rongeur)	MRP4 (humain), Mrp4 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Astrocytes • Cellules endothéliales cérébrales (luminale et abluminale) • Foie (basolatérale) • Plexus choroïde (basolatérale) • Tubule proximal rénal (apicale)
<i>ABCC5</i> (humain) <i>abcc5</i> (rongeur)	MRP5 (humain), Mrp5 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Astrocytes • Cellules endothéliales cérébrales (luminale)
<i>ABCG2</i> (humain), <i>abcg2</i> (rongeur)	BCRP/MXR/ABCP (humain), Bcrp (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules endothéliales cérébrales (luminale) • Foie (canaliculaire) • Intestin (apicale)

Tableau adapté selon les références^{103, 118, 120-123, 146, 152-162}.

Abréviations : ABCP, transporteur ABC exprimé dans le placenta; BCRP, breast-cancer resistance protein; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance-associated protein; MXR, mitoxanthrone resistant protein;

3.1.1 P-GLYCOPROTEINE

La P-glycoprotéine (P-gp) a été le premier transporteur ABC identifié chez l'humain et est sans contredit, à ce jour, le plus étudié et le mieux caractérisé^{150, 163}. La P-gp a été découverte dans les années 1970 par Juliano et Ling qui ont identifié une protéine hautement glycosylée de 170 kDa exprimée à la surface de cellules ovariennes mutantes de hamster. Cette protéine réduisait la perméabilité de la membrane cellulaire pour plusieurs agents chimiothérapeutiques, et ce, proportionnellement à son niveau d'expression¹⁶⁴. Ils l'ont ainsi nommée P-glycoprotéine, P pour perméabilité¹⁶⁴. La P-gp peut aussi être désignée ABCB1, c'est-à-dire membre 1 de la sous-famille B des transporteurs ABC, ou MDR1 pour *multidrug resistance 1*¹⁶³. Il est, maintenant, bien connu que le mécanisme d'action de la P-gp réduisant la perméabilité de certains médicaments consiste à empêcher l'accumulation intracellulaire de ses substrats en les rejetant à l'extérieur des cellules contre leur gradient de concentration (efflux)¹⁶³ (voir Figure 2).

Il existe 2 types de P-gp humaine : la P-gp de type I (*MDR1*, *mdr1a* et *mdr1b* chez les rongeurs) et la P-gp de type II (*MDR2* ou 3, *mdr2* chez les rongeurs)¹⁶⁵⁻¹⁷¹. Ce sont *MDR1*, *mdr1a* et *mdr1b* qui confèrent la résistance aux médicaments et dont il sera question tout au long du manuscrit alors que les *MDR2* ou 3 et *mdr2* servent de translocateurs de phospholipides surtout à la membrane canaliculaire des hépatocytes^{168, 171-175}. Bien que *Mdr1a* et *Mdr1b* partagent plusieurs substrats, elles ont aussi des substrats spécifiques^{168, 176}. Ensemble, *Mdr1a* et *Mdr1b* couvrent le spectre des substrats de la P-gp humaine de type *MDR1* et semblent avoir la même fonction biologique que celle-ci^{168, 176}.

On retrouve la P-gp du côté apical dans la muqueuse intestinale, les canalicules biliaires et le tubule proximal rénal où elle limite l'absorption intestinale et favorise l'élimination biliaire et urinaire des médicaments^{170, 177}. De plus, on retrouve la P-gp dans les tissus avec une fonction de barrière comme la barrière hématoencéphalique, la barrière hémato-testiculaire ou dans le placenta où elle prévient l'accumulation de substrats dans ces organes^{96, 98, 178}. Cette distribution à travers le corps humain laisse supposer que le rôle de la

P-gp est de protéger le corps humain et certains organes comme le cerveau de l'accumulation de substances toxiques comme les xénobiotiques.

Même si des modèles *in vitro* ont permis d'identifier plusieurs substrats de la P-gp¹⁷⁹,¹⁸⁰, le développement d'une souris déficiente pour la P-gp (P-gp^{-/-}) par Schinkel *et al.* dans les années 1990 a permis de bien démontrer l'importance de la P-gp dans la pharmacocinétique de ses substrats. En effet, ils ont ainsi démontré que l'absence de P-gp entraîne une augmentation de l'accumulation intracérébrale de l'ivermectin (100 fois), un pesticide neurotoxique, et de la vinblastine (3 fois), un agent anticancéreux^{178, 181}. L'accumulation de ces substrats n'était toutefois pas limitée au cerveau puisque Schinkel *et al.* ont aussi observé un ralentissement de leur élimination de la circulation sanguine^{178, 181}.

La P-gp se démarque des autres transporteurs par la grande diversité structurale de ses substrats. Elle effectue le transport de plusieurs composés cationiques ou neutres, mais aussi de quelques composés anioniques tel que le méthotrexate^{143, 145, 154, 182, 183}. Plusieurs classes de médicaments ont été identifiées comme étant des substrats de la P-gp^{29, 143, 154}. Les principales étant les inhibiteurs de protéase du VIH (ex. : saquinavir), les agents chimiothérapeutiques (ex. : vincristine), les immunosuppresseurs (ex. : cyclosporine), les stéroïdes (ex. : aldostérone) et les antagonistes β -adrénergiques (ex. : talinolol)^{29, 143, 154}. De plus, on connaît de nombreux inducteurs et inhibiteurs de la P-gp (voir tableau III).

Tableau III Certains substrats, inhibiteurs et inducteurs de la P-gp.

Substrats			
Aldostérone	Diltiazem	Itraconazole	Ritonavir
Amprénavir	Doxorubicine	Kétoconazole	Saquinavir
Atorvastatine	Érythromycine	Lopéramide	Sirolimus
Cétirizine	Étoposide	Lopinavir	Tacrolimus
Cimétidine	Fexofénadine	Losartan	Talinolol
Colchicine	Gramicine D	Nelfinavir	Triamcinolone
Corticostérone	Hoechst 33342	Paclitaxel	Valinomycine
Cyclosporine	Hydrocortisone	Quinidine	Vérapamil
Daunorubicine	Indinavir	Ranitidine	Vinblastine
Dexaméthasone	Irinotecan	Rhodamine 123	Vincristine

Digoxine		
Inhibiteurs		Inducteurs
Amiodarone	Propafénone	Dexaméthasone
Cyclosporine	Quinacrine	Millepertuis
Jus de pamplemousse	Quinidine	Rifampin
Nicardipine	Tariquidar	
Nifédipine	Vérapamil	

Tableau basé sur les références^{98, 154, 158, 163, 184}

Devant la variété des substrats de la P-gp, il n'est pas étonnant que de nombreuses interactions médicamenteuses impliquant la P-gp aient été rapportées à ce jour^{98, 154}. Un des exemples les plus connus serait probablement l'interaction observée entre la digoxine et la quinidine ou le vérapamil. En effet, il a souvent été rapporté dans les années 1970 et 1980 que la quinidine ou le vérapamil, coadministrés avec de la digoxine, pouvaient jusqu'à doubler les concentrations plasmatiques de digoxine causant de la toxicité chez certains patients^{185, 186}. Les causes de cette augmentation sont longtemps restées inconnues et ont été élucidées dans les années 1990 à l'aide de modèles *in vitro*^{187, 188}. En effet, deux groupes ont démontré qu'une inhibition non compétitive de la P-gp par la quinidine ou le vérapamil cause une diminution de la sécrétion tubulaire rénale de la digoxine et serait ainsi responsable de la hausse de ses concentrations plasmatiques^{187, 188}.

L'inhibition de la P-gp peut aussi avoir des conséquences importantes au système nerveux central. En effet, le lopéramide, un antidiarrhéique agoniste des récepteurs opioïdes μ , est utilisé à grande échelle et ne cause pas d'effets indésirables centraux, car sa distribution au cerveau est limitée par la P-gp¹⁸⁹. Toutefois, la coadministration du lopéramide avec de la quinidine entraîne de la dépression respiratoire, un symptôme classique de toxicité centrale aux opioïdes, chez des sujets sains sans changement des concentrations plasmatiques de lopéramide¹⁹⁰. Suite à plusieurs études de ce type, des chercheurs ont entrepris de développer des stratégies d'inhibition de la P-gp à la barrière hématoencéphalique pour accroître la distribution de certains médicaments au système nerveux central par exemple pour traiter des tumeurs cérébrales.

L'induction de la P-gp peut aussi causer des interactions médicamenteuses et avoir des répercussions pharmacocinétiques importantes. Par exemple, l'induction de la P-gp intestinale peut entraîner une diminution de la biodisponibilité de ses substrats et ainsi, une diminution de leur efficacité. Un très bon exemple de ce phénomène est celui de l'interaction entre le millepertuis et la cyclosporine. Le millepertuis, un produit naturel offert sans ordonnance et souvent utilisé pour le traitement de la dépression légère, est un inducteur connu de l'expression de la P-gp intestinale. Cette propriété aurait pu avoir des conséquences désastreuses chez deux patients ayant reçu une greffe cardiaque qui prenaient de la cyclosporine comme médication antirejet. L'immunosuppression chez ces patients était stable depuis plusieurs mois lorsqu'ils ont décidé, par initiative personnelle, de prendre du millepertuis pour traiter de légers symptômes dépressifs. Environ 3 semaines plus tard, les deux patients se sont présentés à l'hôpital pour subir une biopsie endomyocardique élective. Tous deux présentaient des signes de rejet aigu du greffon et des concentrations plasmatiques de cyclosporine inférieures au seuil thérapeutique qui ont été attribuées à une interaction médicamenteuse entre le millepertuis et la cyclosporine. La cessation du traitement au millepertuis a permis un retour à la normale des concentrations de cyclosporine et les patients n'ont pas subi d'autres épisodes de rejet¹⁹¹.

3.1.2 LES « MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEINS » (MRP)

Les « *multidrug resistance-associated proteins* » (MRP) font partie de la sous-famille ABCC des transporteurs ABC. Il s'agit de transporteurs d'efflux exprimés dans plusieurs membranes cellulaires, particulièrement dans l'intestin, le foie, les reins, la barrière hématoencéphalique et la barrière placentaire, ce qui témoigne de leur implication dans l'absorption, la distribution et l'élimination des médicaments ainsi que dans leur fonction de barrière, protégeant les milieux essentiels et vulnérables aux xénobiotiques toxiques. Les MRP ont été décrits pour la première fois dans la lignée de cellules pulmonaires cancéreuses H69AR résistante à la doxorubicine, ainsi qu'à plusieurs agents chimiothérapeutiques, ne surexprimant pas la P-gp¹⁹². Les auteurs y ont découvert une protéine de 1522 acides aminés fortement surexprimée qu'ils ont appelée « *multidrug resistance-associated protein* » et qu'ils ont identifiée comme faisant partie de la

superfamille des transporteurs ABC¹⁹². Cette protéine est maintenant connue sous le nom de MRP1 ou ABCC1, le premier de plusieurs MRP.

Les MRP présentent une grande diversité de substrats lipophiliques anioniques endogènes et exogènes avec un certain chevauchement entre les différents transporteurs. Les MRP transportent de nombreuses molécules endogènes ou exogènes conjuguées au glutathion (p. ex : leukotriène C₄), à l'acide glucuronique (p. ex : bilirubine) ou au sulfate (p. ex : sels biliaires) par le métabolisme de phase II^{143, 193-195}. L'efflux des métabolites de médicaments ou de molécules endogènes conjugués est souvent la dernière étape dans leur processus de détoxification. Les MRP y jouent donc un rôle clé puisqu'il s'agit de la plus grande famille de transporteurs d'efflux impliqués dans l'excrétion biliaire, urinaire ou intestinale des molécules conjuguées¹⁵⁶. De plus, les MRP confèrent de la résistance à plusieurs xénobiotiques comme des agents chimiothérapeutiques (p. ex : doxorubicine) ou antiviraux (p. ex : ganciclovir) non conjugués par un mécanisme de cotransport avec le glutathion (voir tableau IV).

Il existe 9 différents MRP chez l'humain et de nombreux gènes et protéines orthologues ont été identifiés dans différentes espèces mammifères. À ce jour, 7 et 8 gènes orthologues ont été identifiés chez le rat et la souris, respectivement. Les MRP2, MRP3 et MRP4, ainsi que leurs orthologues Mrp2, Mrp3 et Mrp4 chez le rat, sont toutefois les plus impliquées dans l'absorption et l'élimination des médicaments⁹⁸. À la barrière hématoencéphalique, ce sont les transporteurs MRP2 (Mrp2), MRP4 (Mrp4) et MRP5 (Mrp5) qui jouent un rôle dans la protection du cerveau contre les xénobiotiques¹⁵⁸. L'expression de ces transporteurs peut être induite par de nombreuses molécules, particulièrement par des inducteurs connus des enzymes de biotransformation du cytochrome P450¹⁹⁶. Ces transporteurs sont présentés dans les tableaux II et IV et dans les sections suivantes.

Tableau IV Certains substrats, inhibiteurs et inducteurs des MRP ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.

Transporteur	Substrats*	Résistance*	Inhibiteurs	Inducteurs
MRP2 (humain), Mrp2 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Acétamino-phène glucuronidée • ρ-Aminohippurate • Benzylpénicilline • Bilirubine glucuronidée • Estrone-3-sulfate • 17β-Glucuronosyl estradiol • Glutathion • Leucotriène C₄ • Morphine-3-glucuronide • Morphine-6-glucuronide • SN-38 • SN-38 glucuronidé 	<ul style="list-style-type: none"> • Cisplatine • Doxorubicine • Epirubicine • Étoposide • Méthotrexate • Vinblastine • Vincristine 	<ul style="list-style-type: none"> • Benzbromarone • Cyclosporine • Furosémide • Indométhacine • MK571 • Montelukast • Probenécid 	<ul style="list-style-type: none"> • β-naphthoflavone • Éthoxyquine • Hydroxyanisole butylée • Oltipraz • PCB126 • TCDD • TCPOBOP
MRP3 (humain), Mrp3 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Acétamino-phène glucuronidée • Bilirubine glucuronidée • Cholate • Dihydroépan-diostérone-3-sulfate • Folate • 17β-Glucuronosyl estradiol • Leucotriène C₄ • Leucovorine • Méthotrexate • Morphine-3-glucuronide • Morphine-6-glucuronide • Taurocholate 	<ul style="list-style-type: none"> • Étoposide • Méthotrexate • Téniposide 		<ul style="list-style-type: none"> • β-naphthoflavone • Ciprofibrate • Clofibrate • Diallyl sulphide • Diéthylhexylphthalate • Éthoxyquine • Hydroxyanisole butylée • Oltipraz • PCB126 • Phénobarbital • Pregnénone-16-carbonitrile • Spironolactone • TCDD • TCPOBOP
MRP4	<ul style="list-style-type: none"> • Adéfovir 	<ul style="list-style-type: none"> • Azidothymi- 	<ul style="list-style-type: none"> • Célécoxib 	<ul style="list-style-type: none"> • Éthoxyquine

(humain), Mrp4 (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • ρ-Aminohi- purate • AMPc • Cefazoline • Cefméta- zole • Cefotaxime • Ceftizoxime • Dihydroépan- diostérone-3- sulfate • Édaravone glucuronide • 17β-Glucuro- nosyl estradiol • Furosémide • Glutathion • GMPc • Hydrochloro- thiazide • Leucotriène C₄ • Leucovorine • Méthotrexate • Olmésartan • PMEa • Ténofovir • Topotécan • Urate 	<ul style="list-style-type: none"> dine • Folate • Ganciclovir • 6-Mercapto- purine • Méthotrexate • 6-Thioguanine • Topotécan 	<ul style="list-style-type: none"> • Dipyridamole • Indométha- cine • Losartan • MK571 • Montelukast • Probenécid • Quercétine • Sildénafil • Sulindac • Tréquinsine • Dipyridamole 	<ul style="list-style-type: none"> • Hydroxyani- sole butylée • Oltipraz • TCPOBOP
MRP5 (humain), Mrp5 (Rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • AMPc • Folate • GMPc • Glutathion • Méthotrexate 	<ul style="list-style-type: none"> • Chlorure de cadmium • 6-Mercapto- purine • Méthotrexate • PMEa 	<ul style="list-style-type: none"> • Benzbroma- rone • Diphénylami- ne-2-carboxy- late • Dipyridamol • Probenécid • Sildénafil • Sulfinpyra- zone • Tréquinsine • Zaprinast 	<ul style="list-style-type: none"> • β-naphtho- flavone • Éthoxyquine • Hydroxyani- sole butylée • Oltipraz • PCB126 • TCDD

*Les molécules présentées ont soit été démontrées être des substrats des différents MRP dans des modèles *in vitro* ou il a été démontré que l'expression des différents MRP conférait de la résistance cellulaire à ces médicaments.

Abréviations : AMPc, adénosine 3',5'-monophosphate; GMPc, guanosine 3',5'-monophosphate; PCB126, Biphényl polychloriné 126; PMEa, 9-(2-phosphorylméthoxyéthyl)adénine; TCDD, 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine; TCPOBOP, 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzène (TCDD)

Tableau adapté selon les références^{103, 118, 120-123, 146, 152-159, 162, 196-204}.

3.1.2.1 MRP1

Comme mentionné précédemment, MRP1 a été le premier transporteur de la famille des ABC à être identifié dans les années 1990¹⁹². Il transporte de nombreux anions organiques ainsi que de nombreux substrats conjugués au glutathion ou glucuronidés. En effet, de nombreux substrats (par exemple la daunorubicine, l'estrone-3-sulfate et la vincristine) ne sont transportés par MRP1 que lorsqu'ils sont conjugués au glutathion.

MRP1 est toutefois très peu exprimé dans les organes étudiés dans le cadre de cette thèse et n'est donc pas étudié dans cette thèse.

3.1.2.2 MRP2

MRP2 a été découvert quelques années après MRP1 lorsqu'un transporteur canaliculaire biliaire d'anions organiques qui semblait être absent dans une lignée de rats hyperbilirubinémiques (rat Eisai hyperbilirubinémiques [EHBR]) a été identifié. On l'a alors nommé « *canalicular multispecific organic anion transporter* » (cMOAT). Quand il a été démontré qu'il s'agissait bien d'un transporteur ABC ayant 50 % d'homologie avec MRP1, on l'a renommé MRP2^{162, 205}. On l'a ensuite retrouvé dans plusieurs organes impliqués dans l'absorption et l'élimination des médicaments. Sa localisation sur la membrane apicale des hépatocytes, des cellules du tubule proximal rénal et des entérocytes témoigne de son implication dans la sécrétion biliaire et urinaire de ses substrats de même que dans la limitation de l'absorption orale des médicaments en rejetant les composés absorbés par les entérocytes dans la lumière intestinale. Finalement, plusieurs auteurs ont rapporté une expression de Mrp2 dans la barrière hématoencéphalique de rats normaux^{118, 122, 205-207}.

Les principaux substrats de MRP2 sont des molécules endogènes ou des métabolites conjugués au glutathion et au sulfate ou glucuronidés résultant de la biotransformation de phase II. Quelques substrats sont présentés dans le tableau IV. Par exemple, le métabolite actif de l'irinotécan, le SN-38, ainsi que son métabolite glucuronidé, le SN-38 glucuronidé, sont des substrats connus de MRP2 de même que la bilirubine glucuronidée qui est un

produit de dégradation de l'hémoglobine. De plus, la surexpression de MRP2 entraîne de la résistance à de multiples médicaments incluant la vinblastine, l'étoposide, le cisplatine et la doxorubicine^{154, 158}. Au contraire, l'inhibition de MRP2 par le probénécid entraîne une diminution de 2,6 fois de l'excrétion biliaire de SN-38 ce qui a pour effet d'en augmenter l'exposition systémique comme en démontre l'augmentation de la surface sous la courbe de 1,5 fois de SN-38^{154, 208}.

Deux lignées de rats déficientes en MRP2 : EHBR et TR- (rat Groninger Yellow/transporter deficient) ont joué un rôle prépondérant dans la caractérisation de ce transporteur et dans la démonstration de son importance pour l'élimination biliaire des anions organiques. Une lignée de souris déficientes en Mrp2 (Mrp2^{-/-}) a aussi été mise au point. Elle aussi a joué un rôle crucial dans la caractérisation de MRP2. En fait, les deux modèles de rat ainsi que le modèle de souris Mrp2^{-/-} sont de bons modèles pour reproduire le Syndrome de Dubin-Johnson observé chez les patients ayant une déficience héréditaire en MRP2. Tout comme les patients, les animaux présentent des taux anormalement élevés de bilirubine glucuronidée sérique et urinaire, des taux intrahépatiques élevés de glutathion, une concentration biliaire diminuée de glutathion ainsi qu'une diminution du flux biliaire^{193, 194}. Grâce à ces deux modèles, il a été démontré que la diminution de l'extrusion du glutathion et de la bilirubine glucuronidée dans la bile des animaux et patients déficients en MRP2 cause une augmentation du transport de la bilirubine glucuronidée à travers la membrane sinusoidale des hépatocytes vers la circulation sanguine par le transporteur MRP3. La bilirubine est ensuite excrétée dans l'urine par le transporteur MRP4 à la membrane apicale des tubules proximaux rénaux. Ces deux transporteurs (MRP3 et MRP4) sont surexprimés chez les sujets déficients en MRP2, d'où l'augmentation des concentrations sériques et urinaires de bilirubine glucuronidée observée^{156, 159, 193, 194, 209}. Cette surexpression de MRP3 et MRP4 est donc un mécanisme biologique de compensation et d'hépatoprotection contre une accumulation intrahépatique de bilirubine potentiellement toxique. D'ailleurs, les animaux et les patients souffrant de déficience en MRP2 ne présentent pas de symptômes sévères d'hépatotoxicité et jouissent d'une espérance de vie normale^{155, 156}. Une telle dérivation de l'élimination biliaire vers l'élimination rénale de substrats conjugués a aussi été observée en condition de cholestase

(c'est-à-dire lorsque le débit de la bile est diminué) où on observe une diminution de MRP2 hépatique et une surexpression de MRP3 et MRP4 à la membrane sinusoïdale des hépatocytes^{162, 210}.

3.1.2.3 MRP3

MRP3 est exprimé à la membrane basolatérale des cellules du tubule distal rénal et des cellules épithéliales intestinales ainsi qu'à la membrane sinusoïdale des hépatocytes. On le retrouve aussi, entre autres, dans le pancréas, la prostate ou le placenta. Son expression peut être induite par de nombreuses molécules (voir tableau IV)¹⁹⁶. Cette induction a été associée à une augmentation de l'excrétion sinusoïdale de métabolites conjugués de médicaments hépatotoxiques comme l'acétaminophène, drogue pour laquelle MRP3 est presque entièrement responsable de l'excrétion sinusoïdale des métabolites glucuronidés^{198, 211}. Aussi, comme décrit précédemment, MRP3 est surexprimé à la membrane sinusoïdale des hépatocytes en situation de cholestase ou lors de déficience en MRP2 comme dans le Syndrome de Dublin-Johnson. Il s'agirait d'un mécanisme d'hépatoprotection contre l'accumulation d'acides biliaires et de bilirubine glucuronidée en augmentant leur excrétion dans le sang sinusoïdal¹⁹⁴.

Contrairement à MRP2, l'expression de MRP3 confère très peu de résistance aux médicaments. On a seulement noté une faible résistance à l'étoposide, au méthotrexate et au téniposide (voir tableau IV)^{159, 193}. De plus, contrairement à MRP2, MRP3 ne nécessite pas de cotransport avec le glutathion pour l'excrétion de médicaments non conjugués et transporte peu les molécules conjuguées au glutathion même que, dans des essais *in vitro*, on n'a pas détecté de transport de glutathion lorsque MRP3 était surexprimé dans des cellules d'insecte^{159, 162, 193}. En effet, MRP3 transporte surtout des composés glucuronidés ou des acides biliaires monovalents comme le cholate ou le taurocholate qui, eux, ne sont pas des substrats de MRP2^{162, 193, 194}.

3.1.2.4 MRP4

MRP4 se distingue des autres MRP du fait qu'il est exprimé dans les membranes basolatérales de certaines cellules et dans les membranes apicales d'autres. Il a pour la première fois été identifié sur la membrane basolatérale des cellules glandulaires épithéliales de la prostate. Il a ensuite été identifié dans la membrane apicale des cellules épithéliales rénales, dans la membrane basolatérale des hépatocytes et des cellules épithéliales du plexus choroïde ainsi que dans la membrane luminale des cellules endothéliales cérébrales^{118, 120-122, 156, 197}. On en retrouve aussi, entre autres, dans les plaquettes, les érythrocytes, les astrocytes, les cellules dendritiques et les glandes surrénales¹⁵⁶. Comme les autres MRP, son expression peut être induite par plusieurs molécules et, tout comme MRP3, il est induit à la membrane basolatérale des hépatocytes dans les situations de cholestase dans un mécanisme d'hépatoprotection^{194, 210}.

Les premiers substrats identifiés pour MRP4 étaient des analogues de nucléotides monophosphates utilisés comme antirétroviraux comme le 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl)adénine (PMEA). D'ailleurs les nucléotides cycliques adénosine 3',5'-monophosphate (AMPc) et guanosine 3',5'-monophosphate (GMPc) sont des substrats physiologiques de MRP4. Toutefois, certaines études semblent démontrer qu'il ne joue pas un rôle important dans la détermination de leurs concentrations intracellulaires^{156, 162}. D'autres études suggèrent plutôt que MRP4 jouerait un rôle dans la détermination des concentrations extracellulaires d'AMPc et de GMPc en favorisant leur excrétion rénale²¹².

MRP4 semble aussi jouer un rôle important dans l'excrétion urinaire des acides biliaires, comme en démontre sa surexpression dans le Syndrome de Dublin Johnson et en situation de cholestase (voir section MRP2), et des anions organiques. En effet, MRP4 transporte le ρ -aminohippurate (PAH), le substrat typiquement utilisé pour la caractérisation du transport d'anions organiques dans les cellules tubulaires rénales, avec

une plus grande affinité que MRP2 auquel on attribuait autrefois l'excrétion rénale des anions organiques. Aussi, l'excrétion du PAH est normale chez des rats TR- déficients en Mrp2²¹³.

Finalement, des souris déficientes en Mrp4 (Mrp4^{-/-}) présentent des concentrations intracérébrales et intracérébrospinales accrues de topotécan comparativement à des souris de type sauvage, ce qui démontre bien ses rôles aux barrières hématoencéphaliques et cérébro-spinales. MRP4 semble donc jouer un rôle important dans la protection du cerveau contre les cytotoxines et les auteurs de cette étude suggèrent que l'efficacité thérapeutique des médicaments destinés à traiter le système nerveux central pourrait être améliorée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de MRP4²¹⁴. Bien que plusieurs bons inhibiteurs de MRP4 comme l'indométacine, le montelukast et le sildénafil aient été identifiés, aucun inhibiteur sélectif et spécifique n'a été identifié à ce jour¹⁵⁶.

3.1.2.5 MRP5

MRP5 a été identifié, entre autres, dans les cellules épithéliales de l'urètre, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales cardiaques. Dans le cerveau, il a été identifié dans plusieurs populations cellulaires comme les astrocytes, les neurones pyramidaux et dans les cellules endothéliales cérébrales où il est exprimé à la membrane luminale¹⁵⁶. Tout comme pour MRP4, il est capable de transporter des nucléotides cycliques AMPc et GMPc avec une faible affinité et ne semble pas jouer de rôle dans la détermination de leurs concentrations intracellulaires^{162, 200}. Le transport de l'AMPc et du GMPc par MRP5 dans les cellules musculaires lisses du tractus génito-urinaire, peut toutefois être inhibé par des inhibiteurs de phosphodiesterase comme le sildénafil ce qui laisse supposer que cette inhibition pourrait participer à l'efficacité des inhibiteurs de phosphodiesterases en augmentant les concentrations intracellulaires de nucléotides cycliques par deux mécanismes, c'est-à-dire en inhibant leur excrétion en plus de leur dégradation^{156, 215}.

Comme il n'existe pas de lignée de souris déficientes en Mrp5, la caractérisation des substrats de MRP5 a été réalisée dans des essais *in vitro*. Il a été démontré que MRP5 peut transporter la fluorescéine diacétate sans cotransport avec le glutathion bien qu'il soit aussi un transporteur de glutathion. Il a aussi été démontré que MRP5 peut conférer une faible résistance cellulaire contre le chlorure de cadmium, la 6-mercaptopurine, l'oxaliplatine et le PMEA et une forte résistance cellulaire contre la 6-thioguanine et le 5-fluorouracil ainsi qu'une résistance un peu moindre contre le méthotrexate^{156, 197}. Toutefois, comme MRP4, MRP5 ne confère pas de résistance contre l'étoposide, les anthracyclines ou les vinca-alcaloïdes^{159, 193}. Finalement, il n'existe, à ce jour, pas d'inhibiteur spécifique de MRP5. Par contre, MRP5 peut être inhibé par différents inhibiteurs de phosphodiesterases et par des inhibiteurs non sélectifs comme le probénécid et le benzbromarone¹⁵⁶.

3.1.3 LA « BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN » (BCRP)

De la famille ABCG des transporteurs ABC, le membre ABCG2 est le plus impliqué dans la pharmacocinétique des médicaments. ABCG2 diffère des autres transporteurs ABC de par sa structure. En effet, ABCG2 est un demi-transporteur avec un seul NBD et 6 TMD (voir Figure 3). Son homodimérisation est nécessaire à son activité^{216, 217}.

Figure 3 Topologie transmembranaire prédite de la «breast cancer resistance protein» (BCRP).

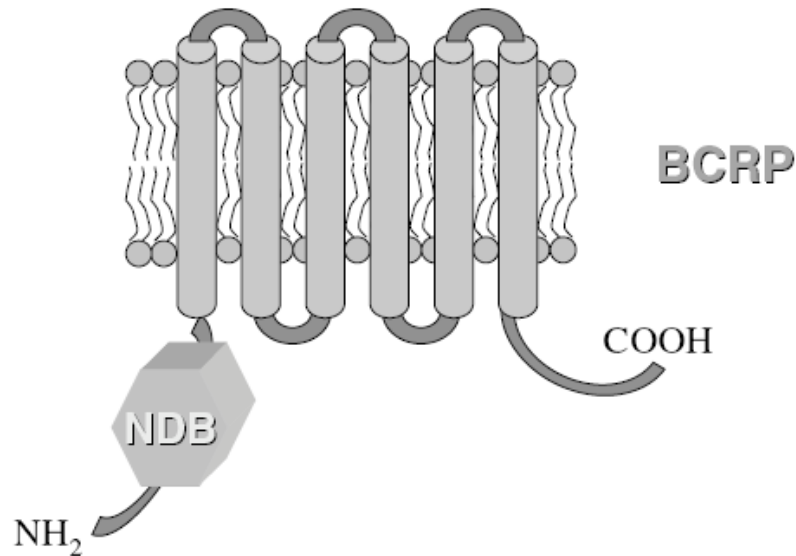


Figure reproduite de la référence²¹⁸

Les substrats de BCRP sont de grosses molécules hydrophobes, anioniques ou cationiques. Parmi eux, on retrouve, entre autres, des agents anticancéreux, des statines, des agents antiviraux, des substances cancérogènes et des molécules glucuronidées ou sulfatées²¹⁹ (voir tableau V). Plusieurs substrats de la P-gp ne sont transportés par BCRP que lorsqu'il y a mutation de sa séquence en acides aminés en position 482 (p.ex. : rhodamine 123, doxorubicine). De plus, certains substrats de la P-gp sont des inhibiteurs de BCRP sans être substrats de BCRP (p.ex. : cyclosporine, digoxine) et des inhibiteurs que l'on croyait spécifiques à la P-gp comme l'élacridar et le tariquidar peuvent aussi inhiber BCRP^{217, 219}.

L'organe exprimant le plus de BCRP est le placenta. On le retrouve aussi en moins grande quantité, entre autres, dans les cellules endothéliales cérébrales, les canalicules

hépatiques, les entérocytes du petit intestin et les cellules interstitielles testiculaires²²⁰. Il semblerait donc que BCRP soit impliqué dans l'excrétion biliaire de ses substrats, de même que dans la limitation de leur absorption intestinale et dans la protection d'organes ou de cellules vulnérables (cerveau, testicules) contre les xénobiotiques.

Tableau V Certains substrats et inhibiteurs de BCRP.

Substrats			
• Abacavir	• Daunorubicine*	• Hoechst 33342	• Quercétine
• Acétaminophène sulfate	• Déhydroépiandrostérone sulfate	• Imatinib	• Rhodamine 123*
• Aflatoxine B1	• Dihydrotestostérone	• Irinotécan	• Rifampicine
• Benzo[a]pyrene-3-sulfate	• Doxorubicine*	• Lamivudine	• Rosuvastatin
• Benzo[a]pyrene-3-glucuronide	• Épirubicine*	• Méthotrexate*	• SN-38
• Bisantrène*	• Érythromycine	• Méthotrexate diglutamate*	• SN-38 glucuronide
• Cérivastatin	• Estrone-3-sulfate	• Méthotrexate triglutamate *	• Sulfasalazine
• Cimétidine	• Étoposide*	• Mitoxantrone	• Teniposide
• Ciprofloxacine	• Flavopiridol	• Pantoprazole	• Topotécan
	• Gefitinib	• Phytoporphyryn	• Zidovudine
	• Génistéine	• Pitavastatin	
Inhibiteurs			
• Atazanavir	• Elacridar (GF-120918)	• Nelfinavir	• Ritonavir
• Benzoflavone	• 17- β -estradiol	• Nicardipine	• Saquinavir
• Corticostérone	• Géfitinib	• Nifédipine	• Sirolimus
• Curcumin	• Génistéine	• Oméprazole	• Tacrolimus
• Cyclosporine	• Imatinib	• Quercétine	• Tamoxifène
• Dexaméthasone	• Kétoconazole	• Pantoprazole	• Tariquidar (XR-9576)
• Digoxine	• Lopinavir	• Resvératrol	• Triamcinolone
• Dipyridamole	• Naringénine		

* Ces molécules ne sont transportées par BCRP que lorsqu'il y a mutation à l'acide aminé 482 de la protéine.

Tableau basé sur les références^{217, 219}

Le rôle de BCRP dans la biodisponibilité et dans l'excrétion biliaire de médicaments administrés par voie orale a bien été démontré. En effet, Jonker *et al.* ont étudié la pharmacocinétique du topotécan administré par voie orale en présence ou en absence d'élacridar (GF120918), un inhibiteur de BCRP et de la P-gp, chez des souris

P-gp^{-/-} comparativement à des souris de type sauvage²²¹. Ils ont ainsi démontré, chez les souris P-gp^{-/-} ayant reçu de l'élacridar, une augmentation de 6 fois de la biodisponibilité du topotécan comparativement aux souris ayant reçu le véhicule. Chez les souris de type sauvage, l'augmentation de la biodisponibilité du topotécan était de 9 fois comparativement aux souris ayant reçu le véhicule. L'élacridar avait aussi pour effet de réduire la clairance plasmatique et l'excrétion biliaire du topotécan tout en augmentant la réabsorption intestinale chez les deux types de souris²²¹. Le même groupe a aussi démontré une redétermination de l'excrétion biliaire de la 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), un agent carcinogène alimentaire, vers une élimination urinaire chez des souris *Abcg2* déficientes (*abcg2^{-/-}*)²²².

L'importance du rôle de BCRP à la barrière hématoencéphalique semble plutôt controversée. En effet, les études se contredisent sur le sujet. Un premier groupe a en effet démontré, à l'aide de souris P-gp^{-/-} et d'élacridar, l'implication de *Abcg2* dans le transport du mitoxantrone à la barrière hématoencéphalique de souris²²³. Un autre groupe a démontré une augmentation de 2,5 fois de la perméabilité cérébrale de l'imatinib, un substrat de BCRP, chez des souris déficientes en *Bcrp* comparées aux souris de type sauvage. De plus, lorsque les souris sauvages étaient prétraitées au pantoprazole, un inhibiteur de BCRP, cette perméabilité était 5 fois plus élevée. Ceci indique bien un rôle de BCRP dans la perméabilité de l'imatinib à la barrière hématoencéphalique²²⁴. Toutefois, dans une étude avec des souris *Bcrp^{-/-}* évaluant le rôle de *Bcrp* à la barrière hématoencéphalique de souris, la déficience en *Bcrp* ne semblait pas affecter la pénétration du mitoxantrone et du déhydroépiandrostérone sulfate, deux substrats de BCRP²²⁵. De plus, les auteurs de l'étude mesurant les modifications de la pharmacocinétique de PhIP chez des souris *abcg2^{-/-}* n'ont pas observé d'augmentation de la concentration intracérébrale de PhIP chez les souris *abcg2^{-/-}* comparativement aux souris de type sauvage²²². L'importance du rôle de BCRP dans la perméabilité de la barrière hématoencéphalique reste donc à déterminer.

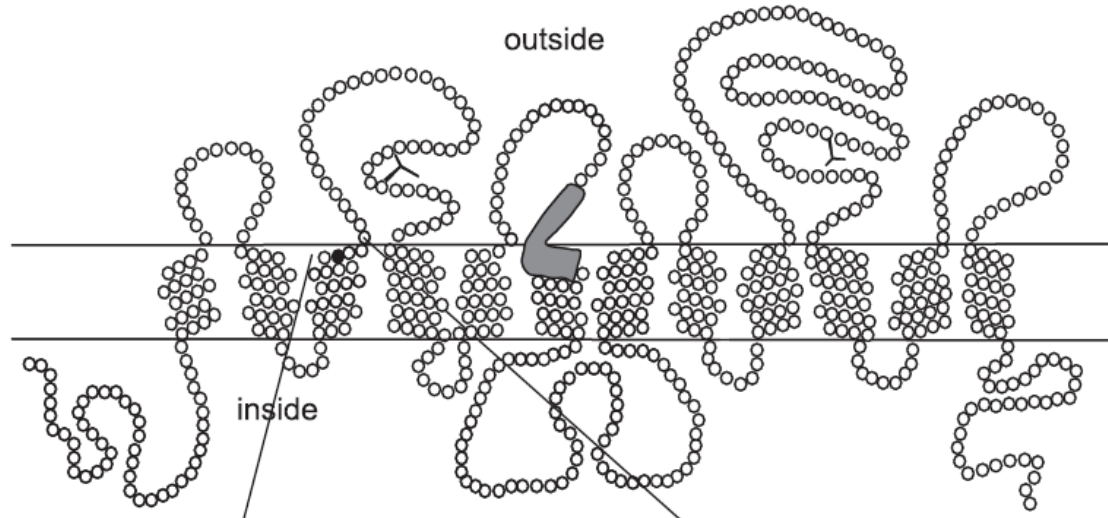
3.2. LES « SOLUTE CARRIERS »

Contrairement aux transporteurs ABC, les transporteurs de médicaments faisant partie de la famille des « solute carriers » (SLC) n'utilisent pas l'énergie de l'ATP pour transporter leurs substrats. Ils effectuent plutôt le transport des médicaments par transport facilité, c'est-à-dire que leur substrat est transporté selon son gradient de concentration, ou par transport secondaire actif, c'est-à-dire qu'ils transportent leur substrat contre leur propre gradient électrochimique grâce à un second substrat (p.ex. sodium, hydrogène) voyageant en sens inverse selon son propre gradient de concentration. Il existe au moins 48 familles de SLC chez l'humain et dans plusieurs espèces²²⁶. Par contre, toutes ne sont pas impliquées dans le transport des médicaments. Les SLC appartenant à la même famille comptent au moins 20-25 % d'homologie de séquence en acides aminés entre eux²²⁷. Seules quelques familles jouant un rôle important dans la pharmacocinétique des médicaments seront présentées ici.

3.2.1 LES « ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDES » (OATP)

Les OATP sont des glycoprotéines à 12 passages transmembranaires, d'un poids moléculaire de 80 à 90 kDa, ayant leurs extrémités carboxy et amino terminales dans le milieu intracellulaire (voir Figure 4). Depuis la découverte de Oatp1a1 en 1994²²⁸, on les a isolées dans une grande variété de tissus chez les vertébrés. Ils sont des transporteurs sodium-indépendants d'anions organiques. Bien que certaines études suggèrent que les OATP sont des échangeurs d'anions organiques, les mécanismes du transport des substrats par les OATP n'ont pas été très bien caractérisés^{23, 229-231}.

Figure 4 Topologie transmembranaire prédite des transporteurs OATP.



Topologie prédite des douze passages transmembranaires formant les OATP. Des sites de N-glycosylation sont présents sur les boucles extracellulaires de la protéine et indiqués par un Y. La séquence conservée des OATP est indiquée en gris entre la boucle extracellulaire #3 et le passage transmembranaire #6. Figure reproduite de la référence²³².

Les OATP sont reconnus pour leur grande variété de substrats amphipatiques anioniques, neutres ou cationiques incluant des molécules endogènes, tels des sels biliaires, des hormones stéroïdiennes conjuguées ou des hormones thyroïdiennes, ainsi que des xénobiotiques, tels des statines, des agents anticancéreux ou des antibiotiques^{226, 233}. Les principaux substrats des OATP sont présentés dans le tableau VI.

Tableau VI Certains substrats, inhibiteurs et inducteurs des OATP ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.

Transporteur	Organes (membrane)	Substrats	Inhibiteurs
OATP1A2	<ul style="list-style-type: none"> • Cerveau • Foie (basolatérale) • Intestin (apicale) • Poumons • Rein (apicale) • Testicule 	<ul style="list-style-type: none"> • Chlorambuciltaurocholate • Déhydroépiandrostérone sulfate • 17β-Glucuronosyl estradiol • Fexofénadine • Méthotrexate • Ouabaïne • Prostaglandine E₂ • Rosuvastatin • Taurocholate • Thyroxine • Triiodothyronine 	<ul style="list-style-type: none"> • Jus d'orange • Jus de pamplemousse • Jus de pomme • Rifampicine • Rifamycin SV
OATP1B1	<ul style="list-style-type: none"> • Foie (basolatérale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Atorvastatin • Benzylpénicilline • Bilirubine • Bilirubine glucuronidée • Cholate • Déhydroépiandrostérone • Énalapril • Estrone-3-sulfate • 17β-Glucuronosyl estradiol • Méthotrexate • Pravastatin • Prostaglandine E₂ • Rifampin • Taurocholate • Témocaprilat • Thyroxine • Triiodothyronine • Valsartan 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciprofibrate • Clarithromycine • Cyclosporine • Digoxine • Érythromycine • Glibenclamide • Indinavir • Kétoconazole • Nelfinavir • Rapamycine • Saquinavir • Vérapamil • Warfarine
OATP1B3	<ul style="list-style-type: none"> • Foie (basolatérale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirubine glucuronidée • Bosentan • Cholate • Déhydroépiandrostérone sulfate • Digoxine • Docétaxel • Énalapril 	<ul style="list-style-type: none"> • Acide glycirrizique • Clarithromycine • Cyclosporine • Érythromycine • Kétoconazole • Rifampicine • Rifamycine SV

		<ul style="list-style-type: none"> • Estrone-3-sulfate • Fexofénadine • 17β-Glucuronosyl estradiol • Méthotrexate • Olmésartan • Ouabaïne • Paclitaxel • Pravastatin • Rifampicine • Rosuvastatin • Taurocholate • Thyroxine • Triiodothyronine 	<ul style="list-style-type: none"> • Roxithromycine • Télithromycine
OATP4C1	<ul style="list-style-type: none"> • Rein (basolatérale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Acide chénodéoxycholique • Acide glycocholique • AMPc • Digoxine • Estrone-3-sulfate • Méthotrexate • Ouabaïne • Sitagliptin • Thyroxine • Triiodothyronine 	<ul style="list-style-type: none"> • Cyclosporine • Digitoxigénine • Digitoxine
Oatp1 (nouvelle nomenclature Oatp1a1)	<ul style="list-style-type: none"> • Foie (basolatérale) • Rein (apicale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Aldostérone • Bilirubine glucuronidée • Bosentan • Cholate • Cortisol • Déhydroépandiostérone sulfate • Énalapril • Estrone-3-sulfate • 17β-Glucuronosyl estradiol • Glutathion • Pravastatin • Sulfotaurolithocholate • Taurocholate • Témocaprilat • Thyroxine • Triiodothyronine 	<ul style="list-style-type: none"> • Cyclosporine • Glycyrrhizin • Indométacine • Rifampicine • Vérapamil
OATK1/K2 (nouvelle nomenclature Oatp1a3-v1/Oatp1a3-v2)	<ul style="list-style-type: none"> • Rein (apicale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Taurocholate • Déhydroépandiostérone sulfate • Estrone-3-sulfate • Folate • 17β-Glucuronosyl estradiol 	<ul style="list-style-type: none"> • Digoxine • Flufénamate • Kétoprofène • Ibuprofène • Indométacine • Ouabaïne • Phénylbutazone

		<ul style="list-style-type: none"> • Méthotrexate • Ochratoxin A • Prostaglandine E₂ • Thyroxine • Triiodothyronine • Zidovudine 	
Oatp2 (nouvelle nomenclature Oatp1a4)	<ul style="list-style-type: none"> • Cerveau • Foie (basolatérale) • Intestin (apicale) • Rein (basolatérale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Bosentan • Cholate • Déhydroépiandrostérone sulfate • Digoxine • Estrone-3-sulfate • Fexofénadine • 17β-Glucuronosyl estradiol • Ouabaïne • Pravastatin • Prostaglandine E₂ • Taurocholate • Thyroxine • Triiodothyronine 	<ul style="list-style-type: none"> • Cyclosporine • Digoxine • Glycyrrhizin • Rifampicine • Vérapamil
Oatp3 (nouvelle nomenclature Oatp1a5)	<ul style="list-style-type: none"> • Cerveau • Foie (basolatérale) • Intestin (apicale) • Rein (apicale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cholate • Déhydroépiandrostérone sulfate • Digoxine • Estrone-3-sulfate • Fexofénadine • 17β-Glucuronosyl estradiol • Glycodéoxycholate • Ouabaïne • Prostaglandine E₂ • Taurocholate • Taurodéoxycholate • Thyroxine • Triiodothyronine 	<ul style="list-style-type: none"> • Azithromycin • Clarithromycin • Cyclosporine • Glycyrrhizin • Rifampicine
Oatp4c1	<ul style="list-style-type: none"> • Poumon • Rein (basolatérale) 	<ul style="list-style-type: none"> • Digoxine • Sitagliptin • Triiodothyronine 	<ul style="list-style-type: none"> • Cyclosporine

Adapté des références^{118, 226, 230, 231, 234-242}

Le rôle des OATP dans l'absorption intestinale et l'élimination hépatique des médicaments est bien connu. Toutefois, bien que les OATP aient été identifiés dans les reins et le cerveau, leur implication dans l'élimination urinaire des médicaments et dans la

distribution des médicaments au cerveau reste à déterminer^{230, 231}. De plus, de nombreuses interactions médicamenteuses impliquant les OATP intestinaux et hépatiques ont été rapportées, ce qui démontre leur importance dans la pharmacocinétique des médicaments.

Les Oatp/OATP identifiés chez les rongeurs et les humains ont été classés en 6 familles et 13 sous-familles²³¹. Toutefois, il n'y a pas, chez les rongeurs, de protéine orthologue pour les transporteurs OATP1A2, OATP1B1 et OATP1B3 humains qui ont une distribution importante dans l'intestin, le foie et la barrière hématoencéphalique. Malgré tout, les Oatp exprimés chez le rat présentent une bonne homologie de substrats avec les transporteurs exprimés chez l'humain^{226, 231}.

Comme il n'existe pas de protéines orthologues entre les OATP humains et de rat, au lieu de présenter chaque isoforme comme il a été fait précédemment, je présenterai ici certains des différents OATP exprimés, chez l'humain et le rat, dans les organes étudiés dans le cadre de cette thèse.

3.2.1.1 Les OATP intestinaux

Dans l'intestin humain, on retrouve plusieurs OATP, notamment, OATP1A2, OATP1B3, OATP2A1, OATP2B1 et OATP4A1 exprimés à la membrane apicale des entérocytes. Chez le rat, on retrouve seulement Oatp3 (nouvelle nomenclature Oatp1a5) ainsi qu'une très faible quantité d'Oatp2 (nouvelle nomenclature Oatp1a4)^{231, 243}. On les retrouve sur la membrane apicale des entérocytes matures à l'extrémité des villi. Ils effectuent le transport vers l'entérocyte de plusieurs anions organiques et de plusieurs composés neutres comme la pravastatine, la digoxine, la fexofénadine, les sels biliaires et la bilirubine^{23, 229}. Il a été démontré qu'une augmentation de l'activité des OATP intestinaux a pour effet d'augmenter la biodisponibilité de leurs substrats, puisque leur passage de la

lumière intestinale vers la circulation sanguine est ainsi facilitée. À l'inverse, une diminution de l'activité des OATP intestinaux cause une diminution de la biodisponibilité orale de ses substrats.

De nombreuses interactions pharmacologiques impliquant les OATP intestinaux ont été rapportées. Un des exemples les plus connus est celui de leur inhibition par le jus de pamplemousse et la diminution de la biodisponibilité de la fexofénadine. En effet, il a été démontré par le transport *in vitro* de taurocholate et de fexofénadine que les jus de pamplemousse, d'orange et de pomme, de même que des extraits de jus de pamplemousse, réduisaient l'activité de l'OATP1A2 humain et des Oatp1, 2 et 3 chez le rat²⁴⁴. Cette inhibition a même été reproduite *in vivo* chez des volontaires sains ayant reçu une dose de fexofénadine avec, au total, 1,2 L de jus de pamplemousse, d'orange ou de pomme. Les auteurs ont ainsi observé des diminutions de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques, de la concentration maximale et de l'excrétion urinaire de la fexofénadine, les ramenant à seulement 30 à 40 % des valeurs obtenues chez les gens ayant reçu la fexofénadine avec de l'eau. Aucun changement du temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale, de la demi-vie d'élimination, de la clairance rénale ou du volume urinaire n'a toutefois été observé²⁴⁴. Une étude subséquente a démontré qu'un volume normal (300 mL) de jus de pamplemousse était suffisant pour affecter la pharmacocinétique de la fexofénadine²⁴⁵.

3.2.1.2 Les OATP hépatiques

Dans le foie humain, on retrouve plusieurs OATP, notamment, OATP1A2, OATP1B1 et OATP1B3 exprimés à la membrane sinusoïdale des hépatocytes. Chez le rat, on retrouve seulement Oatp1 (nouvelle nomenclature Oatp1a1) et Oatp2 (nouvelle nomenclature Oatp1a4) ainsi qu'une très faible quantité d'Oatp3 (nouvelle nomenclature Oatp1a5) à la membrane sinusoïdale des hépatocytes^{231, 243}. Ils permettent l'extraction de plusieurs anions organiques et de plusieurs composés neutres du sang vers l'intérieur des

hépatocytes^{23, 229}. Il s'agit d'une étape importante dans la pharmacocinétique des médicaments. En effet, cette étape peut limiter la biotransformation hépatique puisque la biotransformation dépend de l'entrée du substrat dans l'hépatocyte^{23, 91, 246}. Une augmentation de l'activité des OATP hépatiques pourrait ainsi augmenter la clairance hépatique de médicaments alors qu'une diminution de leur activité pourrait causer une diminution de la clairance hépatique.

De nombreuses interactions pharmacologiques impliquant les OATP hépatiques ont été rapportées. Par exemple, une forte interaction entre le rosuvastatin et la cyclosporine a été observée chez des greffés cardiaques immunosupprimés par la cyclosporine. En effet, une augmentation de 700 % de la surface sous la courbe du rosuvastatin et une augmentation de 1000 % de la concentration maximale ont été observées chez les sujets recevant de la cyclosporine comparativement à des sujets témoins. *In vitro*, les auteurs ont démontré que le rosuvastatin est un excellent substrat de OATP1B1 et que la cyclosporine peut fortement inhiber ce transport. Ils en concluent donc que l'inhibition de l'OATP1B1 hépatique par la cyclosporine est responsable de cette interaction médicamenteuse²⁴⁷. De la même façon, il a été démontré, chez des volontaires sains, que la clarithromycine pouvait augmenter les concentrations plasmatiques du pravastatin, de l'atorvastatin et du simvastatin²⁴⁸. Contrairement à l'atorvastatin et au simvastatin qui sont en partie métabolisés par le cytochrome P450 (CYP450) hépatique, le pravastatin est éliminé presque intact dans la bile. L'augmentation des concentrations de pravastatin ne peut donc pas être attribuée à une diminution de son métabolisme par le CYP450. Elle serait plutôt attribuée à l'inhibition par la clarithromycine de l'import du pravastatin par les OATP1B1 et OATP1B3 dans les hépatocytes²⁴⁹. Finalement, chez l'humain, de nombreux polymorphismes pouvant modifier l'activité des OATP et modifier la pharmacocinétique des médicaments ont été identifiés²⁴³.

3.2.1.3 Les OATP rénaux

Dans le rein humain, on retrouve l'OATP1A2 à la membrane apicale des cellules épithéliales du tubule distal²⁵⁰. On retrouve aussi l'OATP4C1 à la membrane basolatérale

des cellules épithéliales du tubule proximal²³⁹. Chez le rat, on retrouve les Oatp1 (nouvelle nomenclature Oatp1a1), OatK1/K2 (nouvelle nomenclature Oatp1a3-v1/v2) et Oatp3 à la membrane apicale des cellules épithéliales du tubule proximal. On retrouve aussi les Oatp2 et Oatp4c1 à la membrane basolatérale des mêmes cellules^{100, 102, 104}. Toutefois, comme les OATP sont des transporteurs bidirectionnels, il n'est pas encore déterminé clairement si elles réabsorbent ou sécrètent les anions organiques dans le tubule rénal¹⁰⁰.

Malgré tout, le rôle de OATP4C1 et de son orthologue Oatp4c1 chez le rat, dans l'élimination rénale de la digoxine, d'au moins trois toxines urémiques (le guanidino succinate, la diméthylarginine asymétrique et le trans-aconitate), de la ouabaïne, des hormones thyroïdiennes et de l'estrone-3-sulfate, a bien été démontré^{233, 239, 242, 251}. De plus, il a été démontré que de nombreuses statines incluant le fluvastatin, le pravastatin, le simvastatin, le cézivastatin et l'atorvastatin augmentaient la transcription du gène de l'OATP4C1 et, ainsi, l'excrétion tubulaire de toxines urémiques²³³.

3.2.1.4 Les OATP à la barrière hématoencéphalique

Chez l'humain, l'OATP1A2 a été identifié à la membrane luminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux^{118, 122, 252}. Chez le rat, l'Oatp2 est localisé sur la membrane luminale et abluminale de ces mêmes cellules. On retrouve aussi l'Oatp3 à leur membrane luminale¹¹⁸. Bien que leur expression à la barrière hématoencéphalique ait été clairement démontrée, de même que leur capacité à importer de nombreux substrats physiologiques tels que les hormones thyroïdiennes, l'estrone-3-sulfate ou la prostaglandine E2 dans des études *in vitro*, l'importance physiologique *in vivo* des OATP n'a pas été clairement établie¹²².

Des études *in vitro* ont démontré que l'OATP1A2 est impliqué dans l'importation d'agonistes des récepteurs δ -opioïdes comme le DPDPE (D-penicillamine (2,5)-enkephalin) ou la deltorphine²⁵³. Ceci laisse croire que l'OATP1A2 pourrait être impliqué dans l'entrée de médicaments opioïdes agissant sur le système nerveux central dans le cerveau^{117, 250, 253, 254}. De plus, Urquhart et Kim suggèrent que le polymorphisme OATP1A2(Ile13Thr), présent chez 16 % de la population américaine d'origine européenne et entraînant une augmentation de l'activité du transporteur, pourrait être impliqué dans la neurotoxicité du méthotrexate bien que ceci n'ait pas encore été démontré dans des études cliniques²⁵⁴.

Chez les rongeurs, à l'aide de modèles *in vitro*, l'Oatp2 a été impliqué dans le transport de la digoxine et de la fexofénadine à la barrière hématoencéphalique^{255, 256}. De plus, des études de transport *in vivo* suite à la micro-injection d'inhibiteurs et de substrats d'Oatp2 dans le cortex de rats ont permis de démontrer que l'Oatp2 est fortement impliqué dans le transport du DHEAS²⁵⁷, du 17β -estradiol glucuronide²⁵⁸ et du pitavastatin²⁵⁹ du cerveau vers le sang. À l'inverse, des études de perfusion *in situ* de cerveau de souris déficientes en P-gp avec des inhibiteurs et des substrats d'Oatp2 ont démontré son implication dans le transport du DPDPE²⁶⁰ et de la morphine-6-glucuronide²⁶¹ du sang vers le cerveau.

Finalement, une étude récente utilisant un modèle de souris déficientes en Oatp2 (Oatp2^{-/-}) a tenté de caractériser le rôle de l'Oatp2 à la barrière hématoencéphalique¹²⁸. Ils ont ainsi démontré que le transport du cerveau vers le sang du pitavastatin, du rosuvastatin, du pravastatin et du taurocholate, après micro-injection dans le cortex cérébral, était réduit chez les souris Oatp2^{-/-} comparativement aux souris de type sauvage¹²⁸. Le transport du sang vers le cerveau du pitavastatin, du rosuvastatin, du taurocholate et de l'ochratoxine A, mesuré par perfusion *in situ* du cerveau, était aussi réduit chez les animaux Oatp2^{-/-} comparativement aux souris de type sauvage¹²⁸. Ces résultats démontrent que l'Oatp2 est

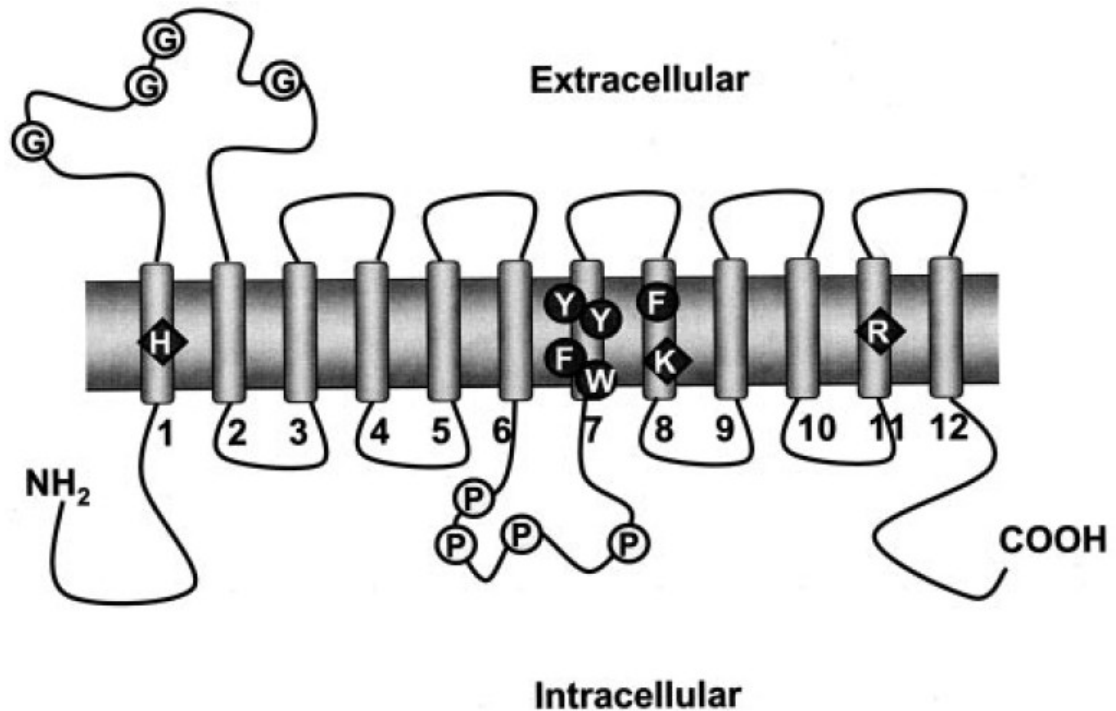
impliqué dans le transport de ses substrats du cerveau vers le sang et du sang vers le cerveau à travers la barrière hématoencéphalique¹²⁸.

3.2.2 LES « ORGANIC ANION TRANSPORTERS » (OAT)

Les transporteurs d'anions organiques (organic anion transporters) font partie de la sous-famille SLC22 de la grande famille des SLC. Les SLC22 transportent une grande variété de composés incluant des médicaments, des toxines environnementales ou des métabolites endogènes à travers les membranes cellulaires^{117, 262}. Il s'agit de transporteurs polyspécifiques ayant de multiples substrats et de nombreux ligands pouvant inhiber leur activité²⁶². Les SLC22 sont exprimés dans de nombreux organes incluant l'intestin, le foie, les reins et le cerveau, ce qui témoigne de leur important rôle dans l'absorption et l'élimination des médicaments en plus de leur distribution à travers la barrière hématoencéphalique^{117, 262, 263}.

Figure 5 Topologie transmembranaire prédite des transporteurs de la famille des SLC22.

Exemple type des OAT.



Topologie transmembranaire prédite des transporteurs d'anions organiques (OAT) formés de douze passages transmembranaires (TMD). La grande boucle extracellulaire située entre les TMD 1 et 2 présente plusieurs sites consensus de N-glycosylation représentés par un G. La grande boucle intracellulaire entre les TMD 6 et 7 comprend plusieurs sites de phosphorylation par la PKC représentés par un P. Les acides aminés conservés parmi les OAT et impliqués dans la reconnaissance et le transport des substrats sont indiqués. Figure reproduite de la référence²⁶⁴

Les SLC22s partagent toutes une structure semblable représentée dans la Figure 5. Il s'agit de protéines à 12 passages transmembranaires possédant une grande boucle extracellulaire contenant plusieurs sites de N-glycosylation et une grande boucle intracellulaire présentant de nombreux sites de phosphorylation pour la protéine kinase C

(PKC)^{262, 265}. Dans cette sous-famille des SLC, on retrouve principalement 3 sous-groupes de transporteurs divisés selon leurs substrats et leur mécanisme de transport.

Le premier sous-groupe comprend les transporteurs de cations organiques (*organic cation transporters* [OCT]) médiant la diffusion facilitée de cations organiques, incluant les bases faibles, par un mécanisme électrogénique indépendant du sodium pouvant être réversible. Le gradient électrochimique du cation organique transporté fournit l'énergie nécessaire au transport. Trois OCT1-3 (SLC22A1-3) ont été identifiés et sont exprimés majoritairement dans le foie et les reins, et OCT2 a aussi été retrouvé en moindre quantité dans le cerveau. Parmi les substrats des OCT, on retrouve des neurotransmetteurs (p.ex. acétylcholine, dopamine, sérotonine), des hormones (p.ex. progestérone, corticostérone) et différents médicaments (p.ex. vérapamil, metformine, quinine, morphine, cimétidine)^{209, 262, 263, 266-268}. Le second sous-groupe comprend les « *organic cation/carnitine transporters* » ou « *novel organic cation transporters* » [OCTN]. Les OCTN1-3 sont exprimés dans l'intestin, le foie et les reins où ils jouent un rôle essentiel dans la coabsorption et l'excrétion de la carnitine et de certains médicaments comme la quinidine et le vérapamil^{262, 263, 265, 267, 269}. Les OCT et les OCTN seront peu abordés dans le cadre de ce travail et ne seront donc pas révisés en détail.

Le troisième sous-groupe comprend les transporteurs d'anions organiques (*organic anion transporters* [OAT]) dont il sera question dans le cadre de ce travail. Les OAT sont capables d'effectuer le transport bidirectionnel d'anions organiques à travers les membranes cellulaires. Les OAT effectuent le transport actif secondaire ou tertiaire de leurs substrats à travers la membrane cellulaire par le gradient électrochimique du substrat ou un gradient électrochimique créé par un autre substrat²⁶⁵. Au moins trois (OAT1, OAT3 et URAT1) effectuent leur transport par un mécanisme d'échange avec des anions organiques divalents²⁷⁰⁻²⁷². Parmi les substrats des OAT, on retrouve des prostaglandines, des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes, des neurotransmetteurs et leurs métabolites ainsi que

certaines toxines urémiques. Les OAT transportent aussi de nombreuses classes de médicaments comme les antibiotiques bêta-lactames, anti-inflammatoires non stéroïdiens et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine^{117, 251, 265, 273}. Les OAT sont surtout présents dans les reins, mais ont aussi des sites d'expression extrarénaux comme le foie, l'intestin et le cerveau²⁶³. Les principaux OAT exprimés chez l'humain et le rat sont présentés dans le tableau VII et les sections suivantes.

Tableau VII Les transporteurs d'anions organiques ayant une importance clinique dans la pharmacocinétique des médicaments.

Transporteur	Gène	Localisation (membrane)	Substrats
OAT1 (humain), Oat1 (rongeur)	<i>SLC22A6</i> (humain), <i>Slc22a6</i> (rongeur)	• Tubule proximal rénal (basolatérale)	<ul style="list-style-type: none"> • Acétylsalicylate • Acyclovir • AMPc • Adéfovir • p-Aminohippurate • Bumétanide • Cidofovir • Ciprofloxacine • Ganciclovir • GMPc • Furosémide • Ibuprofène • Indométacine • Kétoprofène • Méthotrexate • Prostaglandine E₂ • Ochratoxine A • Oméprazole • Rifampicine • Salicylate • Théophylline • Urate • Zidovudine
OAT2 (humain), Oat2 (rongeur)	<i>SLC22A7</i> (humain), <i>Slc22a7</i> (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Foie (sinusoïdale) • Tubule proximal rénal (basolatérale) • Tubule collecteur rénal 	<ul style="list-style-type: none"> • Acétylsalicylate • Adénine • Adénosine • Allopurinol • AMPc • Bumétanide • Cimétidine

		(apicale) (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Déhydroépiandrostérone sulfate • Érythromycine • Estrone-3-sulfate • 5-Fluorouracil • GMPc • Indométacine • Méthotrexate • Paclitaxel • Prostaglandine E₂ • Prostaglandine F₂ α • Ranitidine • Salicylate • Tétracycline • Zidovudine
			<ul style="list-style-type: none"> • AMPc • p-Aminohippurate • Benzylpénicilline • Bumétanide • Céfoliam • Céphaloridine • Cholate • Cimétidine • CMPF • Déhydroépiandrostérone sulfate • Estrone-3-sulfate • GMPc • Famotidine • Furosémide • Ibuprofène • Indométacine • Indoxyl sulfate • Kétoprofène • Métabolites anioniques de l'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine • Méthotrexate • Ochratoxine A • Pravastatin • Prostaglandine E₂ • Prostaglandine F₂α • Quinapril • Ranitidine • Rosuvastatin • Salicylate • Taurocholate • Tétracycline • Topotécan • Urate
OAT3 (humain), Oat3 (rongeur)	<i>SLC22A8</i> (humain), <i>Slc22a8</i> (rongeur)	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules endothéliales cérébrales (abluminale et luminale) • Tubule proximal rénal (basolatérale) • Tubule distal rénal (basolatérale) (rongeur) 	
URAT1	<i>SLC22A12</i>	• Tubule proximal	• Benzylpénicilline

(humain), Urat1 (rongeur)	(humain), <i>Slc22a12</i> (rongeur)	rénal (apicale)	<ul style="list-style-type: none"> • Candésartan • Losartan • Nicotinate • Urate
------------------------------	---	-----------------	--

Tableau adapté selon les références^{98, 100, 117, 118, 121-125, 132-134, 251, 273-278}.

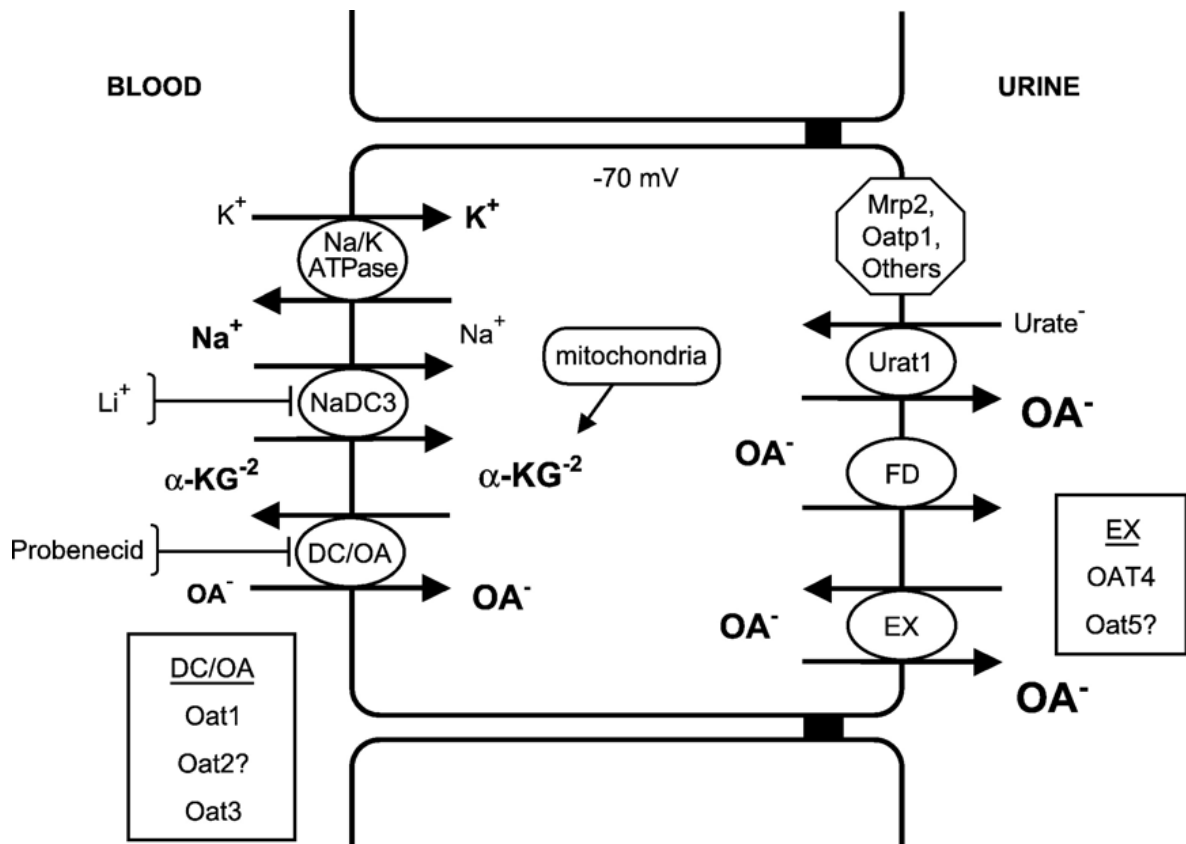
Abréviations : AMPc, adénosine 3',5'-monophosphate; CMPF, 3-carboxyl-4-méthyl-5-propyl-2-furonapropionate; GMPc, guanosine 3',5'-monophosphate

3.2.2.1 OAT1

Les Oat1 (Slc22a6) de rat et de souris ont été caractérisés par clonage dans les années 1990^{270, 272, 279}. Chez le rat, il avait été nommé ROAT1 (OAT1 de rat) alors que chez la souris, il avait été nommé « *novel kidney specific transporter* » (NKT)^{270, 272, 279}. Finalement, l'appellation OAT1 a été conservée. L'orthologue humain a été caractérisé peu après^{280, 281}. Des orthologues de OAT1 ont aussi été identifiés chez le singe, le cochon et le lapin²⁷³. Chez le rat et l'humain, OAT1 est exprimé principalement à la membrane basolatérale des tubules proximaux rénaux et c'est pourquoi il est considéré comme étant un transporteur spécifique aux reins. Toutefois, de faibles niveaux d'expression ont été retrouvés dans d'autres organes comme le foie, l'estomac, le pancréas, la vessie et le muscle squelettique^{262, 273}.

OAT1 est un échangeur anion organique/dicarboxylate (préférentiellement le α -ketoglutarate) selon un mécanisme de transport actif tertiaire représenté à la Figure 6. À la première étape, un gradient de sodium est maintenu par la Na⁺/K⁺-ATPase (Na/K ATPase), ensuite, l'entrée de sodium par cette pompe entraîne une entrée de α -ketoglutarate dans la cellule par le Na⁺/dicarboxylate transporter 3 (NaDC3). L'action du NaDC3 de même que la production de α -ketoglutarate par le métabolisme de l'acide citrique dans les mitochondries permettent de maintenir le gradient de concentration en α -ketoglutarate entre les milieux intra- et extracellulaires. Ce gradient permet l'échange par OAT1 entre l' α -ketoglutarate qui sort de la cellule selon son gradient et un anion organique qui entre dans la cellule^{267, 273}.

Figure 6 Mécanisme de transport actif tertiaire par les OAT1 et 3, exemple de la sécrétion urinaire d'anions organiques.



L'import d'anions organiques dans les cellules rénales par les OAT dépend de l'énergie cellulaire et d'un gradient de sodium (Na^+) créé par l'action de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (Na/K ATPase). L'entrée de Na^+ entraîne l'entrée de α -kétoglutarate ($\alpha\text{-KG}^{-2}$) par le $\text{Na}^+/\text{dicarboxylate}$ cotransporteur 3 (NaDC3) qui, de concert avec la production par les mitochondries, maintient ainsi le gradient de concentration (intracellulaire > extracellulaire) du $\alpha\text{-KG}^{-2}$. L'import à la membrane basolatérale de petits anions organiques est ensuite médié par des échangeurs dicarboxylate/anion organique (DC/OA). Les OAT1 et OAT3 sont des échangeurs DC/OA alors qu'il n'a pas encore été démontré que OAT2 agissait par ce mécanisme. L'efflux d'anions organiques à la membrane luminale se fait par diffusion facilitée (FD), par échange (EX) ou par des transporteurs d'efflux tels que les MRP. Les OAT4 et OAT5 exprimés à la membrane luminale peuvent médier l'efflux des anions organiques. Le transporteur Urat1 , membre de la famille des OAT, médie la réabsorption d'urate par l'échange contre des anions organiques. Figure reproduite de la référence²⁶⁷.

Les OAT présentent une grande variété de substrats incluant des substrats endogènes tels que l'AMPc et le GMPc, les prostaglandines et l'acide urique de même que plusieurs médicaments incluant des antibiotiques, des diurétiques, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des agents anticancéreux (voir tableau VII). En ce qui concerne les antibiotiques, il semblerait que les antibiotiques de type céphalosporines sont ceux ayant la plus grande affinité pour OAT1, les antibiotiques de type pénicilline ayant une meilleure affinité pour OAT3²⁷³. Toutefois, le substrat type de l'OAT1 est l'acide ρ -aminohippurique (PAH) qui s'accumule chez des souris déficientes en Oat1 (Oat1-/-)^{282, 283}. Aussi, l'inhibiteur le plus connu et le mieux caractérisé de l'OAT1 est le probénécid, un médicament uricosurique utilisé dans le traitement de la goutte et de l'hyperuricémie, qui l'inhibe sans toutefois être un substrat²⁷³.

D'ailleurs, plusieurs interactions médicamenteuses impliquant le probénécid et des anions organiques ont été rapportées. Par exemple, le probénécid réduit l'excrétion rénale des céphalosporines, ce qui entraîne une augmentation de leur surface sous la courbe, c'est-à-dire des concentrations élevées de céphalosporine plus longtemps^{97, 284}. L'usage de probénécid a ainsi été envisagé pour améliorer l'efficacité du traitement de la gonorrhée par les céphalosporines²⁸⁴. De la même façon, le probénécid réduit l'excrétion rénale du cidofovir, un médicament antiviral pouvant être néphrotoxique transporté par OAT1²⁷⁸, ce qui a pour effet de réduire son accumulation rénale et aussi sa néphrotoxicité. Il est même suggéré d'utiliser le probénécid pour prévenir la néphrotoxicité du cidofovir²⁸⁵⁻²⁸⁹.

3.2.2.2 OAT2

Le « novel liver transporter » (NLT) a été identifié dans le foie de rat par clonage en 1994 par le groupe de Simonson *et al.*²⁹⁰. Quelques années plus tard, le groupe de Sekine *et al.* a caractérisé ce nouveau transporteur et a suggéré qu'il soit renommé Oat2

puisque ce transporteur présentait 42 % de similarité avec l'Oat1 et puisqu'il transportait de nombreux anions organiques comme le salicylate, l'acétylsalicylate, la prostaglandine E2, des dicarboxylates et l'acide ρ -amminohippurique vers l'intérieur des cellules lorsqu'il était surexprimé dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Ils ont ainsi trouvé l'ARNm du nouvel Oat2 (Slc22a7) dans le foie et le rein de rats avec une expression beaucoup plus élevée dans le foie²⁹¹. Depuis ce temps, OAT2 (SLC22A7) a été identifié dans le foie et le rein humains²⁹².

Bien qu'aucune étude d'immunolocalisation de OAT2 n'ait été faite chez le rat ou l'humain, il est généralement considéré que OAT2 est exprimé à la membrane basolatérale des sinusoides hépatiques et il transporte ses substrats du sang vers l'hépatocyte où ils peuvent être métabolisés ou éliminés dans la bile^{262, 273}. La localisation de OAT2 semble différer dans le rein humain et de rat. En effet, chez l'humain, OAT2 est exprimé à la membrane basolatérale des tubules proximaux, alors que chez le rat, on l'a aussi identifié à la membrane apicale des cellules du tubule collecteur²⁹³⁻²⁹⁵. L'OAT2 exprimé à la membrane basolatérale du tubule proximal transporte les substrats du sang vers la cellule tubulaire, toutefois, il n'est pas encore déterminé si l'Oat2 retrouvé à la membrane apicale du tubule collecteur rénal sert à la sécrétion ou à la réabsorption urinaire d'anions organiques²⁷³.

En plus des substrats nommés ci-dessus, OAT2 peut transporter de nombreuses molécules, mais avec des affinités moindres que OAT1 et OAT3, incluant des diurétiques, des antibiotiques, des agents anticancéreux et des bloqueurs du récepteur 2 de l'histamine. À ce jour, aucun inhibiteur spécifique de OAT2 n'a été identifié, mais le probénécid est un bon inhibiteur de tous les OAT y compris l'OAT2. De plus, aucune interaction médicamenteuse impliquant OAT2 n'a été rapportée à ce jour²⁷³.

3.2.2.3 OAT3

Oat3 (Slc22a8) a été identifié chez la souris (identifié dans le rein, il se nommait roct pour transporteur réduit en ostéosclérose), chez le rat (identifié pour la première fois dans le cerveau) et chez l'humain (identifié pour la première fois dans le rein)²⁹⁶⁻²⁹⁹. Tout comme OAT1, OAT3 échange les anions organiques contre un dicarboxylate, généralement l' α -ketoglutarate^{100, 251, 265}.

OAT3 est exprimé entre autres dans les capillaires cérébraux, le foie et le muscle squelettique. Toutefois, il est surtout exprimé en grande quantité à la membrane basolatérale des tubules proximaux rénaux où il importe ses substrats du sang vers la cellule tubulaire^{251, 265, 273}. L'Oat3 de rat a aussi été retrouvé à la membrane basolatérale du tubule distal rénal²⁷³. Dans les capillaires cérébraux formant la barrière hématoencéphalique, OAT3 est situé sur les membranes luminales et abluminales et est impliqué dans l'excrétion des médicaments hors du cerveau vers le sang^{118, 121-125}. Toutefois, un groupe a récemment suggéré que l'Oat3, chez la souris, pouvait aussi favoriser l'entrée de Ro 64-0802, un métabolite actif de l'oseltamivir, et potentiellement d'autres médicaments, dans le cerveau en effectuant son transport du sang vers le cerveau¹²⁷. Finalement, il semblerait que l'Oat3 hépatique soit peu impliqué dans l'élimination hépatique d'anions organiques puisque leur importation dans des tranches de foie de souris déficientes en Oat3 (Oat3^{-/-}) n'était pas modifiée par rapport aux souris de type sauvage³⁰⁰.

Ce modèle de souris Oat3^{-/-} s'est avéré très utile dans la caractérisation des substrats de Oat3. En effet, ces souris présentaient une diminution de l'excrétion rénale, entre autres, du furosémide, de la benzylpénicilline, du ciprofloxacine et du méthotrexate démontrant ainsi de l'implication de l'Oat3 dans leur élimination rénale³⁰¹⁻³⁰⁴. OAT3 transporte aussi de nombreux substrats endogènes comme des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes, des prostaglandines et des neurotransmetteurs et leurs métabolites²⁷³.

Plusieurs interactions médicamenteuses impliquant OAT3 ont été rapportées. Un exemple bien connu est celui de la diminution de l'excrétion rénale de la pénicilline par le probénécid^{305, 306}. Cette interaction est certainement due à l'inhibition de plusieurs OAT par le probénécid, mais l'OAT3 est probablement le plus impliqué puisque la pénicilline a une plus grande affinité avec l'OAT3 qu'avec les autres OAT²⁷³.

De la même façon, l'inhibition des OAT par le probénécid³⁰⁷ ou par les anti-inflammatoires non stéroïdiens^{308, 309} est aussi fort probablement responsable de la toxicité du méthotrexate lorsqu'il est coadministré avec un de ces médicaments. Toutefois, OAT3 a une meilleure affinité pour le méthotrexate et est aussi plus sensible à l'inhibition par le probénécid ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens à des concentrations plasmatiques normales ce qui laisse croire que l'inhibition de l'élimination du méthotrexate par OAT3 est la plus impliquée dans cette interaction médicamenteuse²⁷³.

3.2.2.4 URAT1

L'acide urique est un produit du métabolisme des purines. Les humains ont des concentrations plasmatiques élevées d'acide urique parce qu'ils le réabsorbent par le transporteur URAT1 (SLC22A12) spécifique au rein³¹⁰.

URAT1 a été identifié pour la première fois dans les reins de souris et a été nommé « *renal specific transporter* » (Rst) toutefois sa fonction n'était pas connue³¹¹. C'est lors de la caractérisation de son orthologue humain qu'on a découvert son implication dans la réabsorption de l'acide urique et qu'il a été nommé URAT1^{312, 313}. URAT1 est exprimé à la membrane apicale des cellules des tubules proximaux et réabsorbe l'acide urique de l'urine par un échange avec des anions intracellulaires organiques ou inorganiques comme le lactate,

le nicotinate ou le chlorure^{310, 314}. Les anions organiques qui sont importés dans les cellules proximales par des transporteurs apicaux ou basolatéraux, ou ceux qui sont produits dans les cellules proximales facilitent la réabsorption de l'acide urique en quittant la cellule en échange d'acide urique luminal³¹⁰. Des médicaments peuvent aussi être échangés contre l'urate. Par exemple, le candésartan, le losartan et l'olmésartan peuvent être expulsés dans le tubule rénal en échange de l'absorption de l'urate³¹⁵. Finalement, l'Urat1 surexprimé dans des ovocytes de *Xenopus laevis* peut importer la benzylpénicilline, ce qui laisse supposer que l'Urat1 peut réabsorber la benzylpénicilline du filtrat rénal³¹³.

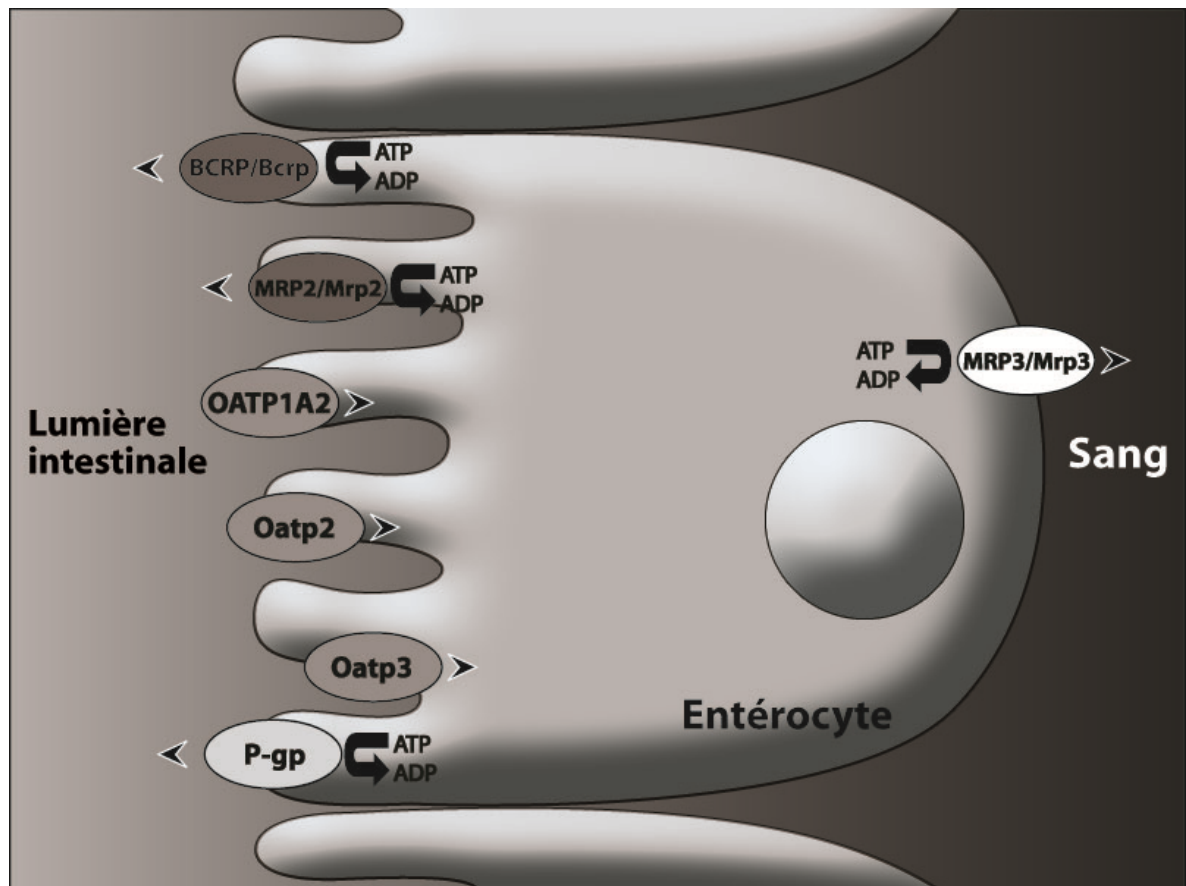
3.2.3 LE « TYPE 1 SODIUM-DEPENDENT PHOSPHATE TRANSPORTER » (NPT1)

Initialement le « *type 1 sodium-dependent phosphate transporter* » (NaPi1), exprimé à la membrane apicale des cellules du tubule proximal rénal et à la membrane sinusoidale des hépatocytes de lapin, a été identifié comme un transporteur de phosphate sodium-dépendant^{316, 317}. Son orthologue humain NPT1 (SLC17A1) a ensuite rapidement été identifié ainsi qu'un orthologue chez le rat^{251, 318, 319}. L'analyse moléculaire de NPT1 a ensuite démontré que NPT1 pouvait transporter des anions organiques³²⁰ incluant la benzylpénicilline et le PAH avec une meilleure affinité que le phosphate^{320, 321}. Le NPT1 permet ainsi l'élimination rénale en favorisant l'excrétion de ses substrats dans l'urine à travers la membrane apicale des cellules du tubule proximal rénal³²² alors que dans le foie, il effectue le transport de ces substrats de l'hépatocyte vers le sang³²³. D'autres anions organiques substrats de NPT1 incluant l'acide urique, la benzylpénicilline, le 17 β -estradiol glucuronide ainsi que le salicylate et l'acide acétylsalicylique, le faropenem, un antibiotique de la famille des β -lactames et le foscarnet, un médicament antiviral, sont transportés par NPT1 par un mécanisme dépendant du potentiel membranaire³²¹⁻³²³.

3.3. LES TRANSPORTEURS DANS LES DIFFÉRENTS ORGANES À L'ÉTUDE

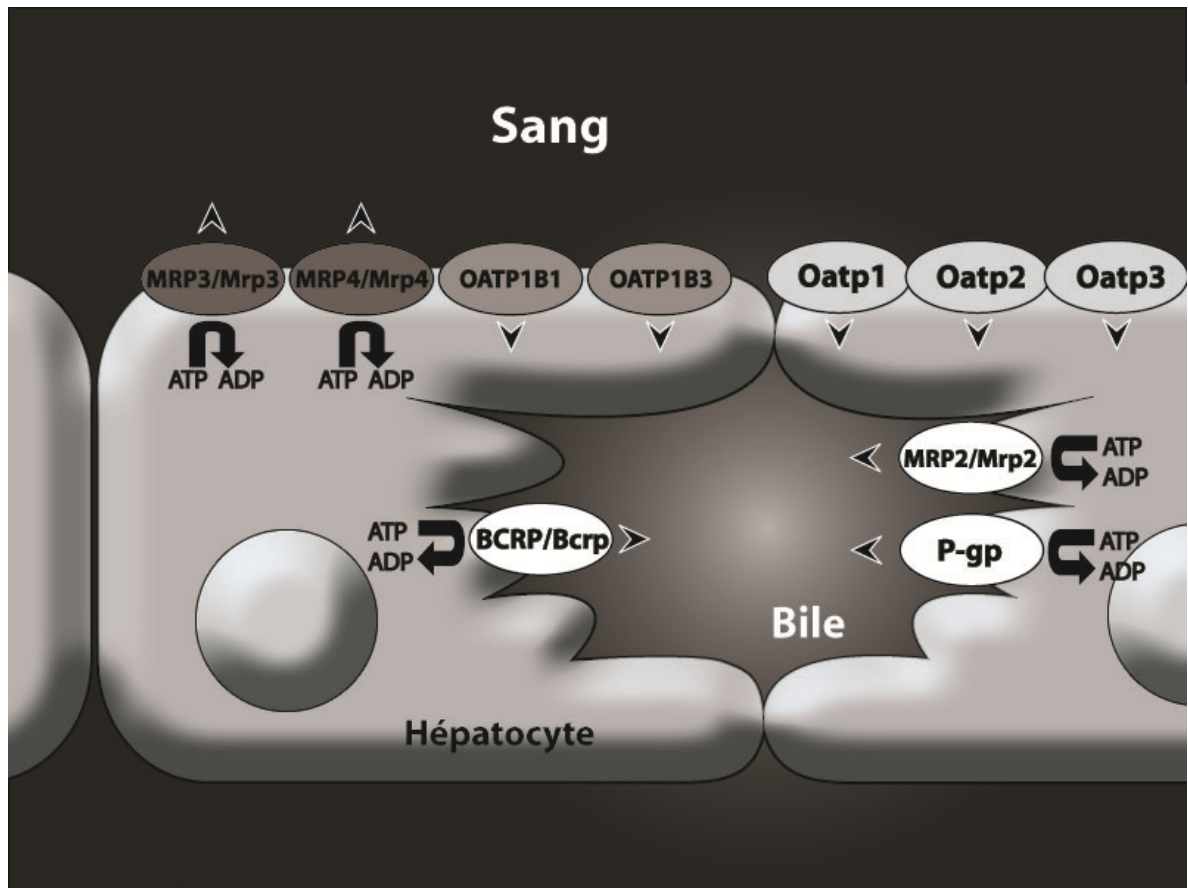
Suite à la description détaillée des transporteurs de médicaments exprimés dans l'intestin, le foie, les reins et le cerveau étudiés dans le cadre de ce travail, les figures suivantes résument schématiquement les transporteurs de chaque organe. Pour les schémas du foie et de l'intestin, les transporteurs écrits en majuscules sont des transporteurs présents chez l'humain alors que ceux écrits en minuscules sont présents chez le rat.

Figure 7 Les transporteurs de médicaments exprimés dans l'intestin.



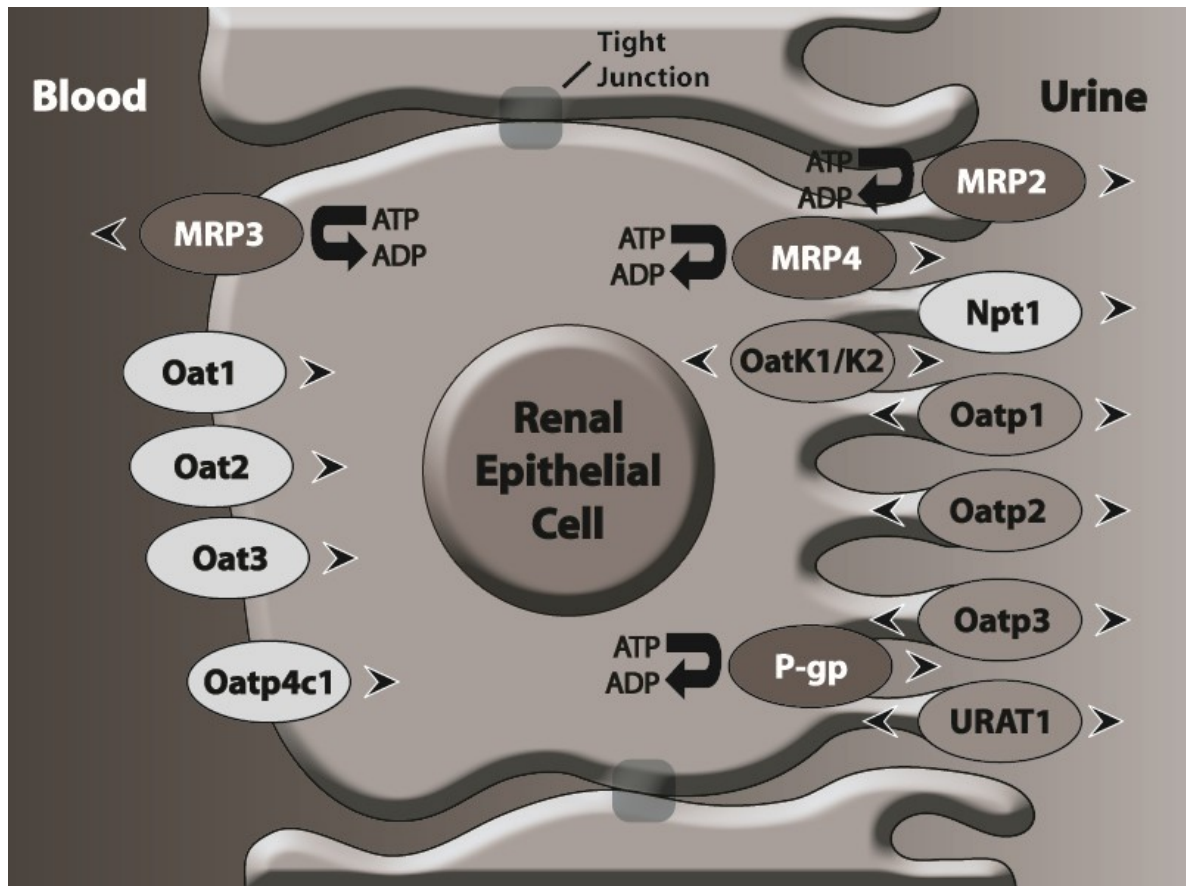
Bcrp: Breast cancer resistance protein, *Mrp*: multidrug resistance related protein, *Oatp*: organic anion transporting polypeptide, *P-gp*: p-glycoprotein. Les symboles en majuscules représentent les transporteurs retrouvés chez l'humain et ceux en minuscules, ceux retrouvés chez les rongeurs.

Figure 8 Les transporteurs de médicaments exprimés dans le foie.



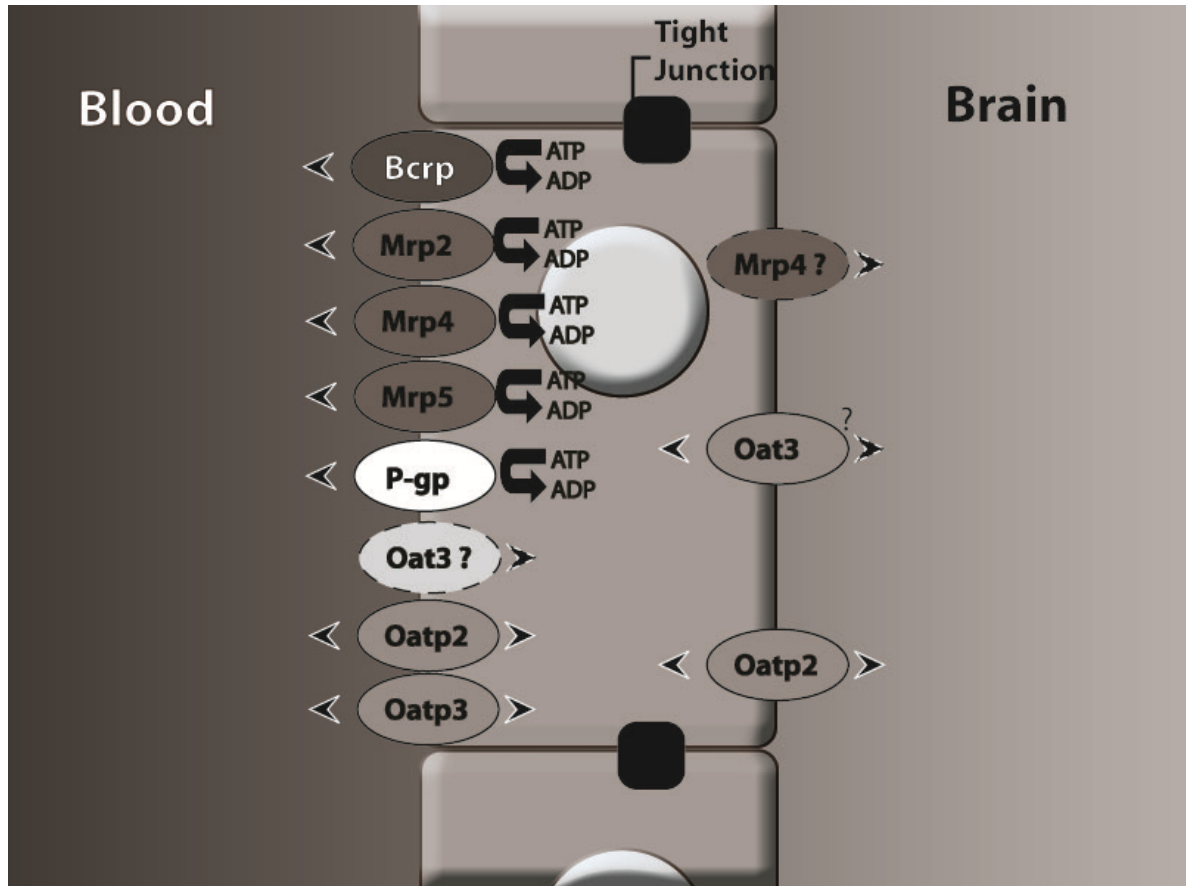
Bcrp: Breast cancer resistance protein, *Mrp*: multidrug resistance related protein, *Oatp*: organic anion transporting polypeptide, *P-gp*: p-glycoprotein. Les symboles en majuscules représentent les transporteurs retrouvés chez l'humain et ceux en minuscules, ceux retrouvés chez les rongeurs.

Figure 9 Les transporteurs de médicaments exprimés dans les reins.



Mrp: multidrug resistance related protein, *Npt1*: Sodium-dependent phosphate transport protein 1, *Oat*: organic anion transporter, *Oatp*: organic anion transporting polypeptide, *P-gp*: p-glycoprotein, *URAT1*: urate transporter. La plupart de ces transporteurs sont exprimés dans les cellules tubulaires proximales à l'exception de *Mrp3* que l'on retrouve dans les cellules tubulaires distales et de *OatK2* que l'on retrouve aussi dans les cellules corticales du tubule collecteur. Les *Oatp* et les *OatK1/K2* sont des transporteurs bidirectionnels. On ne sait pas s'ils favorisent la sécrétion ou la réabsorption des anions organiques d'où les flèches indiquant le transport dans les deux directions^{99, 100, 324, 325}. Aussi, l'*URAT1* participe à la sécrétion et à la réabsorption d'anions organiques par des mécanismes d'échange¹⁰⁰. Finalement, *Npt1* est un exportateur d'anions organiques et d'urate³²².

Figure 10 Les transporteurs de médicaments exprimés dans le cerveau, à la barrière hématoencéphalique.



Bcrp: Breast cancer resistance protein, *Mrp*: multidrug resistance related protein, *Oat*: organic anion transporter, *Oatp*: organic anion transporting polypeptide, *P-gp*: p-glycoprotein. *Mrp4* a été identifié sur la membrane abluminale dans des capillaires cérébraux bovins d'où il favoriserait l'efflux de molécules vers le cerveau, mais cela n'a pas été rapporté chez l'humain ou chez le rat^{118, 120-122}. Les *Oatp* sont des transporteurs bidirectionnels d'où les flèches indiquant les deux directions^{118, 121, 126, 128}. Une étude récente a suggéré que *Oat3* effectuerait l'import et l'export de molécules du cerveau¹²⁷. La figure est basée sur des informations provenant des références suivantes^{118-123, 125-127}.

4. HYPOTHESE

En résumé, la pharmacocinétique des médicaments est modifiée en IRC. En effet, il a été très bien démontré à l'aide d'études cliniques et de modèles animaux que l'IRC affecte non seulement l'élimination rénale des médicaments, mais aussi leur élimination métabolique, particulièrement dans le foie et l'intestin. Ces phénomènes expliquent en partie l'augmentation de l'incidence des effets indésirables des médicaments observés lors de l'IRC.

Une autre étape importante dans la cinétique des médicaments est leur import et leur export par les transporteurs d'influx et d'efflux exprimés dans l'épithélium de plusieurs organes, dont l'intestin, le foie et le rein, ainsi que dans l'endothélium de la barrière hématoencéphalique. Ces transporteurs jouent un rôle important dans la biodisponibilité, l'élimination hépatique, l'élimination rénale et la distribution des médicaments au cerveau en participant activement à l'extrusion des médicaments dans la lumière intestinale, la bile, l'urine ou encore en bloquant leur entrée dans le cerveau.

Nous avons déjà démontré, à l'aide d'un modèle de rats néphrectomisés, que l'IRC entraîne une diminution de l'expression protéique et de l'activité intestinale d'au moins deux transporteurs d'efflux de médicaments (la P-gp et le Mrp2), pouvant entraîner une augmentation de la biodisponibilité des médicaments dont l'absorption est limitée par un transport rétrograde par ces deux transporteurs⁵⁵. L'expression protéique d'au moins deux transporteurs d'influx (Oatp2 et Oatp3) n'était toutefois pas affectée par l'IRC⁵⁵. La diminution de l'expression et de l'activité de la P-gp et de Mrp2 a été attribuée à un ou des facteurs circulants s'accumulant dans le sérum des rats souffrant d'IRC. Il a été suggéré que ces facteurs puissent être des cytokines pro-inflammatoires ou des toxines urémiques présentes de façon excessive dans le sérum des animaux et des patients souffrant d'IRC et reconnues comme pouvant affecter l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments⁵⁵.

Si un ou des facteurs circulant dans le sérum de rats souffrant d'IRC peuvent moduler l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments dans l'intestin, ces facteurs peuvent tout aussi bien affecter l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments situés dans les autres organes. De plus, des observations cliniques ainsi que quelques études dans des modèles animaux suggèrent que l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments hépatiques, rénaux et cérébraux pourraient être affectées par l'IRC.

Le but de ce travail de doctorat est d'étudier les effets de l'IRC sur la cinétique des médicaments, particulièrement sur leur transport actif, afin de bien comprendre les mécanismes conduisant à l'importante incidence de toxicité et d'effets indésirables observée chez les sujets souffrant d'insuffisance rénale chronique. Mon hypothèse de travail est que l'IRC affecte l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments situés dans le foie, les reins, et à la barrière hématoencéphalique modifiant l'élimination hépatique, la sécrétion tubulaire active et l'entrée des médicaments dans le cerveau.

5. OBJECTIFS

Dans un premier temps, les impacts de l'IRC sur les transporteurs hépatiques de médicaments ont été évalués dans un modèle de rats chez lesquels l'IRC a été induite par néphrectomie 5/6. Les expressions protéique et génique de Mrp2, Oatp2 et P-gp ont été mesurées dans des foies provenant d'animaux souffrant d'IRC ou témoins. De plus, l'activité de la P-gp hépatique a été mesurée *in vivo* par la mesure de l'excrétion biliaire de la rhodamine 123 chez ces animaux. Nous avons déterminé *in vitro* l'effet du sérum urémique sur l'expression protéique des transporteurs dans des hépatocytes de rat en culture.

Dans un second temps, les impacts de l'IRC sur les transporteurs rénaux de médicaments ont été évalués à l'aide du même modèle de rats néphrectomisés. Nous avons mesuré les expressions protéique et génique de Mrp2, 3 et 4, Npt1, Oat1, 2 et 3, OatK1/K2, Oatp1, 2, 3 et 4c1, P-gp et Urat1 dans le rein restant des animaux souffrant d'IRC comparativement aux témoins. Nous avons aussi mesuré l'accumulation intrarénale de médicaments radiomarqués, substrats des transporteurs de médicaments rénaux chez ces

mêmes animaux. De plus, nous avons déterminé *in vitro* l'effet du sérum urémique sur l'expression protéique des transporteurs dans une lignée cellulaire de cellules tubulaires proximales humaines (Human Kidney-2). Finalement, nous avons déterminé l'effet du sérum de rat urémique sur le transport de la rhodamine 123, un substrat de la P-gp, dans cette même lignée cellulaire.

Le troisième projet consistait à évaluer les impacts de l'IRC sur les transporteurs de médicaments exprimés à la BHE dans notre modèle de rats IRC. Nous avons mesuré les expressions protéique et génique de Bcrp, Mrp2, 4 et 5, Oat3, Oatp2 et 3, et P-gp dans le cerveau de rats néphrectomisés et témoins. Nous avons aussi mesuré *in vivo* l'accumulation intracérébrale de la benzylpénicilline, de la digoxine, de la doxorubicine et du vérapamil, des substrats des transporteurs exprimés à la BHE, radiomarqués chez les animaux IRC comparativement aux témoins. Finalement, nous avons déterminé *in vitro* l'effet du sérum urémique sur l'expression protéique des transporteurs dans des astrocytes et des cellules endothéliales de cerveau de rat en culture.

Finalement, le dernier projet a été une collaboration avec un groupe de recherche américain. Il consistait à évaluer comment l'insuffisance rénale sévère affecte la clairance non rénale des médicaments en étudiant leur biotransformation et leur transport intestinal et hépatique chez des patients souffrant d'insuffisance rénale terminale. La pharmacocinétique du midazolam, un substrat du CYP3A, et de la fexofénadine, un médicament majoritairement transporté, a été évaluée chez les patients dialysés. Ces études cliniques ont été réalisées par le groupe américain. Dans le cadre de cette étude, nous avons déterminé les effets du sérum provenant des sujets de l'étude sur l'expression protéique des transporteurs de médicaments Oatp et P-gp et du cytochrome P450 3a dans des entérocytes et des hépatocytes de rat en culture.

J'ai personnellement été responsable du développement et des expérimentations des trois projets impliquant les rats néphrectomisés. Les dosages biochimiques (urée, créatinine) ont été réalisés par le service clinique de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Mon rôle dans le 4^e projet était un rôle de collaboration avec le groupe américain pour les études *in vitro*.

Méthodologie

1. LE MODÈLE DE RAT URÉMIQUE

Les trois premières études ont été réalisées dans un modèle rat néphrectomisé. Les animaux étaient séparés en deux groupes : un groupe témoin, ayant subi une laparotomie blanche, et un groupe de rats néphrectomisés (IRC) ayant subi une néphrectomie 5/6 en deux étapes. La première étape consistait à une néphrectomie des deux tiers du rein gauche, suivie, sept jours plus tard, d'une néphrectomie totale du rein droit. Les animaux du groupe IRC avaient accès à la nourriture et l'eau à volonté. Les animaux du groupe témoin recevaient la quantité de nourriture consommée par les animaux du groupe IRC la veille et de l'eau à volonté. Quarante-et-un jours après la première néphrectomie, les rats étaient placés en cage métabolique pour une collecte urinaire de 24 h afin de déterminer la clairance de la créatinine. Les rats étaient sacrifiés 42 jours post-néphrectomie. Lors du sacrifice par décapitation, le foie, les reins, le cerveau et le sérum des rats ont été prélevés. Des animaux ont aussi été utilisés pour des études de transport *in vivo*.

2. MESURE DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DES TRANSPORTEURS DANS LES TISSUS

L'expression protéique des différents transporteurs de médicaments a été mesurée par immunobuvardage de type western. L'expression des transporteurs hépatiques a été mesurée dans des homogénats de foie de rats néphrectomisés ou témoins préparés dans du NaCl 0.9 % contenant du fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF). L'expression des transporteurs rénaux et cérébraux a été mesurée dans une fraction membranaire totale de rein ou de cerveau de rats néphrectomisés ou témoins. La fraction membranaire a été obtenue par centrifugation différentielle³²⁶. La concentration protéique des homogénats et des fractions membranaires a été déterminée à l'aide de la méthode de Lowry³²⁷.

3. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN

Pour l'analyse par immunobuvardage de type western, 100 µg de protéines ont été déposés sur un gel de 7.5 % de polyacrylamide contenant 0.1 % de sodium dodécylsulfate puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après le blocage dans une solution de lait écrémé 5 %, les membranes ont été hybridées avec l'anticorps primaire, puis avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Pour la liste des anticorps utilisés, consulter les articles ci-dessous^{30, 328-330}. Les complexes immuns ont ensuite été révélés à l'aide du substrat à base de luminol Lumilight Plus (Roche Diagnostics, Laval, Québec, Canada). L'intensité de la réaction a été mesurée par l'analyse de la densitométrie des bandes obtenues sur un appareil de détection Fuji (Stamford, CT) LAS-3000 LCD à l'aide du programme d'analyse MultiGauge (Fuji). Dans le foie et le cerveau, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Gapdh) a été utilisée comme protéine de contrôle. La villine-1 a été utilisée dans le rein. La moyenne de la densitométrie obtenue dans les tissus provenant du groupe de rats témoins a été arbitrairement définie comme représentant 100 % d'expression.

4. MESURE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DES TRANSPORTEURS DANS LES TISSUS

Au moment du sacrifice, le foie, les reins et le cerveau des animaux ont été rincés dans de la saline glacée puis congelés dans l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ARN. L'ARN total de foie de rat a été extrait à l'aide du RNeasy mini-kit de Qiagen (Mississauga, ON, Canada). L'ARN total de reins et de cerveau de rat a été extrait à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Pour tous les tissus, 1 µg d'ARN total a été utilisé pour préparer l'ADNc par transcription inverse. L'ARNm des différents transporteurs a été mesuré par réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps-réel (qPCR) à l'aide d'amorces spécifiques pour les différents transporteurs. Pour le descriptif des amorces, consulter les articles ci-dessous³²⁸⁻³³⁰. Les produits de PCR ont été analysés à l'aide de la méthode du $\Delta\Delta CT$ ³³¹ en utilisant la *gapdh* comme gène standard dans le foie et le cerveau et la *villin-1* dans le rein.

5. MESURE, IN VIVO, DE L'ACTIVITÉ DES TRANSPORTEURS DE MÉDICAMENTS

5.1 EXCRÉTION DE RHODAMINE 123

Pour évaluer *in vivo* l'activité de la P-gp hépatique et rénale chez des rats témoins et néphrectomisés, nous avons mesuré l'excrétion biliaire et urinaire de la rhodamine 123 chez le rat anesthésié en utilisant une adaptation de la méthode publiée par Yumoto³³². Brièvement, nous avons infusé de la rhodamine 123 par la veine fémorale droite pendant 40 minutes. Pendant ce temps, nous avons récolté la bile et l'urine totales à des intervalles de 10 minutes ainsi que le sang des animaux pour le dosage de la rhodamine 123. Ensuite, un bolus de cyclosporine a été administré et de la cyclosporine a été ajoutée à la perfusion, puis la bile et l'urine totales ainsi que le sang ont été prélevés aux 10 minutes pendant 50 minutes pour le dosage de la rhodamine 123. À la fin, les animaux ont été sacrifiés et le foie prélevé et congelé dans l'azote liquide. La concentration de rhodamine 123 dans les liquides biologiques a été mesurée par chromatographie liquide de haute performance.

La clairance biliaire de la rhodamine a été déterminée à l'aide de l'équation $Cl_b = (C_b \times V_b) / (C_{p,ss} \times \text{temps})$ où C_b est la concentration biliaire de la rhodamine, V_b est le volume biliaire et $C_{p,ss}$ est la concentration plasmatique de la rhodamine à l'état d'équilibre. La clairance urinaire de la rhodamine a été déterminée à l'aide de l'équation $Cl_u = (C_u \times V_u) / (C_{p,ss} \times \text{temps})$ où C_u est la concentration urinaire de la rhodamine et V_u est le volume urinaire.

5.2 ACCUMULATION INTRARÉNALE ET INTRACÉRÉBRALE DE MÉDICAMENTS RADIOMARQUÉS

L'accumulation intrarénale de médicaments radiomarqués a été utilisée pour mesurer l'activité des transporteurs de médicaments rénaux. L'accumulation intracérébrale de médicaments radiomarqués a été utilisée pour mesurer l'activité des transporteurs de médicaments à la barrière hématoencéphalique. La méthode utilisée pour les deux études est la même. Elles seront donc décrites conjointement.

Pour l'accumulation intrarénale, nous avons testé deux médicaments radiomarqués : la [¹⁴C]benzylpénicilline, connue pour être un substrat de Oat3 et des Mrp^{123, 152, 333}, et la [³H]digoxine reconnue comme un substrat des Oatp et de la P-gp^{135, 239, 242}. Pour l'accumulation intracérébrale, en plus de la [¹⁴C]benzylpénicilline et de la [³H]digoxine, nous avons mesuré l'accumulation de la [¹⁴C]doxorubicine, un substrat de la P-gp³³⁴, et le [³H]vérapamil, un autre substrat de la P-gp³³⁴. Les expériences avec les différents substrats ont été réalisées chez des rats différents.

Brièvement, les médicaments radiomarqués ont été administrés par injection intramusculaire (benzylpénicilline), intrapéritonéale (digoxine) ou intraveineuse (doxorubicine, vérapamil) dans un ratio chaud :froid de 1 :1500 pour éviter que la quantité en mg de médicament radiomarqué ne soit significative dans le calcul de la dose. Après une période de latence de 30 minutes (doxorubicine), 60 minutes (vérapamil) ou 120 minutes (benzylpénicilline et digoxine), les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane et un volume sanguin maximal a été prélevé par ponction cardiaque dans des tubes héparinés. Le rein gauche et le cerveau des animaux ont été prélevés, rincés dans de la saline glacée, pesés, émincés et placés dans 2 mL de solution Solvable (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) à 56 °C pour au moins 14 heures. Le volume des organes dissouts a été noté et la radioactivité comptée pour 1 mL d'organe dissout et 2 mL de plasma. Les résultats sont exprimés par un ratio entre la radioactivité comptée (coups par minute) pour 1 g de rein et 1 mL de plasma. La moyenne des sujets du groupe témoins a arbitrairement été définie comme représentant 100 %.

6. EFFET DU SÉRUM DE RATS URÉMIQUES SUR L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS DE MÉDICAMENTS

Les effets du sérum de rats urémiques sur l'expression des transporteurs de médicaments *in vitro* ont été mesurés dans des cellules Human Kidney-2 (HK-2)³²⁹, une lignée cellulaire de tubule proximal rénal ainsi que dans des entérocytes³⁰, des hépatocytes^{30, 330}, des astrocytes³²⁸ et des cellules endothéliales de cerveau de rat en culture

primaire³²⁸. Pour les protocoles d'isolation et de culture cellulaire, consulter les articles ci-dessous^{30, 328-330}.

Brièvement, les cellules ont été incubées pendant 48 heures avec 10 % de sérum provenant d'animaux ou de patients urémiques ou témoins. Les cellules ont ensuite été récoltées et homogénéisées dans de la saline contenant 0,1 mM de PMSF. La concentration protéique des échantillons a été déterminée à l'aide du Micro BCA Protein Assay kit de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). L'expression protéique des transporteurs a été mesurée dans 100 µg de protéines par immunobuvardage de type western tel que décrit ci-dessus.

7. EFFET DU SÉRUM DE RATS URÉMIQUES SUR L'ACTIVITÉ DE LA P-GLYCOPROTÉINE RÉNALE

Les effets du sérum de rats urémique sur l'activité de la P-gp ont été mesurés par le transport transépithélial de la rhodamine à travers une monocouche de cellules HK-2 tel que décrit dans des cellules Caco-2^{25, 52, 332}. Les cellules ont été cultivées sur des *transwells* de polyéthylène terephthalate (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) jusqu'à ce qu'elles forment une monocouche polarisée. Quarante-huit heures avant l'étude de transport, le milieu de culture a été changé pour du milieu contenant 10 % de sérum de rats témoins ou urémiques. Une heure avant l'étude de transport, ce milieu était remplacé par le milieu de transport contenant 10 % de sérum de rats témoins ou urémiques. Au début de l'étude, la rhodamine 123 a été ajoutée au compartiment apical du transwell. Le transport transépithélial de la rhodamine a été mesuré sur une période totale de 150 minutes à 37 °C. Le milieu de transport a été prélevé dans le compartiment basolatéral toutes les 10 minutes. Après 90 minutes, de la cyclosporine a été ajoutée du côté apical et basolatéral. La concentration de rhodamine 123 dans le milieu de transport a été mesurée par spectrofluorométrie.

Les résultats sont exprimés en perméabilité apparente (P_{app}) de la rhodamine 123 telle que calculée par l'équation $P_{app} = (dCr/dt)/(AC_0)$ où dCr/dt représente la vitesse à

laquelle la rhodamine apparaît dans le compartiment basolatéral, A l'aire de la monocouche et C_0 la concentration initiale de rhodamine du côté apical. La moyenne des P_{app} pour les cellules incubées avec du sérum de rat témoins avant l'ajout de cyclosporine a été arbitrairement définie comme représentant 100 %.

Présentation des manuscrits

Effects of chronic renal failure on liver drug transporters

Drug Metab Dispos, 2008. **36**(1): p. 124-8.

Reprinted with permission from the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

Copyright © 2008 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Effects of chronic renal failure on liver drug transporters

Judith Naud M Sc, Josée Michaud M Sc, Francois A. Leblond Ph.D, Stéphane Lefrancois
PhD, Alain Bonnardeaux MD, PhD, and Vincent Pichette MD Ph.D

Service de néphrologie et Centre de recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-
Rosemont, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada (J.N., J.M.,
F.A.L., S.L., A.B., V.P.)

Département de pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec,
Canada (J.N., J.M., V.P.)

Hepatic drug transporters in renal failure

Correspondence should be addressed to: Vincent Pichette MD Ph.D.

Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-
Rosemont

Number of text pages: 14

Number of tables: 2

Number of figures: 4

Number of references: 25

Number of words in Abstract: 230 words

Number of words in Introduction: 550 words

Number of word in Discussion: 1050 words

List of non-standard abbreviations: CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid, Cl_b : biliary clearance, Cl_u : urinary clearance, C_b : biliary concentration, $C_{p,ss}$: concentration in the plasma at steady state, C_u : urinary concentration, CRF: chronic renal failure, CTL: control, GFR: glomerular filtration rate, IL-1: interleukin-1, IL-6: interleukin-6, MRP2: multi-drug-resistance-related-protein type 2, Oatp2: organic-anion-transporting-polypeptide type 2, Oatp3: organic-anion-transporting-polypeptide type 3, P450: cytochrome P450, PBS: Phosphate Buffered Saline, PCR: polymerase chain reaction, Pgp: P-glycoprotein, PMSF: Phenylmethylsulfonylfluoride, PTH: parathyroid hormone, qPCR: quantitative PCR, TNF- α : Tumor-necrosis-factor- α , V_b : biliary volume, V_u : urinary volume

Key words : gene expression, organic anion transporter, ABC transporter, drug excretion, liver

1. ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) is associated with a decrease in liver drug metabolism, particularly mediated by the cytochrome P450. CRF also impedes intestinal drug transporters [mainly P-glycoprotein (P-gp) and multidrug resistance protein (Mrp)]. However, very few studies have evaluated the effects of CRF on liver drug transport. The present study aimed to investigate the repercussions of CRF on liver drug transporters involved in hepatic uptake [organic anion transporting polypeptide (Oatp) 2] and in drug extrusion (P-gp and Mrp2). Two groups of rats were studied: control and CRF. Oatp2, P-gp, and Mrp2 protein expressions and mRNA levels, as well as some of their metabolic activity, were assessed. The effects of CRF serum on drug transporters were also evaluated in cultured hepatocytes. Compared with control, creatinine clearance was reduced by 70% ($p < 0.01$) in rats with CRF. Protein expression and mRNA levels of P-gp were increased by 25 and 40% ($p < 0.01$), respectively, in liver from rats with CRF. Mrp2 protein expression was identical in both groups, whereas its mRNA levels were increased by 35% ($p < 0.01$) in CRF rats. Finally, Oatp2 protein expression was reduced by 35%, whereas its mRNA levels remained unchanged. Similar results were obtained when hepatocytes were incubated with uremic serum. In conclusion, CRF is associated with a decrease in liver transporters involved in drug absorption and an increase in those involved in drug extrusion. Uremic mediators appear to be responsible for these modifications.

2. INTRODUCTION

Several studies have shown that the metabolic clearance of various substrates is reduced in patients with chronic renal failure (CRF) ^{11, 43, 335}. The decrease in drug biotransformation is mainly secondary to alterations in drug metabolism by the liver ³³⁵. Indeed, in rats with experimental renal failure, studies have shown that CRF induces a marked decrease in liver cytochrome P450 (P450) activity secondary to reduced protein and gene expression of selective P450 isoforms, namely, Cyp2c11, Cyp3a1, and Cyp3a2 ⁷⁵. This down-regulation is produced by uremic factors, namely, parathyroid hormone (PTH) ⁸⁴.

Another major route for drug elimination is drug extrusion by transporters. These membranous proteins are located in several epithelia, such as the kidney, the liver, and the intestine. They are implicated not only in renal, biliary, or intestinal drug extrusion but also in their uptake, especially in enterocytes and hepatocytes. Recently, we have shown that CRF could impede several drug transporters in the intestine⁵⁵. Indeed, P-glycoprotein (P-gp) (also known as *mdr1a*, *abcb1* gene family) and multidrug resistance related protein (Mrp) type 2 (also known as cMOAT, *abcc2* gene family) are decreased significantly in the intestine of CRF rats compared with control animals. Organic anion transporting polypeptide (Oatp) type 3 (gene *Slc21a7*) was not modified by uremia. These findings could explain, in part, why patients with CRF have an increase in bioavailability of some drugs ⁵⁵.

Several drug transporters are present in the hepatocytes. Uptake transporters are mainly located on the basolateral membrane of the hepatocytes and mediate drug uptake from the blood circulation to the hepatocytes. Excretion transporters are mainly located on

the apical membrane of the hepatocytes and mediate excretion of the drugs from the hepatocytes to the biliary canaliculi. Most common uptake transporters include Oatp, organic cation transporters, organic anion transporters, and sodium dependent hepatocyte bile-salt uptake system, whereas most common excretion transporters include hepatocellular bile-salt export pump, breast cancer resistance protein, Mrp, and P-gp⁹²⁻⁹⁴.

Very few studies have evaluated the repercussions of CRF on liver drug transporters, and conflicting results have been published. Laouari *et al.* have reported that in CRF rats Mrp2 was increased whereas P-gp was unchanged compared with control animals⁹⁵. However, the severity of renal failure was quite low. This could have confounded the results because it is well established that there is a strong correlation between the severity of CRF and the modulation of metabolizing enzymes (both in the liver and intestine), as well as in drug transporters (in the intestine)^{14, 55}. Furthermore, they did not study the uptake transporters. On the other hand, Sun *et al.* have shown that some uremic toxins present in the serum of CRF patients decrease the uptake of erythromycin in hepatocytes, suggesting an inhibition of Oatp2⁹¹.

The objectives of this study were to determine the effects of CRF on hepatic drug transporters. For this purpose, we measured in control and CRF rats 1) liver protein and gene expression of P-gp (*mdr1a*, *abcb1*), Mrp2 (cMOAT, *abcc2*), and Oatp2 (gene *Slc21a5*), and 2) *in vivo* activity of P-gp. Furthermore, we also evaluated the effect of uremic serum on the drug transporters in cultured hepatocytes.

3. MATERIALS AND METHODS

Experimental Model

Male Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, Montreal, QC, Canada), weighing 200 to 300 g were housed in the Research Center animal care facility and maintained on Harlan Teklad rodent diet (Harlan Teklad Global Diets, Montreal, QC, Canada) and water *ad libitum*. An acclimatization period of at least 3 days was allowed to the animals before any experimental work was undertaken. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals and under the supervision of our local animal care committee.

Experimental Protocol

Studies were performed in two groups of 35 animals each: control pair-fed and CRF. Hepatic drug transporters' protein expression and mRNA levels were measured in 28 rats/group. P-gp activity was measured *in vivo* using clearance of rhodamine 123, a P-gp substrate, in 7 rats/group.

CRF was induced by two-stage five-sixth nephrectomy as previously described⁷⁵. Control pair-fed rats were fed the same amount as CRF rats ate on the previous day and water *ad libitum* to control for the effect of CRF induced malnutrition. At day 41 after the nephrectomy, the rats were housed in metabolic cages, and urine was collected for 24 h to determine the clearance of creatinine. Rats were sacrificed by decapitation 42 days after nephrectomy. Blood was collected for the measurement of serum creatinine and urea.

Preparation of Liver Homogenates

Rat liver was immediately excised following sacrifice, rinsed in ice-cold saline, and flash-frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until homogenate preparation.

Briefly, 200 mg of liver was homogenized in 1 ml of 0.9% NaCl, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride using a Potter-Elvehjem tissue grinder (Wheaton Science Products, Millville, NJ). Samples were then sonicated on ice for 10 s and filtered across a 5- μ m membrane (PALL, St. Laurent, QC, Canada), and aliquots were stored at -80°C up to analysis.

Hepatocyte Isolation and Culture

The hepatocytes were isolated from male Sprague-Dawley rats weighing 200 to 250 g and cultured as previously described^{80, 81}. Hepatocytes were incubated for 48 h in culture medium containing 10% rat control or CRF serum. Hepatocytes were harvested by scraping in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride for protein analysis and in RLT buffer (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) for mRNA analysis. Samples were stored at -80°C up to analysis.

In Vivo Excretion of Rhodamine

To evaluate the *in vivo* activity of P-gp in the liver of CRF and control rats, biliary transport of rhodamine 123 was evaluated on anesthetized rats using an adaptation of the protocol published by Yumoto *et al.*³³². Briefly, the right femoral vein was catheterized with polyethylene tubing, and a 1-ml bolus of saline (0.9% NaCl) was administered, followed by perfusion at 2 ml/h for a 30-min stabilization period. Meanwhile, the left femoral artery, the bile duct, and the urinary bladder were cannulated for blood, bile, and urine collection. After the stabilization period, a bolus of 4.36 ml/kg rhodamine 123 (Sigma, Oakville, ON, Canada) was injected at a concentration of 100 μ M in PBS, followed by perfusion at 2 ml/h for a 50-min stabilization period, at the end of which collection began. Total bile and urine were collected every 10 min for 40 min, and 200 μ l of blood was collected halfway through each collection period under constant rhodamine 123 perfusion. A 2.7-ml/kg bolus of cyclosporine A (4.16 mM), a P-gp inhibitor, was then

administered, followed by perfusion (2 ml/h) of rhodamine 123 (100 μ M) and cyclosporine A (80 μ M) in PBS for a 20-min stabilization period. Finally, bile, urine, and blood were collected for 50 min under constant perfusion. At the end of the protocol, animals were sacrificed, and the liver was excised, flash-frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until analysis.

Western Blot Analysis

Three major hepatic transporters were assessed by Western blot analysis following a previously described protocol^{50, 55}: P-gp, Mrp2, and Oatp2. Each blot was repeated three times, and results were pooled to obtain reported values. Protein expression in control animals was arbitrarily defined as 100%.

P-gp and Mrp2 were detected using monoclonal antibodies from ID Labs (London, ON, Canada): C219 and M2 III-6, respectively. Oatp2 was detected using a rabbit anti-rat Oatp2 antibody from US Biological (Swampscott, MA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), used as a loading control, was detected using rabbit anti-GAPDH from Abcam (Cambridge, MA). In preliminary experiments, we have shown that GAPDH expression is not modulated by CRF compared with controls (data not shown).

mRNA Analysis

At the time of sacrifice, liver was rinsed in ice-cold saline and flash-frozen in liquid nitrogen. Samples were kept at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted from frozen tissue by the RNeasy mini-kit (Qiagen). RNA concentrations were determined by measuring absorbance at a wavelength of 260 nm. One microgram of total RNA was used to prepare cDNA by reverse transcription using Omniscript RT kit from Qiagen and random primer from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). The mRNA encoding for P-gp

(*mdr1a*), Mrp2, Oatp2, and GAPDH was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) using Platinum SybrGreen PCR Supermix UDG from Invitrogen and appropriate primers on an Icyler thermocycler (BioRad, Mississauga, ON, Canada) with 30-s incubation at 94°C, 30-s incubation at 60°C, and 30-s incubation at 72°C. Table VIII shows the sequences of primers used for the quantification of mRNA for each transporter. PCR products were analyzed using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method³³¹ using GAPDH as standard gene.

Rhodamine 123 Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Analysis

Rhodamine was isolated by solid-phase extraction using Sep-Pack Vac 1cc C18 Cartridges (Waters, Milford, MA). Briefly, columns were primed with 100% methanol, washed with water, and acidified samples (20 μl of phosphoric acid/ml sample) were loaded. Columns were then washed with 5% methanol, and the samples were eluted in 100% methanol. Samples were evaporated under nitrogen stream and resuspended to their initial volume in mobile phase (acetic acid 1% and acetonitrile, 60:40, %v/v) for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. HPLC was conducted as described by Yumoto *et al.*³³² on a Beckman System Gold HPLC (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada) with a Jasco FP-920 fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan) at 485-nm excitation and 546-nm emission wavelengths on a Gemini 5- μm C18 110Å column (Phenomenex, Torrance, CA). Sample concentration was obtained by interpolation on a standard curve made with pure rhodamine 123 treated by the same procedure.

Rhodamine Excretion Analysis

Biliary clearance was determined using the equation $\text{Cl}_b = (C_b \times V_b) / (C_{p,ss} \times \text{time})$ where C_b is the rhodamine concentration in the bile, V_b is the bile volume, and $C_{p,ss}$ is the rhodamine concentration in the plasma at steady state. Urinary clearance was determined using the equation $\text{Cl}_u = (C_u \times V_u) / (C_{p,ss} \times \text{time})$ where C_u is the rhodamine concentration in the urine and V_u is the urine volume.

Other Assays

Blood and urine chemistries were determined with an Hitachi 717 autoanalyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Statistical Analysis

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

4. RESULTS

Biochemical Parameters and Body Weight in Control and CRF Rats

Table IX presents the biochemicals and body weight of the two groups of animals studied. Compared with control pair-fed animals, CRF rats had higher levels of plasma creatinine and lower values of creatinine clearance (reduced by 75%; $p < 0.001$).

Protein Expression of Hepatic Transporters in Control and CRF Rats

As shown on Fig. 11, P-gp was induced by 25% ($p < 0.001$) in CRF rats compared with controls, whereas another excretion transporter, Mrp2, remained stable. On the other hand, the import transporter Oatp2 was significantly reduced by 40%. GAPDH, used as a loading control, was not affected by CRF (data not shown). We found a significant correlation between P-gp and Oatp2 protein expression and creatinine clearance ($r = 0.303$, $p < 0.001$ and $r = 0.524$, $p < 0.001$, respectively; data not shown).

mRNA Encoding Hepatic Transporters in Control and CRF Rats

Figure 12 presents the results of the analysis of mRNA coding for liver transporters. There was a significant increase in mRNA for the excretion transporters P-gp and Mrp2 (50 and 40%, respectively; $p < 0.05$), but mRNA expression for the import transporter Oatp2 remained unchanged.

In Vivo Excretion of Rhodamine 123 in Control and CRF Rats

To determine the repercussion of P-gp increase on the excretion of drugs, we evaluated the *in vivo* disposition of rhodamine 123 in control and CRF rats. As shown in Fig. 13, the biliary clearance of rhodamine was significantly increased in CRF rats compared with controls before the addition of the P-gp inhibitor cyclosporine A. However,

inhibition of P-gp with cyclosporine caused a significant decrease in the clearance of rhodamine 123 in both groups, bringing them to the same level. The urinary clearance of rhodamine, on the other hand, was significantly decreased in CRF rats (almost 100%).

Protein and mRNA Expression of Transporters in Hepatocytes Incubated with Uremic Serum for 48h

To determine whether a circulating factor present in the serum of rats with CRF was responsible for the modulation of hepatic transporters, we incubated normal rat hepatocytes with serum from control or CRF rats for 48 h (Fig. 14). Western blot analysis of the hepatocytes showed a significant increase (34%, $p < 0.01$) in P-gp protein expression and a significant decrease (25%, $p < 0.05$) in Oatp2 protein expression in the hepatocytes incubated with serum from CRF rats. On the other hand, Mrp2 remained unchanged as observed *in vivo*. No significant changes were observed in mRNA levels for any of the transporters as opposed to what has been observed *in vivo* (data not shown).

5. DISCUSSION

The effects of CRF on the nonrenal elimination of drugs have been studied for many years. It has been well established that CRF causes a decrease in drug metabolism because of a decrease in liver and intestinal P450 expression and activity^{14, 23}. A decrease in nonrenal drug elimination could also be attributed to a decrease in phase II elimination or in the excretion by hepatic transporters. In this study, we evaluated the effects of CRF on the hepatic expression of two excretion transporters (P-gp and Mrp2) and of one uptake transporter (Oatp2), as well as its effects on P-gp activity.

Our results show that CRF causes a significant 25% increase in P-gp protein expression probably because of the 50% increase in P-gp mRNA levels. On the other hand, although we found a significant 40% increase in Mrp2 mRNA expression, its protein expression was not affected by CRF. Finally, CRF causes a decrease in Oatp2 protein expression, which is not associated with a decrease in mRNA levels. Similar results were obtained when we incubated normal rat hepatocytes with serum from rats with CRF for 48 h. We also evaluated hepatic P-gp activity by measuring the biliary clearance of rhodamine in anesthetized rats. We found a 60% significant increase in the excretion of rhodamine that can be inhibited by cyclosporine A, a P-gp inhibitor, suggesting that the up-regulation of P-gp protein expression is associated with an increase in activity.

Very few studies have evaluated the effect of CRF on liver drug transporter. A study previously published by Laouari *et al.* showed a significant increase in liver Mrp2 protein and mRNA expression 6 weeks after nephrectomy was performed on rats⁹⁵. Our results confirmed the increase in Mrp2 mRNA levels but not on the protein expression, which could be explained by the specificity of antibodies used. On the other hand, Laouari *et al.*⁹⁵ also found no changes in P-gp protein and mRNA in the liver of nephrectomised rats, whereas we found a significant increase. The explanation for these conflicting results is not clear. It could be attributed to the degree of severity of the CRF. In their study,

nephrectomized rats presented a 60% decrease in creatinine clearance, whereas our rats have a 75% decrease in creatinine clearance. Indeed, we found a significant correlation between the severity of the renal failure as measured by the creatinine clearance and the up-regulation in P-gp, suggesting that, as CRF worsens, P-gp increases.

Our results also show that CRF affects the hepatic transporters in different ways. We have shown a decrease in the expression of the uptake transporter Oatp2 and an increase in the expression and activity of the excretion transporter P-gp. Those transporters work together to eliminate substrates into the bile. Because uptake by Oatp transporters is the first step in the elimination of many xenobiotics, making the compounds available to the detoxification enzymes and the extrusion transporters, and can be a rate-limiting step^{23, 62} the inhibition of Oatp2 we found in rats suffering from CRF can probably explain the decrease in drug elimination by the liver, as suggested also by Sun *et al.*^{23, 91}. The increase in P-gp expression and activity could be an adaptive response to the large quantities of organic anions circulating in CRF.

Our results also differ from those we previously published concerning intestinal transporters in CRF rats⁵⁵. We had found significant decreases in intestinal P-gp and Mrp2 protein expression associated with a decrease in their transport activity across the intestinal membrane. We attributed the protein expression decrease to a post-translational mechanism because we found no changes in their mRNA expression. Also, we had found no significant change in Oatp2 and Oatp3 protein and mRNA levels in the intestine of rats with CRF⁵⁵.

Thus, it appears that CRF affects the expression of drug transporters differently in the main elimination organs, i.e., liver and intestine. However, in both organs, we have shown that the changes in protein and/or mRNA levels for the transporters were caused by a circulating factor present in the serum of rats with CRF. Indeed, we have shown that incubating uremic serum with enterocytes or Caco-2 cells leads to a decrease in P-gp

expression and function⁵⁵. Similarly, in the present study, we showed that uremic serum also modifies the expression of drug transporters in the hepatocytes (Fig. 14). The different potential factors include proinflammatory cytokines, PTH, and uremic toxins, all of which are highly increased in CRF. Interestingly, the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α is known to increase P-gp protein and mRNA expression and P-gp activity in cultured rat hepatocytes in a time- and dose-dependent manner³³⁶. It is also known to decrease rhodamine 123 transport in Caco-2 cells, a colon carcinoma cell line³³⁷, making it a prime candidate to be responsible of the observed effects of CRF on drug transporters. Sun *et al.* have also shown that the uremic toxin 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid can directly inhibit erythromycin uptake via a decrease in Oatp2 protein expression and activity⁹¹.

Despite pair-feeding of the rats, we still observed a slight difference (<10%) in body weight between the CRF and control pair-fed rats. Very few studies have evaluated the effects of malnutrition on hepatic transporters. Lee *et al.* showed that severe protein and caloric malnutrition caused a decrease in protein expression and activity of liver P-gp³³⁸. Furthermore, two studies showed that fasting can cause an increase in Oatp2 expression in rat³³⁹ and mouse³⁴⁰ liver. However, because the magnitude of malnutrition of the rats involved in this study is low and because the effects observed in extreme conditions (such as severe malnutrition or fasting) are contrary to the effects of CRF observed in the present study, we do not believe that the weight difference between our two groups could have influenced our results.

In conclusion, this study shows that CRF is associated with important modifications in the expression and activity of the different liver drug transporters. It appears that uremic toxins or proinflammatory cytokines accumulated in CRF could be responsible for these modifications, which seem to be affecting canalicular and basolateral transporters in a different manner.

6. REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
- Belliard AM, Lacour B, Farinotti R and Leroy C (2004) Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells. *J Pharm Sci* **93**:1524-1536.
- Chen C, Cheng X, Dieter MZ, Tanaka Y and Klaassen CD (2007) Activation of cAMP-dependent signaling pathway induces mouse organic anion transporting polypeptide 2 expression. *Mol Pharmacol* **71**:1159-1164.
- Dietrich CG, Martin IV, Porn AC, Voigt S, Gartung C, Trautwein C and Geier A (2007) Fasting induces basolateral uptake transporters of the SLC family in the liver via HNF4alpha and PGC1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**:G585-590.
- Gao B, St Pierre MV, Stieger B and Meier PJ (2004) Differential expression of bile salt and organic anion transporters in developing rat liver. *J Hepatol* **41**:201-208.
- 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.
- Hirsch-Ernst KI, Ziemann C, Foth H, Kozian D, Schmitz-Salue C and Kahl GF (1998) Induction of mdr1b mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* **176**:506-515.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B and Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**:322-342.
- Laouari D, Yang R, Veau C, Blanke I and Friedlander G (2001) Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**:F636-645.

- 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.
- Lee YM, Song IS, Kim SG, Lee MG, Chung SJ and Shim CK (2003) The suppressed expression and functional activity of hepatic P-glycoprotein in rats with protein-calorie malnutrition. *J Pharm Sci* **92**:1323-1330.
- 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.
- Matzke GR and Frye RF (1997) Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* **16**:205-231.
- Meier PJ and Stieger B (2002) Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* **64**:635-661.
- 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.
- Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond FA, Mitchell A, Jones C, Bonnardeaux A and Pichette V (2007) Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:978-985.
- Pichette V and Leblond FA (2003) Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* **4**:91-103.
- Sun H, Frassetto L and Benet LZ (2006) Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* **109**:1-11.

- Sun H, Huang Y, Frassetto L and Benet LZ (2004) Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos* **32**:1239-1246.
- Takikawa H (2002) Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **9**:443-447.
- Talbert RL (1994) Drug dosing in renal insufficiency. *J Clin Pharmacol* **34**:99-110.
- Touchette MA and Slaughter RL (1991) The effect of renal failure on hepatic drug clearance. *DICP* **25**:1214-1224.
- Yamazaki M, Akiyama S, Nishigaki R and Sugiyama Y (1996) Uptake is the rate-limiting step in the overall hepatic elimination of pravastatin at steady-state in rats. *Pharm Res* **13**:1559-1564.
- Yumoto R, Murakami T, Nakamoto Y, Hasegawa R, Nagai J and Takano M (1999) Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J Pharmacol Exp Ther* **289**:149-155.

7. FOOTNOTES

This work was financed by the Canadian Institute for Health Research (CIHR)

Reprints should be sent to: Vincent Pichette MD Ph.D.
Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada
H1T 2M4

8. TABLES

Tableau VIII Nucleotide sequences of PCR primers. (DMD 2008, liver drug transporters)

Gene	Primer sequence (5'-3')	Predicted Product size
<i>mdr1a</i>	Sens: ATCAACTCGCAAAAGCATCC	116 bp
	Anti-sens : AATTCAACTTCAGGATCCGC	
<i>mrp2</i>	Sens: GCTGGTTGGAAACTTGGTCG	93 bp
	Anti-sens: CAACTGCCACAATGTTGGTC	
<i>oatp2</i>	Sens: TGTGATGACCTGTGATAATTTTCCA	81 bp
	Anti-sens: TTCTCCACATATAGTTGGTGCTGAA	
<i>gapdh</i>	Sens: TAAAGGGCATCCTGGGCTACACT	200 bp
	Anti-sens: TTA CTCCTTGGAGGCCATGTAGG	

Mdr1a, mrp2 and gapdh primers were designed based on published cDNA sequences with the help of the Jellyfish and BLASTIN 2.2.1 computer programs³⁴¹. Oatp2 sequence was as previously published by Gao et al.³⁴². The resulting PCR products were sequenced on an ABI Prism 3100 analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

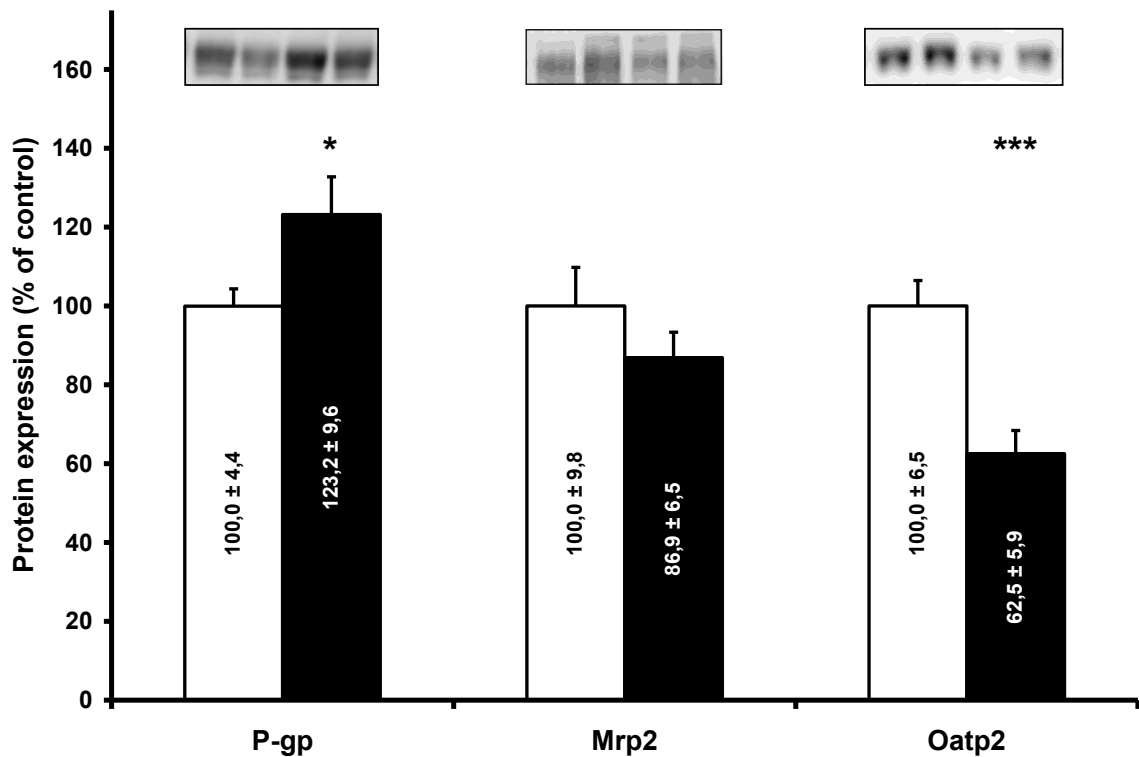
Tableau IX Characteristics of control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)

	Control (n=35)	CRF (n=35)	p-value
Body Weight (grams)	359.1 ± 6.1	322.0 ± 10.3	< 0.01
Serum creatinine (µmol/L)	52.5 ± 0.9	189.8 ± 18.8	< 0.001
Creatinine clearance (µL/100 g of body weight/min)	323.2 ± 12.2	82.1 ± 8.3	< 0.001
Serum urea (mmol/L)	5.0 ± 0.2	40.1 ± 5.8	< 0.001

Data are the mean ± SEM. Measurements were made at the time of sacrifice. Urinary collection was begun the day before. Blood urea and creatinine, and urine creatinine were determined with a Hitachi 717 autoanalyser (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Québec, Canada).

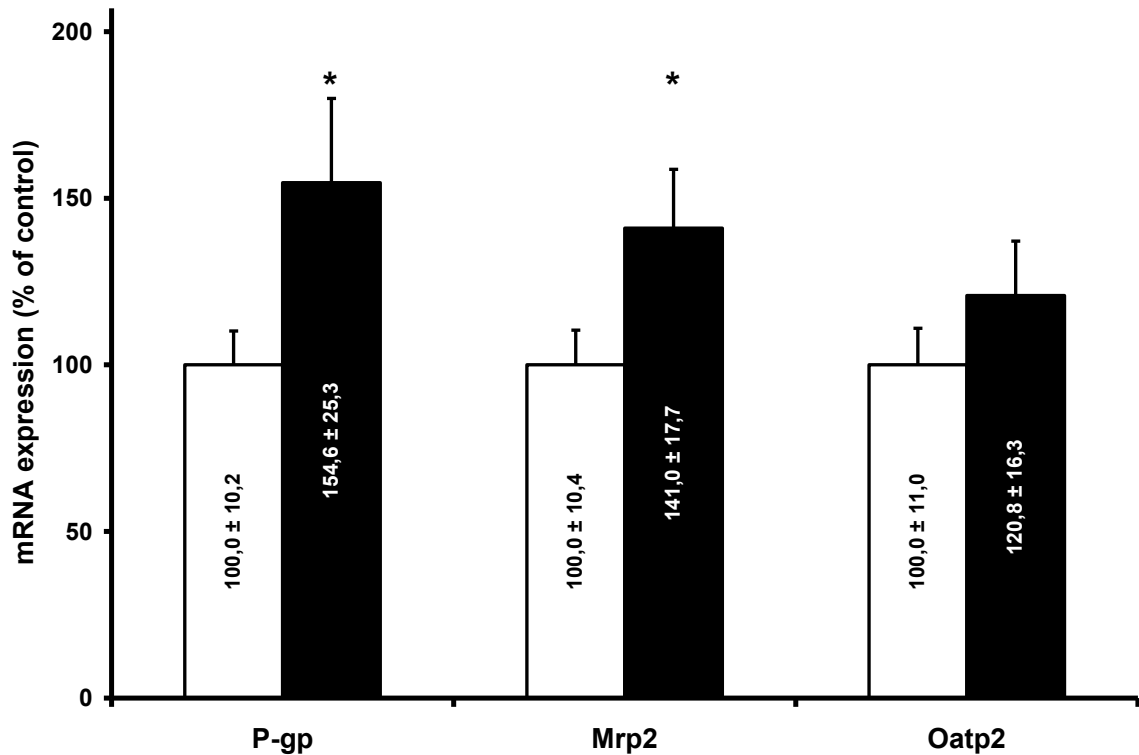
9. FIGURES AND LEGENDS

Figure 11 Protein expression of hepatic transporters in control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)



*Protein expression of hepatic transporters in whole liver homogenate from control (white bars) and CRF rats (black bars). Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for hepatic transporters were standardized by dividing them by the value obtained for GAPDH. The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100%. Representative blots for each transporter are shown in insert. Data are the mean \pm SEM of 28 experiments in each group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ as compared to control.*

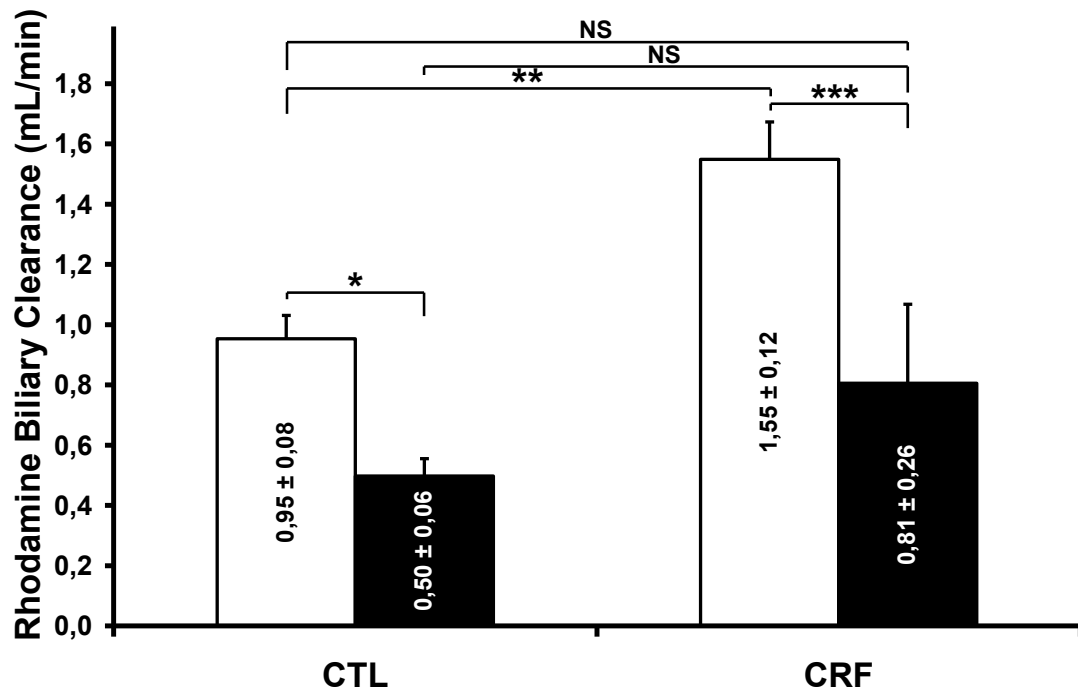
Figure 12 mRNA expression of hepatic drug transporters in CTL and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)



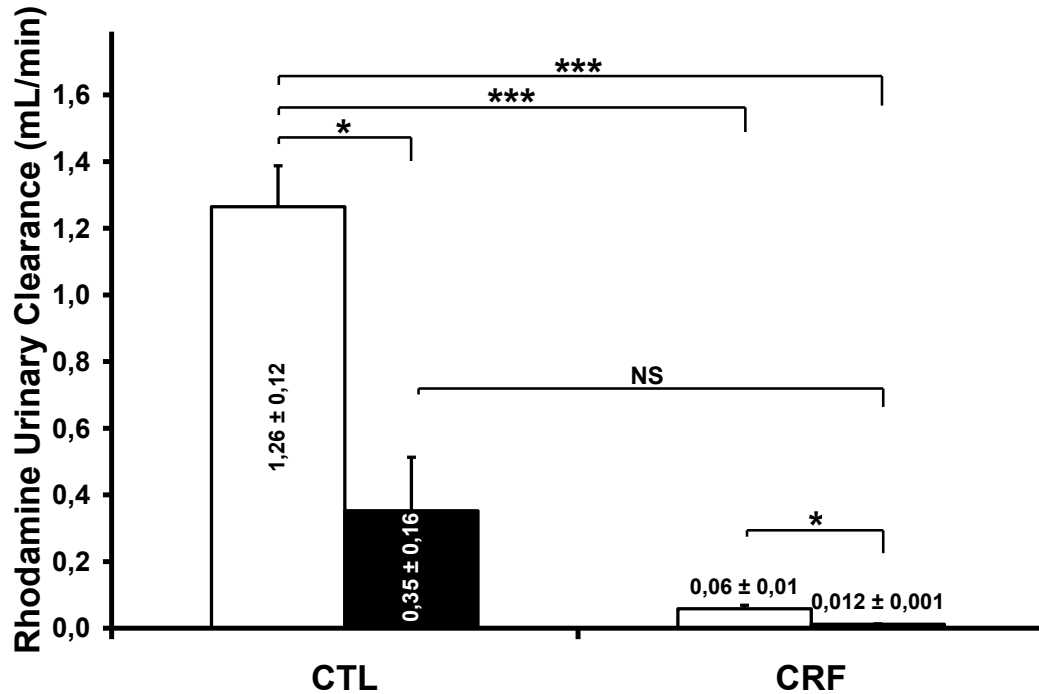
*mRNA encoding hepatic drug transporters in liver from control (white bars) and CRF rats (black bars) were measured by quantitative real time PCR. mRNA levels are expressed in relative quantities using the $\Delta\Delta C_T$ method³³¹ with GAPDH as a standard gene. The number of copies of control rats was arbitrarily defined as 100%. Data are the mean \pm SEM of 28 experiments in each group. * $p < 0.05$ as compared to control rats.*

Figure 13 In vivo excretion of rhodamine 123 in control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)

A.

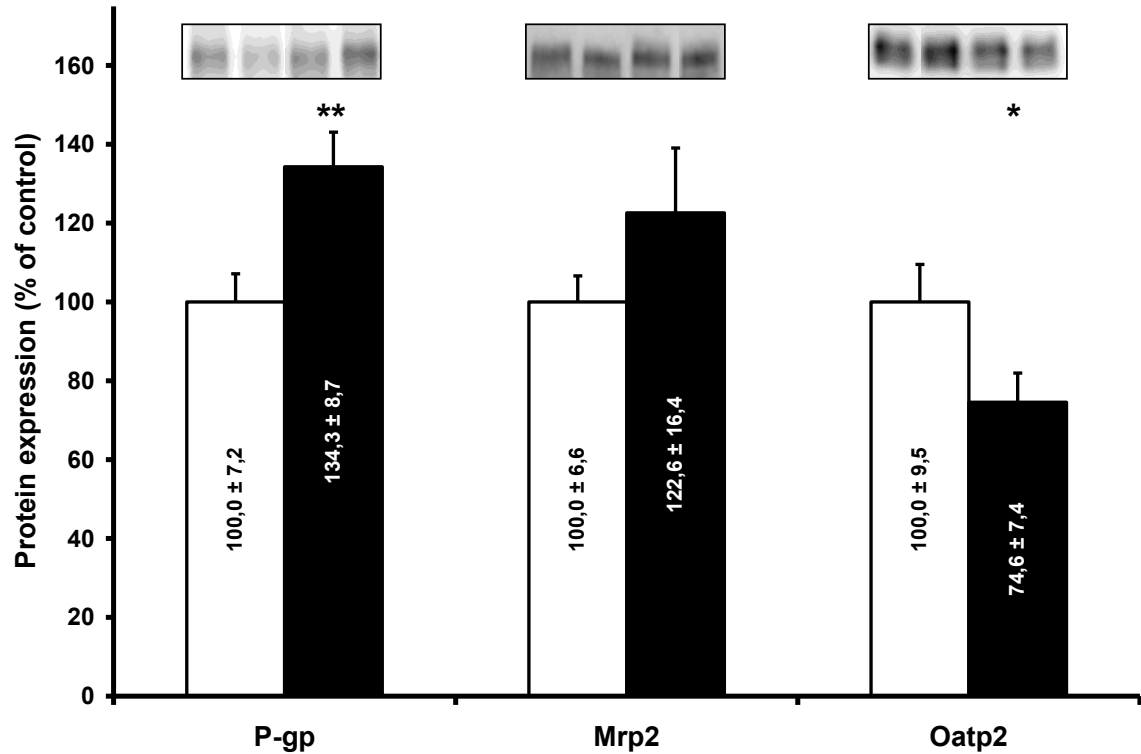


B.



In vivo excretion of rhodamine 123 in control and CRF rats. a) Biliary excretion of rhodamine 123 in anesthetized rats infused with rhodamine 123 in the absence (white bars) and presence (black bars) of the P-gp inhibitor cyclosporine A. Biliary clearance was determined using the equation $Cl_b = (C_b \times V_b) / (C_{p,ss} \times \text{time})$ where C_b is the rhodamine concentration in the bile, V_b is the bile volume and $C_{p,ss}$ is the rhodamine concentration in the plasma at steady state. b) Urinary excretion of rhodamine 123 in anesthetized rats in the absence (white bars) and presence (black bars) of the P-gp inhibitor cyclosporine A. Urinary clearance was determined using the equation $Cl_u = (C_u \times V_u) / (C_{p,ss} \times \text{time})$ where C_u is the rhodamine concentration in the urine and V_u is the urine volume. Data are the mean \pm SEM of 7 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, NS = no statistical difference

Figure 14 P-gp, Mrp2 and Oatp2 protein expression in hepatocytes incubated with serum from control and CRF rats. (DMD 2008, liver drug transporters)



*Level of P-gp, Mrp2 and Oatp2 protein expression in hepatocytes incubated with 10% serum from control (white bars) and CRF rats (black bars) for 48h. Protein bands are expressed in standardized densitometry units (See figure 11). Data are the mean \pm SEM of 12 experiments. Representative blots for each transporter are shown in insert. No significant changes were observed in mRNA levels in any group (data not shown). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to hepatocytes incubated with serum from control rats.*

Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats.

Drug Metab Dispos. 2011 Aug;39(8):1363-9

Reprinted with permission from the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

Copyright © 2011 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats

Judith Naud MSc, Josée Michaud MSc, Stéphanie Beauchemin MSc, Marie-Josée Hébert MD, Michel Roger MD PhD, Stéphane Lefrancois PhD, Francois A. Leblond PhD and Vincent Pichette MD PhD

Service de néphrologie et Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada (J.N., J.M., S.B., S.L., F.A.L., V.P.)

Département de pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada (J.N., J.M., V.P.)

Centre de recherche de l'Hôpital Notre-Dame du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada (M-J.H., M.R.)

Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada (M.R.)

Kidney drug transporters in renal failure

Correspondence should be addressed to: Vincent Pichette MD Ph.D.

Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-
Rosemont

Number of text pages: 18

Number of tables: 2

Number of figures: 6

Number of references: 42

Number of words in Abstract: 230 words

Number of words in Introduction: 589 words

Number of word in Discussion: 1199 words

List of non-standard abbreviations: CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid, CRF: chronic renal failure, CTL: control, CYP: cytochrome P450, IS: indoxyl sulfate, Mrp: multidrug resistance related protein, Npt1: Sodium-dependent phosphate transport protein 1, Oat: organic anion transporter, Oatp: organic anion transporting polypeptide, PAH: para-amino-hippuric acid, P_{app} : Apparent permeability, PBS: Phosphate Buffered Saline, PCR: polymerase chain reaction, P-gp: P-glycoprotein, PMSF: Phenylmethylsulfonylfluoride, Urat1: urate transporter 1.

1. ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) leads to decreased drug renal clearance due to a reduction in the glomerular filtration rate. However, little is known about how renal failure affects renal metabolism and elimination of drugs. Because both depend on the activity of uptake and efflux by renal transporters as well as enzymes in tubular cells, the purpose of this study was to investigate the effects of CRF on the expression and activity of select renal drug transporters and cytochrome P450. Two groups of rats were studied: control and CRF (induced by 5/6 nephrectomy). Compared with control rats, we observed reductions in the expression of both protein and mRNA of Cyp1a, sodium-dependent phosphate transport protein 1, organic anion transporter (Oat)1, 2, and 3, OatK1/K2, organic anion-transporting polypeptide (Oatp)1 and 4c1, P-glycoprotein, and urate transporter 1, whereas an induction in the protein and mRNA expression of Mrp2, 3, and 4 and Oatp2 and 3 was observed. Cyp3a expression remained unchanged. Similar results were obtained by incubating a human proximal tubule cell line (human kidney-2) with sera from CRF rats, suggesting the presence of uremic modulators. Finally, the renal elimination of [³H]digoxin and [¹⁴C]benzylpenicillin was decreased in CRF rats, compared with controls, as shown by a 4- and 9-fold accumulation, respectively, of these drugs in kidneys of rats in CRF. Our results demonstrate that CRF affects the expression and activity of several kidney drug transporters leading to the intrarenal accumulation of drugs and reduced renal clearance that could, at least partially, explain the tubular toxicity of many drugs.

2. INTRODUCTION

The kidneys play a major role in the elimination of endogenous and exogenous compounds from the bloodstream by the following three processes: glomerular filtration, tubular secretion, and tubular reabsorption. It has been known for decades that chronic renal failure (CRF) reduces the renal clearance of filtrated drugs and endogenous substances through a decrease in the glomerular filtration rate. However, little is known about how renal failure affects renal secretion and reabsorption in the proximal tubule. Both these processes are dependent on the activity of uptake and efflux renal transporters expressed in tubular cells (Inui et al., 2000; Russel et al., 2002; Sekine et al., 2006; El-Sheikh et al., 2008; Feng et al., 2010; Giacomini et al., 2010; Masereeuw and Russel, 2010; Nagai and Takano, 2010).

Tubular transporters are members of two families: ATP-binding cassette transporters and solute carriers. The former include multidrug-resistance related proteins (Mrp) and P-glycoprotein (P-gp), which depend on ATP phosphorylation. They are efflux transporters expressed either on the apical brush-border membrane where they excrete drugs in the urine or on the basolateral membrane where they participate in the reabsorption of compounds from the urine. On the other hand, solute carrier transporters include the sodium-dependent phosphate transport protein 1 (Npt1), organic anion transporters (Oat), organic anion transporting polypeptides (Oatp), and urate transporters (URAT) and are mostly, but not exclusively, uptake transporters located on either the apical or basolateral membrane where they participate in the uptake of compounds from the bloodstream or from the urine into the tubular cell. The most important drug transporters are illustrated in Fig. 15 (Hsiang et al., 1999; Russel et al., 2002; Masereeuw and Russel, 2010).

Recently, we have demonstrated that CRF can affect the expression of intestinal P-gp and Mrp2 and hepatic P-gp and Oatp2 in rats, thus increasing the bioavailability and decreasing the biliary elimination of various drugs (Naud et al., 2007; Naud et al., 2008).

We have also demonstrated that CRF can decrease extrarenal elimination of drugs by decreasing intestinal and hepatic drug metabolism by cytochrome P450 (P450) and phase II drug metabolism (Leblond et al., 2000; Leblond et al., 2001; Leblond et al., 2002; Simard et al., 2008). Finally, we have shown a nearly 100% decrease in the urinary clearance of rhodamine 123, a P-gp substrate, in nephrectomized rats (Naud et al., 2007; Naud et al., 2008). Thus, it is possible that CRF could affect drug transport and metabolism in the diseased kidney.

To date, very few studies have been published concerning the effects of CRF on renal drug transport. Ji *et al.* demonstrated a decrease in the protein expression of the organic cation transporter 2 2 weeks after rats were submitted to 5/6 nephrectomy, whereas Oat1 and Oat3 expression remained unchanged (Ji et al., 2002). In addition, Laouari *et al.* showed an increase in both the protein and mRNA expression of Mrp2 6 weeks post-5/6 nephrectomy, whereas P-gp expression remained stable (Laouari et al., 2001).

The objective of this study was to investigate the effects of CRF on the expression and activity of the major renal drug transporters and cytochrome P450. For this purpose, we have compared renal protein and mRNA expression in CRF and control rats of 1) Cyp1a, Cyp3a, Npt1, Oat1, 2, and 3, Oatp1, 2, 3, and 4c1, Mrp2, 3, and 4, P-gp, and URAT1 and 2) the *in vivo* renal accumulation of [³H]digoxin and [¹⁴C]benzylpenicillin. Furthermore, we have studied the effects of uremic serum on the expression of drug transporters and cytochromes P450 in a proximal tubule cell line as well as on the activity of P-gp in the same cell line.

3. MATERIALS AND METHODS

Experimental Model

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Portage, MI), weighing 176 to 225 g, were housed in the Research Center animal care facility and maintained on Harlan Teklad rodent diet (Harlan Teklad Global Diets, Montreal, QC, Canada) and water *ad libitum*. Animals were allowed an acclimatization period of at least 7 days before the first nephrectomy was performed. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for the care and use of laboratory animals and under the supervision of our local animal care committee.

Experimental Protocol

Studies were performed in two groups of animals: control pair-fed and CRF. The expression levels of protein and mRNA of kidney drug transporters were measured in 12 rats per group. Drug transporter activity was measured *in vivo* through the renal accumulation of [³H]digoxin and [¹⁴C]benzylpenicillin in at least six rats per group per experiment.

Chronic renal failure was induced by two-stage 5/6 nephrectomy as described previously (Leblond et al., 2001). Every animal had free access to water, but to limit the effects of CRF-induced malnutrition, control pair-fed rats were fed the same amount of chow that CRF rats ate on the previous day. We have previously demonstrated that the calorie reduction in control animals induced by pair feeding did not influence the expression of drug-metabolizing enzymes (Leblond et al., 2001) and drug transporters (our unpublished data). At day 41 after nephrectomy, the rats were housed in metabolic cages, and urine was collected for a 24-h period to determine the clearance of creatinine. Rats were sacrificed by decapitation 42 days after nephrectomy for organ and blood collection,

or underwent a radiolabeled drug accumulation study. After the animals were sacrificed, the remnant kidney of CRF rats and the left kidney of CTL rats were immediately excised, rinsed in ice-cold saline, and flash frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until membrane preparation or mRNA extraction was performed. Blood was collected for the measurement of serum creatinine and urea and for bioassays with proximal tubule cells.

Preparation of Crude Kidney Membranes

Rat kidney biopsies (200 mg) were homogenized in 1 ml of homogenizing buffer (250 mM sucrose, 10 mM HEPES, and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) using a Potter-Elvehjem tissue grinder (Wheaton Science Products, Millville, NJ). Differential centrifugation was used to obtain a crude membrane fraction (Chow et al., 2010). In brief, the kidney homogenates were centrifuged at $9000g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was then spun at $33,000g$ for 60 min at 4°C , and the resulting pellet was resuspended in phosphate-buffered saline containing 0.1 mM PMSF. Samples were then sonicated on ice for 10 s to ensure homogeneity. Protein concentration was determined using the method of Lowry *et al.* (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as a reference protein. Aliquots were stored at -80°C until use in Western blot analysis.

Western Blot Analysis

Major renal drug transporters were assessed by Western blot analysis following a previously described protocol (Leblond et al., 2002; Naud et al., 2007; Naud et al., 2008). Protein expression in control animals was arbitrarily defined as 100%.

P-gp and Mrp2 were detected using monoclonal antibodies from ID Labs (London, ON, Canada), C219 and M2 III-6, respectively. Npt1, Oat2, Oat3, OatK1/K2, Oatp2, and Oatp3 were detected using antibodies from Alpha Diagnostic International (San Antonio,

TX). Anti-Mrp3 was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), anti-Mrp4 was from Novus Biological (Littleton, CO), anti-Oat1 and anti-Urat1 were from Abbiotec (San Diego, CA), anti-Oatp1 was from Millipore Corporation (Billerica, MA), and anti-Oatp4c1 was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Cyp1a and Cyp3a were detected using primary antibodies from US Biological (Swampscott, MA) and Daiichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan), respectively. Villin-1, a protein specific to tubular brush-border cells (Cartier et al., 1993), used as a loading control, was detected using rabbit anti-Villin-1 from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). The antibodies used recognized rat and human proteins.

mRNA Analysis

Total RNA was extracted from frozen tissue using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined by measuring absorbance at a wavelength of 260 nm. One microgram of total RNA was used to prepare cDNA by reverse transcription using the SuperScript VILO cDNA Synthesis kit from Invitrogen. The mRNA encoding for P-gp (mdr1a), Mrp2, Oatp2, and villin-1 was measured by quantitative real-time PCR as described previously (Naud et al., 2007; Naud et al., 2008). Other genes were measured using appropriate TaqMan gene expression assays from Applied Biosystems (Carlsbad, CA). Table X shows the TaqMan gene expression assays used for the quantification of mRNA for each transporter. PCR products were analyzed using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using villin-1 as a standard gene.

In Vivo Intrarenal Accumulation of Radiolabeled Drugs

The intrarenal accumulation of radiolabeled drugs was used to determine the activity of the kidney drug transporters. Two different drugs were tested. [^{14}C]Benzylpenicillin is an antibiotic and a known substrate for Oat3 and Mrps (Windass et

al., 2007; Choi et al., 2009). [³H]Digoxin is a cardiac glycoside and a known substrate for Oatp4c1 and P-gp (Mikkaichi et al., 2004; Yamaguchi et al., 2010). Digoxin (0.5 mg/kg) was administered via intraperitoneal injection, and benzylpenicillin (5 mg/kg CTL, 1 mg/kg CRF) was administered via intramuscular injection. Both were injected with an approximate 1:1500 hot/cold ratio so the milligram amount of radioactive compound wouldn't factor into the final dosage calculation. To evaluate renal accumulation, similar plasma concentrations of drugs need to be attained, and therefore CRF rats received a lower dose of benzylpenicillin because of its reduced clearance and short-term accumulation in CRF. For digoxin, there is no short-term accumulation in patients with CRF, thus patients with CRF receive the same loading dose as patients with normal renal function with an adjustment in their maintenance dose (Jelliffe, 1968; Jelliffe, 1969; Gault et al., 1980). Because this study with rats requires a single loading dose, no digoxin dose adjustment was necessary to obtain plasma concentrations similar to those observed in CTL rats. Rats were anesthetized using isoflurane 2 h after injection, and a cardiac puncture was performed to recover the maximal amount of blood in heparinized tubes to obtain plasma. Remnant left kidneys were harvested, rinsed in ice-cold phosphate buffered saline, weighed, minced, and placed in 2 ml of Solvable solution (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) at 56°C overnight. Dissolved kidney volumes were noted, and radioactivity was counted on a Wallac 1409 beta counter (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) in 1 ml of dissolved kidney after addition of 4 ml of ScintiSafe Plus Scintillant (Fisher, Ottawa, ON, Canada). Plasma radioactivity was counted in 2 ml of plasma with 4 ml of Scintillant. The results were calculated as a ratio between the radioactivity count (counts per minute) for 1 g of kidney and the radioactivity count for 1 ml of plasma. The mean for the CTL groups was arbitrarily defined as 100%.

Effects of Uremic Serum on Kidney Drug Transporters

To determine whether uremic serum could affect the expression and function of kidney drug transporters, two sets of experiments were conducted using

human kidney-2 (HK-2) cells, a proximal tubule cell line. The first studied the effects of uremic serum on drug transporters' protein expression, whereas the second studied the effects of uremic serum on P-gp activity.

Incubation of HK-2 Cells with Uremic Serum

HK-2 cells were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and seeded into 25-mm² uncoated polystyrene flasks (Sarstedt, St. Leonard, QC, Canada) in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) containing 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Inc., Etobicoke, ON, Canada). The cells were subcultured 4 days later into two 75-mm² uncoated polystyrene flasks and expanded by 1:3 subcultures every 3 to 4 days. For an experiment, culture medium was replaced by Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% CTL or CRF rat serum (one serum per flask). After 48 h of culture, the cells were trypsinized, pelleted, and homogenized in phosphate-buffered saline containing 0.1 mM PMSF. Protein concentrations were determined using the Micro BCA Protein Assay kit from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). One hundred micrograms was loaded for Western blot analysis of each studied transporter, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a loading control. It was detected using rabbit anti-GAPDH from Abcam Inc. (Cambridge, MA).

Rhodamine 123 Transport on HK-2 Cells

The effects of uremic serum on P-gp function was evaluated in HK-2 cells using the trans-epithelial transport of rhodamine 123 across HK-2 monolayers. Cells were subcultured into 12-well, 0.4- μ m pore size polyethylene terephthalate (PET)-Transwell chambers (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada) and allowed up to 7 days to reach confluence and form a polarized monolayer. Forty-eight hours before the transport experiment, culture medium was replaced by culture medium containing 10% CTL or CRF

rat serum. The transport experiment was conducted as reported previously with Caco-2 cells (Naud et al., 2007).

Other Assays

Blood and urine chemistries were determined with an Architect C1600 clinical analyzer (Abbott Laboratories, Saint-Laurent, QC, Canada).

Statistical Analysis

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

4. RESULTS

Biochemical Parameters and Body Weight in Control and CRF Rats

Table XI presents the biochemical parameters and body weights of both groups of rats. Compared with control animals, CRF rats had higher levels of serum creatinine and urea and lower creatinine clearance (reduced by 80%, $p < 0.001$). There was no difference in body weight between control and CRF rats.

Protein Expression of Kidney Drug Transporters and Cytochrome P450 in CRF Rats

Figure 16 presents the measured protein expression of select drug transporters and cytochrome P450 from a crude kidney membrane preparation from control and CRF rats. The level of expression of Mrp2, 3, and 4 and of Oatp2 and 3 were significantly increased by more than 2-fold in CRF rat kidneys compared with control rat kidneys as shown by Western blot. On the other hand, the expression of Cyp1a, Npt1, Oats, Oatp1, Oatp4c1, P-gp, and Urat1 was significantly reduced from 50 to 85% in CRF rats compared with controls. The only measured protein that remained stable was Cyp3a. We found significant correlations ($p < 0.05$) between protein expression and creatinine clearance for Cyp1a ($r=0.787$), Mrp2 ($r=0.662$), Mrp3 ($r=-0.719$), Mrp4 ($r=-0.626$), Npt1 ($r=0.687$), Oat1 ($r=0.716$), Oat2 ($r=0.720$), Oat3 ($r=0.723$), OatK1/K2 ($r=0.861$), Oatp1 ($r=0.717$), Oatp2 ($r=-0.586$), Oatp3 ($r=-0.684$), Oatp4c1 ($r=0.757$), P-gp ($r=0.811$), and Urat1 ($r=0.603$).

mRNA Expression of Kidney Drug Transporters and Cytochrome P450 in CRF Rats

Figure 17 presents the results of the analysis of mRNA coding for kidney transporters and cytochrome P450. There was a significant increase in the mRNA expression of Mrp2, 3, and 4 (40, 92, and 72%, respectively) and of Oatp2 and 3 (125 and 180%, respectively) in CRF rats compared with controls. On the other hand, there were

significant decreases in the mRNA expression of Cyp1a (95%), Npt1 (45%), Oat1 (75%), Oat2 (95%), Oat3 (70%), Oatp1 (90%), Oatp4c1 (90%), Oatp5 (95%), P-gp (50%), and Urat1 (75%) in CRF rat kidneys compared with controls. Only Cyp3a mRNA remained stable between the groups.

In Vivo Accumulation of Radiolabeled Drugs in the Kidney of Rats with Surgically Induced Chronic Renal Failure

Two hours after administration, plasma radioactivity of digoxin was similar in the control and CRF rats, whereas the plasma radioactivity of benzylpenicillin was slightly elevated by 17% in CRF rats compared with control animals (Fig. 18). There was a 9-fold greater accumulation of [¹⁴C]benzylpenicillin and a 4-fold accumulation of [³H]digoxin in the kidney of CRF rats, compared with control rat kidneys. These data were obtained via a ratio of radioactivity for 1 g of kidney/1 ml of plasma.

Protein Expression of Renal Drug Transporters and Cytochrome P450 in HK-2 Cells Incubated with the Serum of CRF Rats

Protein expression of select drug transporters and cytochrome P450 was measured in HK-2 cells, a proximal tubule cell line, incubated for 48 h with serum from control or CRF animals (Fig. 19). There was a significant decrease in the protein expression of Cyp1a (45%), Npt1 (30%), Oat3 (30%), Oatp1 (25%), and P-gp (35%) when incubated with CRF serum compared with control serum. On the other hand, the expression of Mrp2, Mrp4, and Oatp2 was significantly increased by 45, 35, and 30%, respectively. Only the expression of Cyp3a remained unaltered. The expression of the reporter protein GAPDH was unchanged between both groups. These results were similar in directional change to those obtained *in vivo* in CRF rats.

Apical to Basolateral Transport of Rhodamine 123 in HK-2 Cells Incubated with the Serum of CRF Rats

The effect of uremic serum on P-gp function was evaluated in HK-2 cells using the transepithelial transport of rhodamine 123 across HK-2 monolayers (Fig. 20). We found a nearly 50% increase in the apical to basolateral apparent permeability (P_{app}) of rhodamine 123 across HK-2 cells preincubated with uremic sera compared with control. Moreover, the addition of P-gp inhibitor cyclosporine did not affect the P_{app} of rhodamine 123 in cells incubated with uremic sera but caused a great increase in permeability in HK-2 cells preincubated with control sera.

5. DISCUSSION

The purpose of this study was to evaluate the effect of chronic renal failure on the expression and activity of select drug transporters and cytochrome P450 in the rat kidney. We have demonstrated that CRF affects drug transporters in different manners. The protein and mRNA expression of many transporters were significantly reduced (Npt1, Oat1, Oat2, Oat3, OatK1/K2, Oatp1, Oatp4c1, P-gp, and Urat1), whereas those of Mrp2, Mrp3, Mrp4, Oatp2, and Oatp3 were significantly up-regulated. In addition, the protein and mRNA expression of Cyp1a were significantly reduced, whereas those of Cyp3a remained unchanged.

These results differ from those previously published by Ji *et al.*, who had shown no changes in the expression of Oat1 and Oat3 2 weeks after nephrectomy (Ji *et al.*, 2002). We hypothesize that 2 weeks was too short to fully develop the long-term effects of renal failure. Our results also confirm and differ from those obtained by Laouari *et al.* (Laouari *et al.*, 2001), who had demonstrated an increase in the protein and mRNA expression of Mrp2 3 and 6 weeks after nephrectomy, but no change in the expressions of P-gp at 3 weeks, and an increase in P-gp mRNA after 6 weeks. We confirmed the results obtained for Mrp2 expression, but we have demonstrated a 50% decrease in P-gp protein and mRNA expressions 6 weeks after nephrectomy. The reasons for this discrepancy remain unclear.

We found significant correlations between the clearance of creatinine and the protein expression of transporters and Cyp1a, indicating that changes in transporter expression are directly related to the severity of renal failure. We also found significant correlations between the protein and mRNA expression of transporters and Cyp1a (data not shown), suggesting that changes in protein expression are the result of a decrease in mRNA levels. In addition, we have demonstrated that the modifications in drug transporter expression and activity occurred in response to one or many factors present in the sera from uremic rats, as demonstrated by the changes in protein expression of transporters and P450

enzymes in HK-2 cells, which are similar to those observed *in vivo*, although they are of smaller magnitude, probably due to the shorter length of exposure to uremic toxins.

Several uremic toxins accumulate in renal failure. They are breakdown products of metabolic pathways that are no longer being eliminated by the kidneys. Those that were most studied in relation to drug transport are indoxyl sulfate, *para*-aminohippuric acid, and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid. They are known substrates and inhibitors of organic anion transporters including Oat1, Oat3, and Mrps (Leier et al., 2000; Deguchi et al., 2002; Tsutsumi et al., 2002; Deguchi et al., 2004; Deguchi et al., 2005; Sun et al., 2006; Enomoto and Niwa, 2007) and even play a role in the progression of renal failure as demonstrated by the induction of renal damage by indoxyl sulfate (Niwa and Ise, 1994; Niwa et al., 1994; Niwa et al., 1997; Sun et al., 2006). The down-regulation of uptake transporters Oat1, Oat2, and Oat3 and of bidirectional transporters OatK1/K2, Oatp1, Oatp4c1, and Urat1 combined with the up-regulation of efflux transporters Mrp2, Mrp3, and Mrp4 and of bidirectional transporters Oatp2 and Oatp3, all of which are anion transporters, could thus be an adaptive and protective response against uremic toxin accumulation and renal toxicity. Still, these changes do not seem to be sufficient to prevent the accumulation of organic anions as demonstrated by the 9-fold accumulation of [¹⁴C]benzylpenicillin, a substrate of OATs and Mrps, in the kidneys of animals suffering from CRF compared with controls and thus could probably be insufficient to prevent the progression of renal failure by uremic toxin toxicity. Competitive inhibition of the transporters by uremic toxins could explain this phenomenon.

Although most efflux transporter expression was increased in the current study, P-gp expression and its *in vitro* activity were significantly reduced by chronic renal failure and uremic sera. P-gp differs from most other studied transporters as it transports mostly cationic or neutral substrates (Masereeuw et al., 2000). Thus, we have evaluated the *in vivo* accumulation of the P-gp substrate [³H]digoxin. Digoxin is also a substrate of the uptake

transporter Oatp4c1 (Mikkaichi et al., 2004). Although plasma concentrations of digoxin were similar between the control and CRF animals, there was a significant 4-fold increase in the intrarenal accumulation of digoxin in CRF kidneys. This indicates a reduced secretion of digoxin most likely due to the reduced expression of its efflux transporter P-gp. This result could be reproduced *in vitro* by the incubation of a HK-2 monolayer with sera from uremic rats where we demonstrated a significant increase in the P_{app} of rhodamine 123 from the apical to the basolateral side of the monolayer. This argues in favor of a decrease in the transport activity of P-gp, facilitating the migration of rhodamine 123 toward the basolateral side. The addition of the P-gp inhibitor cyclosporine to both sides of the monolayer caused an increase in the P_{app} of rhodamine in the CTL group, demonstrating that rhodamine 123 transport is P-gp-dependent, but induces no significant change in the CRF group, indicating a very weak P-gp activity even before the addition of cyclosporine. This could explain the nearly 100% reduction in rhodamine 123 urinary clearance that we reported previously (Naud et al., 2008) and strongly suggests that a factor present in uremic serum has a modulatory effect on P-gp protein expression and activity, similar to what we previously showed in the intestine and liver (Naud et al., 2007; Naud et al., 2008).

We also measured the protein and mRNA expression of Cyp1a and Cyp3a in the kidneys of control and CRF rats. They are drug metabolizing enzymes with wide substrate variability. CYP3A is implicated in the biotransformation of nearly 60% of drugs metabolized by P450 enzymes in humans, such as acetaminophen, cyclosporine, erythromycin, etc. (Guengerich, 2003), whereas Cyp1a is mostly implicated in the biotransformation of environmental pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons and tobacco smoke or substances such as caffeine and tamoxifen (Guengerich, 2003). In the kidney, Cyp1a and Cyp3a are expressed in the tubular cells, where they can activate or deactivate their substrates before urinary secretion. We have demonstrated a significant decrease in the expression of Cyp1a in CRF that could cause intrarenal toxicity of Cyp1a-active substrates, if they were to accumulate in the kidney because of reduced drug

transporters. On the other hand, Cyp3a expression seems unaffected by CRF that would allow normal activation or deactivation of substrates within the renal tubular cells. Toxicity could occur if activated metabolites were to remain trapped inside the tubular cells because of reduced drug transport.

In conclusion, this study demonstrates that CRF significantly alters the expression and activity of select renal drug transporters that could contribute to reduced renal clearance as well as renal drug accumulation and nephrotoxicity. The modifications in drug transporters induced by uremic serum were similar to that produced by CRF in our animal model, suggesting that uremic toxins such as indoxyl sulfate, *para*-aminohippuric acid, and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, which are known to modulate drug transporters (Leier et al., 2000; Deguchi et al., 2002; Tsutsumi et al., 2002; Deguchi et al., 2004; Deguchi et al., 2005; Sun et al., 2006; Enomoto and Niwa, 2007), could be responsible for the alterations in renal transporters *in vivo*.

6. AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Participated in research design: Naud, Hébert, Roger, Lefrancois, Pichette

Conducted experiments: Naud, Michaud, Beauchemin, Leblond

Performed data analysis: Naud, Leblond, Pichette

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Naud, Hébert, Roger, Lefrancois, Leblond, Pichette

7. REFERENCES

- Cartier N, Lacave R, Vallet V, Hagege J, Hellio R, Robine S, Pringault E, Cluzeaud F, Briand P, Kahn A and et al. (1993) Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J Cell Sci* **104** (Pt 3):695-704.
- Choi MK, Kim H, Han YH, Song IS and Shim CK (2009) Involvement of Mrp2/MRP2 in the species different excretion route of benzylpenicillin between rat and human. *Xenobiotica* **39**:171-181.
- Chow EC, Sun H, Khan AA, Groothuis GM and Pang KS (2010) Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on transporters and enzymes of the rat intestine and kidney in vivo. *Biopharm Drug Dispos* **31**:91-108.
- Deguchi T, Kouno Y, Terasaki T, Takadate A and Otagiri M (2005) Differential contributions of rOat1 (Slc22a6) and rOat3 (Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats. *Pharm Res* **22**:619-627.
- Deguchi T, Kusuhara H, Takadate A, Endou H, Otagiri M and Sugiyama Y (2004) Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. *Kidney Int* **65**:162-174.
- Deguchi T, Ohtsuki S, Otagiri M, Takanaga H, Asaba H, Mori S and Terasaki T (2002) Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int* **61**:1760-1768.
- El-Sheikh AA, Masereeuw R and Russel FG (2008) Mechanisms of renal anionic drug transport. *Eur J Pharmacol* **585**:245-255.
- Enomoto A and Niwa T (2007) Roles of organic anion transporters in the progression of chronic renal failure. *Ther Apher Dial* **11**:S27-31.
- Feng B, LaPerle JL, Chang G and Varma MV (2010) Renal clearance in drug discovery and development: molecular descriptors, drug transporters and disease state. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**:939-952.

- Gault MH, Churchill DN and Kalra J (1980) Loading dose of digoxin in renal failure. *Br J Clin Pharmacol* **9**:593-597.
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczyński MJ and Zhang L (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**:215-236.
- Guengerich FP (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* **3**:194-204.
- Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP and Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* **274**:37161-37168.
- Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H and Moriyama Y (2010) Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J Biol Chem* **285**:26107-26113.
- Inui KI, Masuda S and Saito H (2000) Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int* **58**:944-958.
- Jelliffe RW (1968) An improved method of digoxin therapy. *Ann Intern Med* **69**:703-717.
- Jelliffe RW (1969) Administration of digoxin. *Dis Chest* **56**:56-60.
- Ji L, Masuda S, Saito H and Inui K (2002) Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int* **62**:514-524.
- Laouari D, Yang R, Veau C, Blanke I and Friedlander G (2001) Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**:F636-645.
- 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, 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 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.
- Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y and Keppler D (2000) ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney Int* **57**:1636-1642.
- 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.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Masereeuw R and Russel FG (2010) Therapeutic implications of renal anionic drug transporters. *Pharmacol Ther* **126**:200-216.
- Masereeuw R, Terlouw SA, van Aubel RA, Russel FG and Miller DS (2000) Endothelin B receptor-mediated regulation of ATP-driven drug secretion in renal proximal tubule. *Mol Pharmacol* **57**:59-67.
- Masuda S, Saito H, Nonoguchi H, Tomita K and Inui K (1997) mRNA distribution and membrane localization of the OAT-K1 organic anion transporter in rat renal tubules. *FEBS Lett* **407**:127-131.
- Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, Chaki T, Masuda S, Tokui T, Eto N, Abe M, Satoh F, Unno M, Hishinuma T, Inui K, Ito S, Goto J and Abe T (2004) Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3569-3574.
- Nagai J and Takano M (2010) Molecular-targeted approaches to reduce renal accumulation of nephrotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**:1125-1138.

- Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond FA, Mitchell A, Jones C, Bonnardeaux A and Pichette V (2007) Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:978-985.
- Naud J, Michaud J, Leblond FA, Lefrancois S, Bonnardeaux A and Pichette V (2008) Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug Metab Dispos* **36**:124-128.
- Niwa T and Ise M (1994) Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* **124**:96-104.
- Niwa T, Ise M and Miyazaki T (1994) Progression of glomerular sclerosis in experimental uremic rats by administration of indole, a precursor of indoxyl sulfate. *Am J Nephrol* **14**:207-212.
- Niwa T, Tsukushi S, Ise M, Miyazaki T, Tsubakihara Y, Owada A and Shiigai T (1997) Indoxyl sulfate and progression of renal failure: effects of a low-protein diet and oral sorbent on indoxyl sulfate production in uremic rats and undialyzed uremic patients. *Miner Electrolyte Metab* **23**:179-184.
- Russel FG, Masereeuw R and van Aubel RA (2002) Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* **64**:563-594.
- Sekine T, Miyazaki H and Endou H (2006) Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**:F251-261.
- 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.
- Sun H, Frassetto L and Benet LZ (2006) Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* **109**:1-11.
- Tsutsumi Y, Deguchi T, Takano M, Takadate A, Lindup WE and Otagiri M (2002) Renal disposition of a furan dicarboxylic acid and other uremic toxins in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:880-887.

- Windass AS, Lowes S, Wang Y and Brown CD (2007) The contribution of organic anion transporters OAT1 and OAT3 to the renal uptake of rosuvastatin. *J Pharmacol Exp Ther* **322**:1221-1227.
- Yamaguchi H, Sugie M, Okada M, Mikkaichi T, Toyohara T, Abe T, Goto J, Hishinuma T, Shimada M and Mano N (2010) Transport of estrone 3-sulfate mediated by organic anion transporter OATP4C1: estrone 3-sulfate binds to the different recognition site for digoxin in OATP4C1. *Drug Metab Pharmacokinet* **25**:314-317.

8. FOOTNOTES

This work was financed in part by the Canadian Institute for Health Research (CIHR), La Fondation Hôpital Maisonneuve-Rosemont (La néphrologie et son Impact), Le consortium de néphrologie de l'Université de Montreal and Astellas Pharma Canada Inc. The opinions expressed in this paper are those of the authors. Astellas Pharma Inc. had no role in the design of the study, data analysis and interpretation, and in the manuscript preparation. V Pichette, MJ Hébert, S Lefrancois and M Roger are supported by career awards from Fonds de la recherche en santé du Québec.

Reprint requests should be sent to: Vincent Pichette MD Ph.D.

Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada
H1T 2M4

9. TABLES

Tableau X TaqMan gene expression assays used for Real-time PCR. (DMD 2011, kidney drug transporters)

	Gene	TaqMan Gene Expression Assay
Cyp1a1	<i>cyp1a1</i>	Rn00487218_m1
Cyp3a1	<i>cyp3a23</i>	Rn01412959_g1
Mrp3	<i>abcc3</i>	Rn00589786_m1
Mrp4	<i>abcc4</i>	Rn01465702_m1
Npt1	<i>slc17a1</i>	Rn00591970_m1
Oat1	<i>slc22a6</i>	Rn00568143_m1
Oat2	<i>slc22a7</i>	Rn00585513_m1
Oat3	<i>slc22a8</i>	Rn00580082_m1
OatK1/K2	<i>slc21a4</i>	Rn00755673_m1
Oatp1	<i>slco1a1</i>	Rn00755148_m1
Oatp3	<i>slco1a5</i>	Rn00578150_m1
Oatp4c1	<i>slco4c1</i>	Rn01427754_m1
Oatp5	<i>slco1a6</i>	Rn00590562_m1
Urat1	<i>slc22a12</i>	Rn01479631_m1

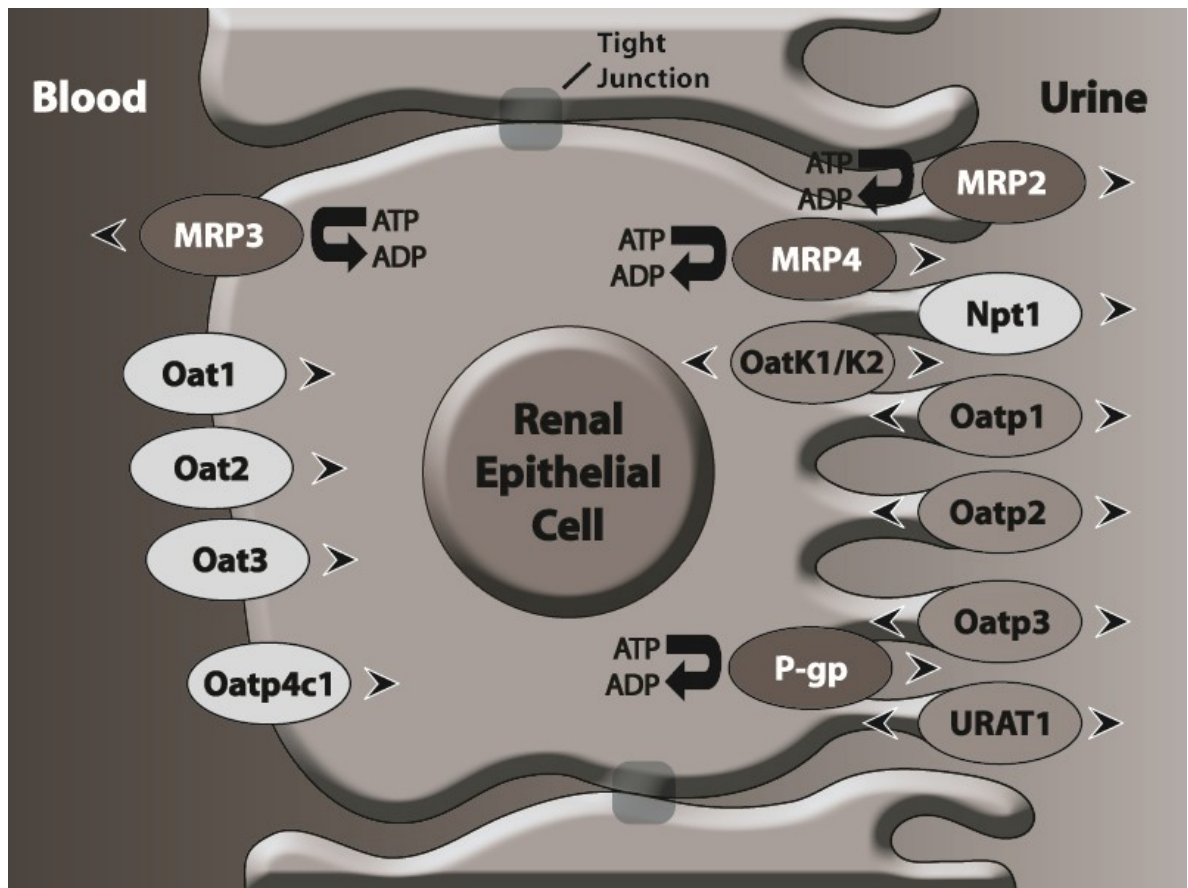
Tableau XI Characteristics of control and CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)

	Control (n=20)	CRF (n=20)	p-value
Body Weight (grams)	342,7 ± 30.9	327.4 ± 55.1	0.29
Serum creatinine (µmol/L)	62.5 ± 4.0	229.5 ± 86.2	p<0.001
Creatinine clearance (µL/100 g of body weight/mi)	313.1 ± 49.9	63.7 ± 35.4	p<0.001
Serum urea (mmol/L)	4.5 ± 1.0	38.2 ± 19.0	p<0.001

Data are the mean ± SD. Measurements were made at the time of sacrifice. Urinary collection was begun the day before. Blood urea and creatinine, and urine creatinine were determined with an Architect C1600 clinical analyzer (Abbott, Saint-Laurent, QC, Canada).

10. FIGURES AND LEGENDS

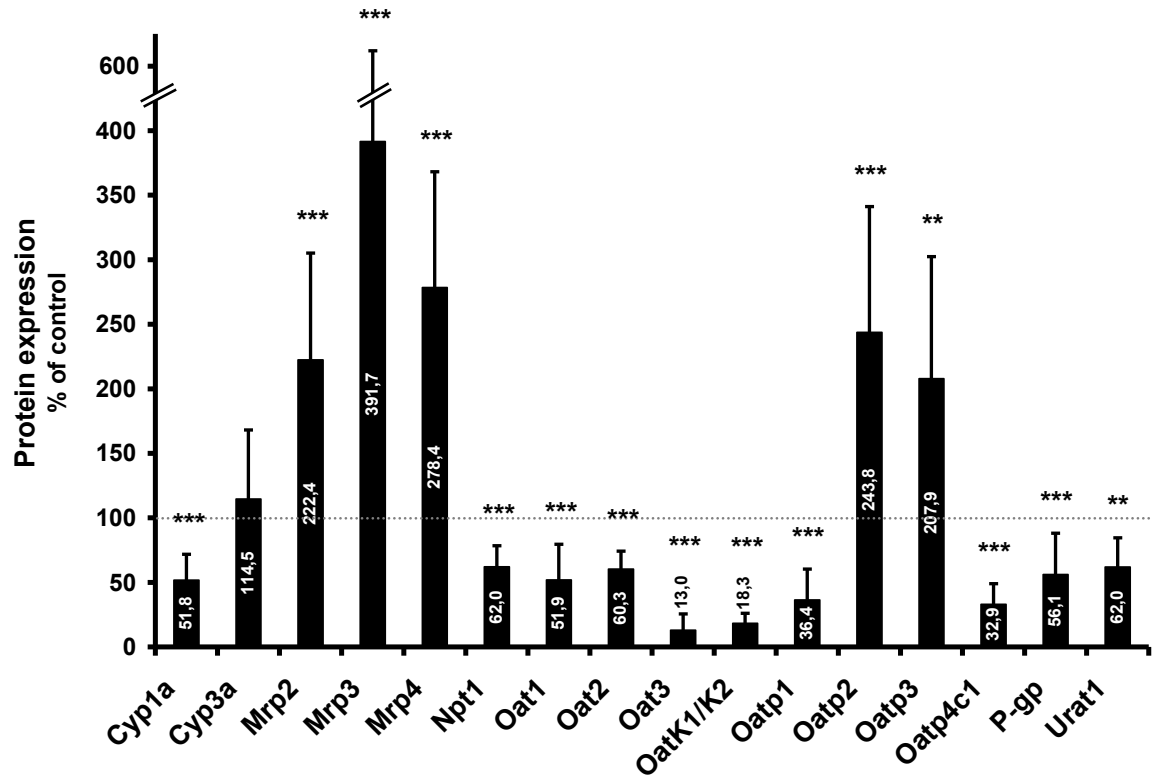
Figure 15 Renal drug transporters. (DMD 2011, kidney drug transporters)

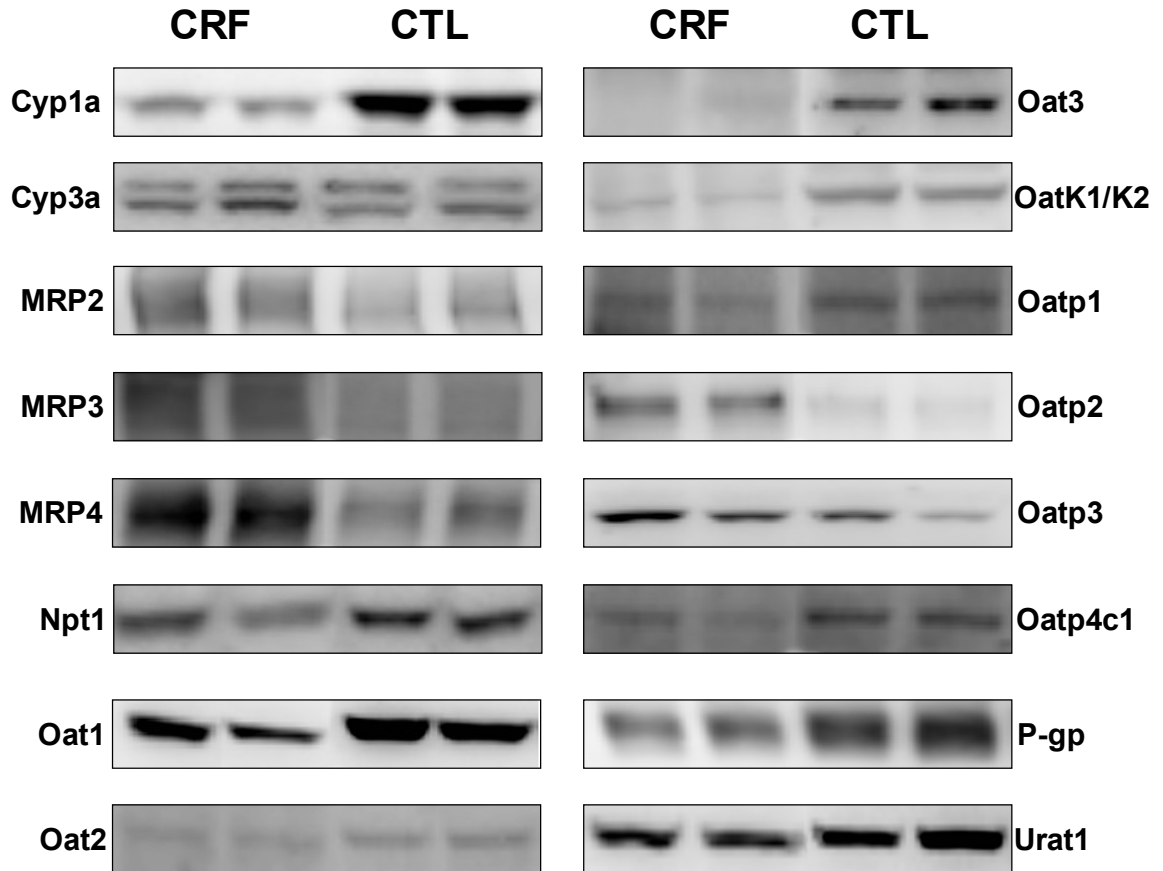


Most of these transporters are located in the proximal tubular cells, except Mrp3, which is found in distal tubular cells, and OatK2, which can also be found in cortical-collecting duct cells. Oatps and OatK1/K2 are widely known to be bidirectional transporters, and it is not yet determined whether they favor organic anion reabsorption or secretion, hence the arrows indicating both directions (Masuda et al., 1997; Inui et al., 2000; Deguchi et al., 2002; Masereeuw and Russel, 2010). It is also believed that Urat1 can participate in organic anion secretion and reabsorption via exchange mechanisms (Masereeuw and Russel, 2010). Npt1 acts as an organic anion and urate exporter (Iharada et al., 2010).

Figure 16 Protein expression of select kidney drug transporters and cytochrome P450 in CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)

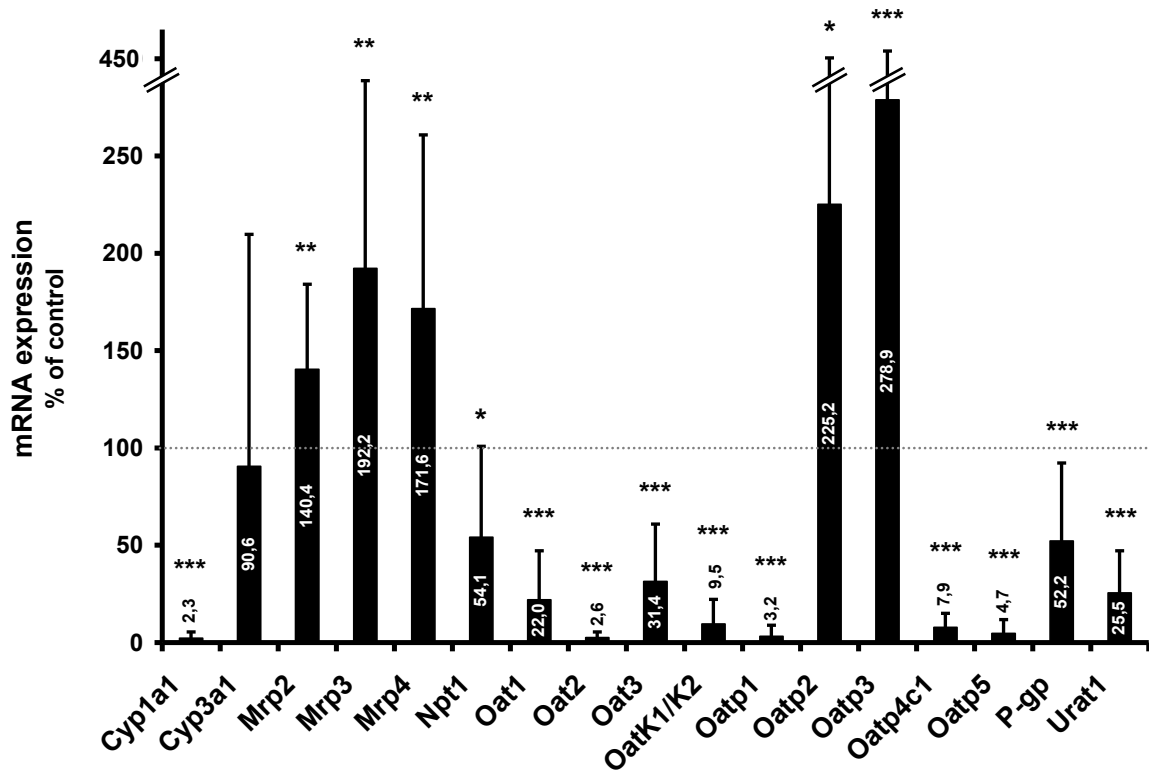
A.



B.

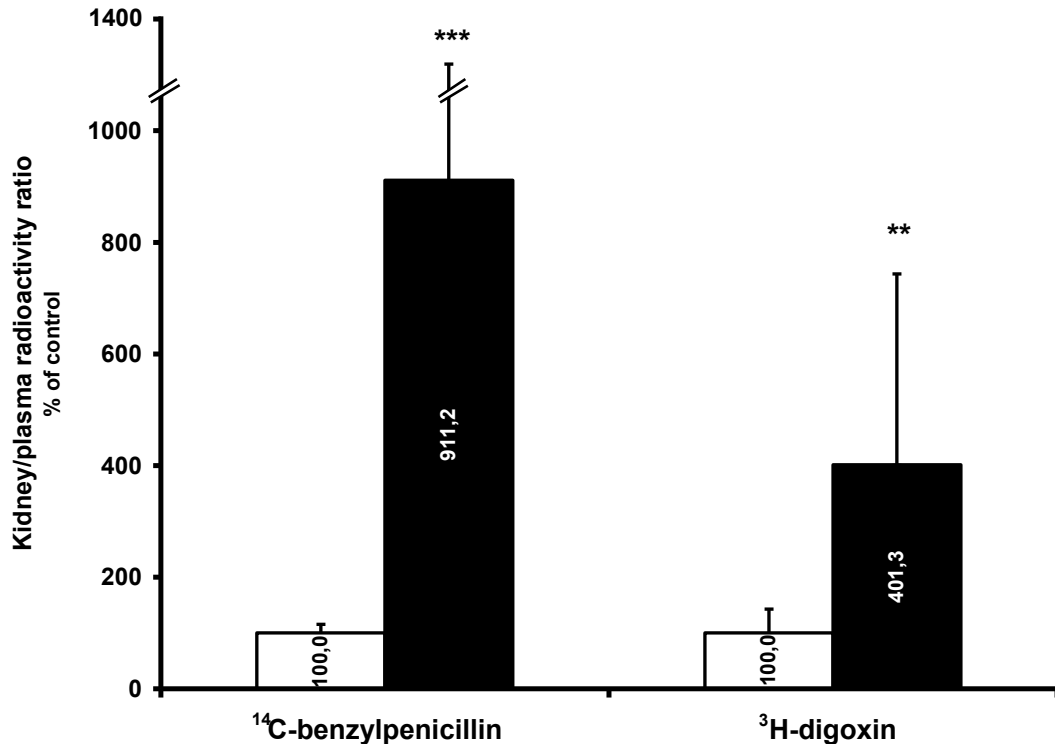
A. Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for transporters and P450 enzymes were standardized by dividing them by the value obtained for villin-1. The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100% (dotted line). The graph shows the mean expression in CRF rats expressed as percentage of controls \pm S.D. of 12 rats in each group. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with CTL rats. **B.** Representative Western blots for each transporter or P450. Each blot presents bands for two CRF (left) and two control (right) rats.

Figure 17 mRNA expression of select kidney drug transporters and cytochrome P450 in CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)



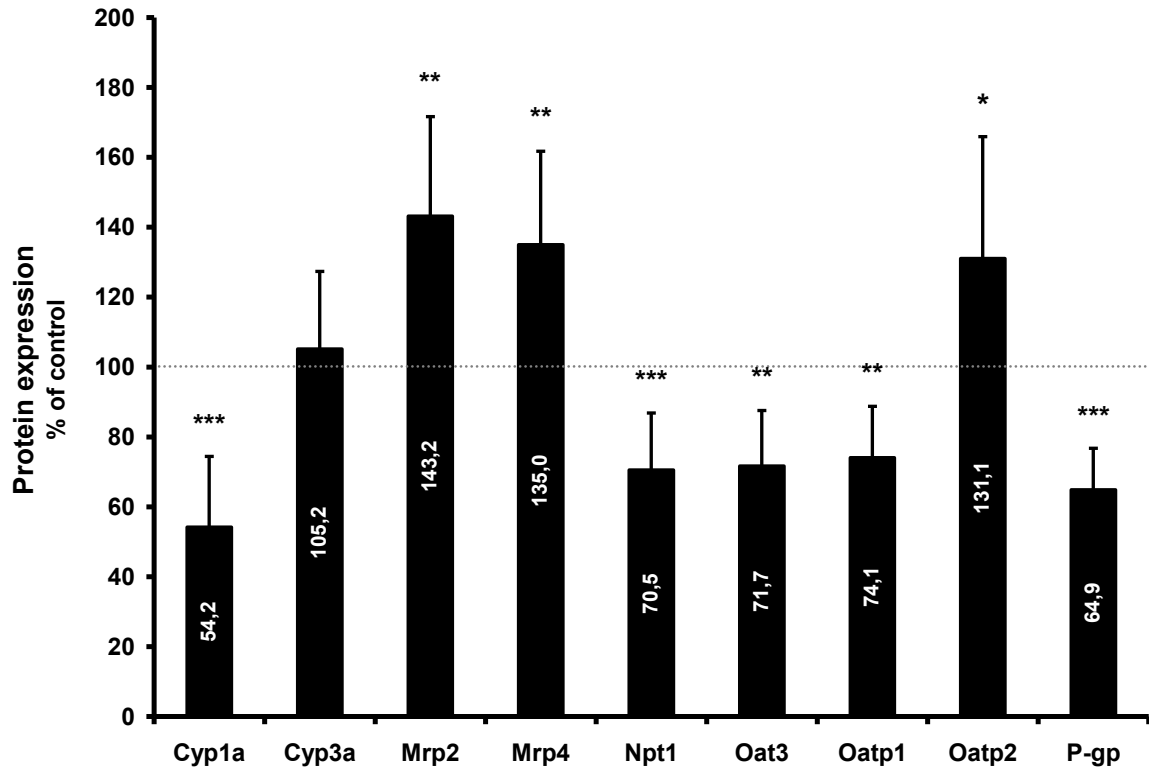
*mRNA encoding renal drug transporters and P450 enzymes in control and CRF rats were measured by quantitative real-time PCR. mRNA levels are expressed in relative quantities using the $\Delta\Delta CT$ method (Livak and Schmittgen, 2001) with villin-1 as a reference gene. The mean relative quantity of control rats was arbitrarily defined as 100% (dotted line). The graphic shows the mean expression in CRF rats expressed as percentage of controls \pm S.D. of 12 rats in each group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with control rats.*

Figure 18 In vivo accumulation of radiolabeled drugs in the kidney of rats with surgically induced chronic renal failure. (DMD 2011, kidney drug transporters)



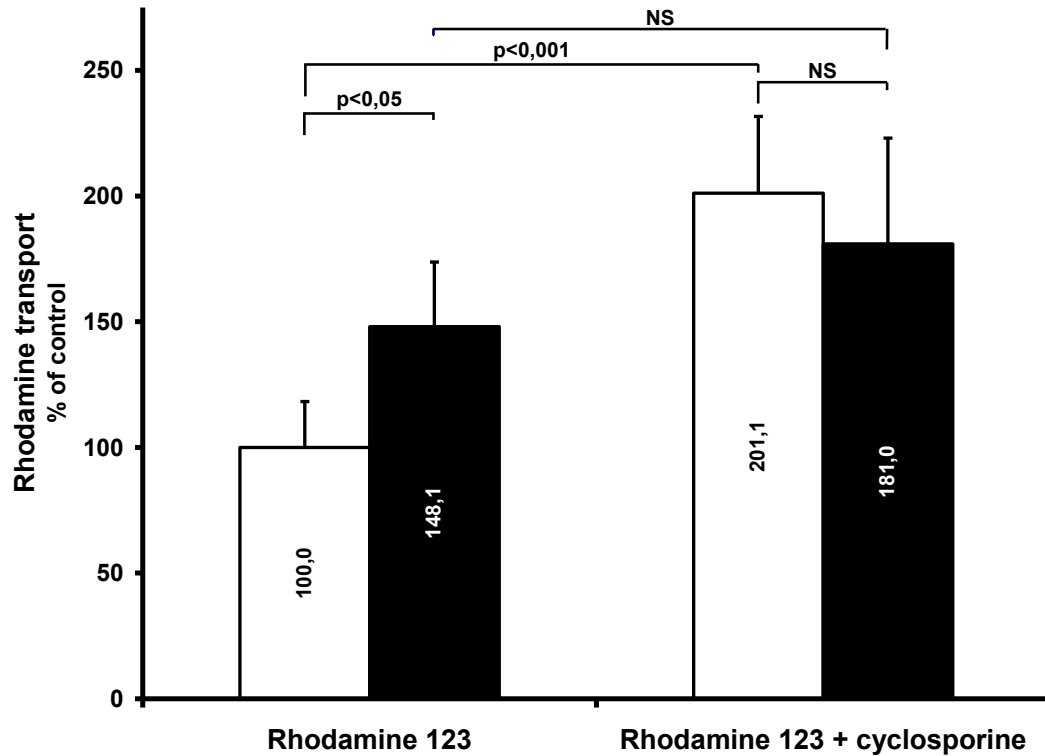
The kidney/plasma radioactivity (counts per minute) ratio for 1 g of kidney/1 ml of plasma in CTL (open bars) and CRF (filled bars) rats, after a 2-h latency period after drug injection, is shown. CRF rats received one-fifth of the CTL rats' dose of benzylpenicillin but had a 17% ($p < 0.05$) higher plasma radioactivity of benzylpenicillin, whereas, with equal dosing between the groups, the digoxin plasma radioactivity was similar in the CTL and CRF rats although it had a tendency to be approximately 15% increased in CRF, but this result did not reach statistical significance (data not shown). The mean ratio for CTL animals was arbitrarily defined as 100%. Data are expressed as mean \pm S.D. of at least six rats in each group. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with CTL rats.

Figure 19 Protein expression of select renal drug transporters and cytochrome P450 in HK-2 cells incubated with the serum of CRF rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)



*Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for transporters and P450 enzymes were standardized by dividing them by the value obtained for GAPDH. The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100% (dotted line). The graphic shows the mean expression in CRF rats expressed as percentage of controls \pm S.D. of 10 different sera in each group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared with control rats.*

Figure 20 Apical to basolateral transport of rhodamine in HK-2 cells incubated with the serum of CRF or CTL rats. (DMD 2011, kidney drug transporters)



P_{app} of rhodamine across a HK-2 cell monolayer preincubated with sera from control (open bars) and CRF (filled bars) rats, in the absence or presence of the P-gp inhibitor cyclosporine, is shown. P_{app} was determined using the equation $P_{app} = (dCr/dt)/(AC_0)$, where dCr/dt represents the rate at which the substrate appears in the receiving (basolateral) compartment, A is the monolayer surface, and C_0 is the initial substrate concentration in the donor (apical) compartment. The mean P_{app} of controls without cyclosporine was arbitrarily defined as 100%. Data are presented as the mean compared with controls \pm S.D. of eight different sera in each group. NS, no significant difference.

Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats

Drug Metab Dispos. 2012 Jan;40(1):39-46.

Reprinted with permission from the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

Copyright © 2012 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats

Judith Naud MSc, Louis-Philippe Laurin MD, Josée Michaud MSc, Stéphanie Beauchemin MSc, Francois A. Leblond PhD and Vincent Pichette MD PhD

Service de néphrologie et Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont,
Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada (J.N., L.P.L., J.M., S.B.,
F.A.L., V.P.)

Département de pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec,
Canada (J.N., J.M., V.P.)

Brain drug transporters in renal failure

Correspondence should be addressed to: Vincent Pichette MD Ph.D.

Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-
Rosemont

Number of text pages: 18

Number of tables: 2

Number of figures: 6

Number of references: 54

Number of words in Abstract: 229 words

Number of words in Introduction: 727 words

Number of word in Discussion: 1146 words

List of non-standard abbreviations: Bcrp: breast cancer resistance protein, CRF: chronic renal failure, CTL: control, GFR: glomerular filtration rate, Mrp: multidrug resistance related protein, Oat: organic anion transporter, Oatp: organic anion transporting polypeptide, PBS: Phosphate Buffered Saline, PCR: polymerase chain reaction, P-gp: P-glycoprotein, PMSF: Phenylmethylsulfonylfluoride, PTH: parathyroid hormone, qPCR: quantitative PCR

1. ABSTRACT

Studies demonstrated that chronic renal failure (CRF) affects the expression and activity of intestinal, hepatic and renal drug transporters. Such drug transporters are expressed in brain cells and at the blood-brain-barrier (BBB) where they limit the entry and distribution of drugs in the brain. Perturbations in brain drug transporters equilibrium by CRF could lead to central drug toxicity. This study evaluates how CRF affects BBB drug transporters using a 5/6 nephrectomised rat model. Protein and mRNA expression of influx transporters (organic anion transporting polypeptide [Oatp], organic anion transporter [Oat]), and efflux transporters (p-glycoprotein [P-gp], multidrug resistance related protein [Mrp], breast cancer resistance protein [Bcrp]) was measured in CRF and control rat brain. Intra-cerebral accumulation of radio-labelled benzylpenicillin, digoxin, doxorubicin and verapamil was used to evaluate BBB drug permeability. Protein expression of the transporters was evaluated in rat brain endothelial cells (RBEC) and astrocytes incubated with control and CRF rat serum. We demonstrated significant decreases (30-50%) in protein and mRNA levels of Bcrp, Mrp2-4, Oat3, Oatp2-3 and P-gp in CRF rat brain biopsies as well as in astrocytes and RBEC incubated with CRF serum. These decreases did not correlate with *in vivo* changes since BBB permeability of benzylpenicillin was decreased by 30% in CRF rats while digoxin, doxorubicin and verapamil permeabilities were unchanged. It thus appears that even with decreased drug transporters, BBB integrity and function is conserved in CRF.

2. INTRODUCTION

In recent years, many studies have demonstrated that chronic renal failure (CRF) significantly affects the expression and activity of intestinal, hepatic and renal drug transporters via uremic mediators, thus, altering the pharmacokinetics of many drugs (Huang et al., 2000; Laouari et al., 2001; Sun et al., 2004; Sun et al., 2006; Naud et al., 2007; Naud et al., 2008; Naud et al., 2011). Such drug transporters are also expressed in brain cells and at the blood-brain-barrier (BBB) where they limit the entry and distribution of drugs in the brain (see Figure 21) (Loscher and Potschka, 2005c; Loscher and Potschka, 2005b; Loscher and Potschka, 2005a; Ohtsuki and Terasaki, 2007). Two major drug transporter families have been identified: ATP-binding cassette (ABC) transporters and solute carriers (Slc). The most important ABC transporters at the BBB are multidrug resistance related proteins (Mrp), breast cancer resistance protein (Bcrp) and P-glycoprotein (P-gp). Bcrp, Mrp2-4-5 and P-gp are expressed on the luminal side and they mediate the efflux of molecules from the brain capillary cell into the blood (Kusuhara and Sugiyama, 2005; Loscher and Potschka, 2005c; Deeken and Loscher, 2007; Oswald et al., 2007; Eyal et al., 2009). Mrp4 was also found on the abluminal side of bovine brain capillaries where it is thought to mediate the efflux of molecules from the capillary cell into the brain, but this was not reported in rat and human brain (Kusuhara and Sugiyama, 2005; Loscher and Potschka, 2005c; Deeken and Loscher, 2007; Oswald et al., 2007). As for solute carriers, the most important found at the BBB are the organic anion transporter 3 (Oat3) and the organic anion transporting proteins 2 and 3 (Oatp2-3). Oat3 is located on both membranes and mediates drug efflux from the brain into the blood (Kikuchi et al., 2003; Mori et al., 2003; Mori et al., 2004; Loscher and Potschka, 2005c; Deeken and Loscher, 2007; Oswald et al., 2007). Furthermore, it was recently hypothesized that Oat3 is also implicated in the influx of drugs from the blood to the brain (Ose et al., 2009). Oatp2 is expressed at the luminal and abluminal membranes, while Oatp3 was found only at the luminal membrane of brain capillary cells, and they both mediate bi-directional transport of drugs (Loscher and Potschka, 2005c; Deeken and Loscher, 2007;

Ohtsuki and Terasaki, 2007; Ose et al., 2010). Perturbations in brain drug transporter equilibrium caused by CRF could lead to central toxicity of drugs.

To this day, there are no studies reporting the effects of CRF on brain drug transporters. However, indirect evidence suggests that CRF could be implicated in modulating their expression. Indeed, neurotoxicity of cephalosporin and penicillin derivatives was reported in patients with altered renal function despite normal plasma concentrations (Chatellier et al., 2002; Ferrara et al., 2003; Alpay et al., 2004). Drug transporters expressed at the BBB normally prevent the entry of these drugs into the brain (Kikuchi et al., 2003). It was demonstrated that beta-lactam antibiotics and cephalosporins are substrates of Oat3 and Mrps in the kidney and the brain (Kikuchi et al., 2003; Ueo et al., 2005; Ci et al., 2007; Nozaki et al., 2007). Interestingly, Oat3 is also known to extract at least three uremic toxins from the brain : p-aminohippuric acid (PAH), indoxyl sulfate (IS) and 3-carboxyl-4-methyl-5-propyl-2-furonapropionate (CMPF) (Ohtsuki et al., 2002; Kikuchi et al., 2003; Tahara et al., 2005; Deguchi et al., 2006). Finally, it was demonstrated that central and systemic inflammation, which are present in CRF (Oettinger et al., 1994; Sunder-Plassmann et al., 1994; Ziesche et al., 1994; Akahoshi et al., 1995; Higuchi et al., 1997), can downregulate the expression of P-gp at the BBB and in the liver, leading to drug accumulation in the brain and plasma (Zhao et al., 2002; Goralski et al., 2003; Petrovic et al., 2007).

The objective of this study was to investigate the effects of CRF on the expression and activity of the major drug transporters expressed at the BBB and in the brain. To address this, we have measured 1) the protein and mRNA expressions of Oat3, Oatp2-3, Mrp2-4-5 and P-gp in brain tissue biopsies from CRF and control rats, 2) the protein expression of the same transporters in rat astrocytes and rat brain endothelial cells (RBEC) incubated with sera from control and CRF rats, and 3) the *in vivo* intra-cerebral accumulation of ¹⁴C-benzylpenicillin, ³H-digoxin, ¹⁴C-doxorubicin and ³H-verapamil four substrates of brain drug transporters.

3. MATERIALS AND METHODS

Experimental Model

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Portage, MI), weighing 176 to 225 g were housed in the Research Center animal care facility and maintained on Harlan Teklad rodent diet (Harlan Teklad Global Diets, Montreal, Canada) and water *ad libitum*. Animals were allowed an acclimatization period of at least 7 days before the first nephrectomy was performed. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals and under the supervision of our local animal care committee.

Experimental Protocol

Studies were performed in two groups of animals: control pair-fed and CRF. Drug transporter protein expression and mRNA levels were measured in at least 6 rats per group. Drug transporter activity was measured *in vivo* through the cerebral accumulation of ¹⁴C-benzylpenicillin, ³H-digoxin, ¹⁴C-doxorubicin and ³H-verapamil in at least 3 rats per group, per experiment.

Chronic renal failure was induced by two-stage 5/6 nephrectomy as previously described (Leblond et al., 2001). Every animal had free access to water, but in order to limit the effects of CRF-induced malnutrition, control pair-fed rats were fed the same amount of chow that CRF rats ate on the previous day. We have previously demonstrated that the caloric reduction in control animals induced by pair-feeding did not influence the expression of drug transporters (unpublished data). At day 41 post-nephrectomy, the rats were housed in metabolic cages and urine was collected for 24 hours to determine the clearance of creatinine. Rats were sacrificed by decapitation 42 days after nephrectomy for organ and blood collection, or underwent a radio-labeled drug accumulation study. Following sacrifice, the

brain was immediately excised, rinsed in ice-cold saline then flash-frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until membrane preparation or mRNA extraction. Blood was collected for the measurement of serum creatinine and urea and for bioassays with cultured rat brain endothelial cells (RBEC) and astrocytes.

Preparation of Crude Brain Membranes

Frozen rat brain biopsies (500 mg) were homogenized in 3 mL of homogenizing buffer (250 mM sucrose, 10 mM HEPES and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 0.1 mM PMSF using a Potter-Elvehjem tissue grinder (Wheaton Science Products, Millville, J). Differential centrifugation was used to obtain a crude membrane fraction (Chow et al., 2010). Briefly, the brain homogenates were centrifuged at 9 000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was then spun at 33 000 g for 60 min at 4°C and the resulting pellet was resuspended in phosphate buffered saline containing 0.1 mM PMSF. Samples were then sonicated on ice for 10 seconds to ensure homogeneity. Protein concentration was determined using the method of Lowry *et al.* (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as a reference protein. Aliquots were stored at -80 °C up to Western blot analysis.

Western Blot Analysis

Major brain drug transporters were assessed by Western blot analysis following a previously described protocol (Leblond et al., 2002; Naud et al., 2007; Naud et al., 2008; Naud et al., 2011). Protein expression in control animals was arbitrarily defined as 100%.

P-gp and Mrp2 were detected using monoclonal antibodies from ID Labs (London, Ontario, Canada): C219 and M₂ III-6 respectively. Oat3, Oatp2 and Oatp3 were detected using antibodies from Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX). Anti-Bcrp was from Abbotec (San Diego, CA), Anti-Mrp4 was from Novus Biological (Littleton, CO) and anti-Mrp5 from Abnova (Walnut, CA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH), used as a loading control, was detected using rabbit anti-GAPDH from Abcam (Cambridge, MA).

mRNA Analysis

Total RNA was extracted from frozen tissue using Trizol reagent (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined by measuring absorbance at a wavelength of 260nm. One μg of total RNA was used to prepare cDNA by reverse transcription using SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit from Invitrogen. The mRNA encoding for P-gp (*mdr1a*), Mrp2 and Oatp2 was measured by quantitative Real-Time PCR (qPCR) as previously described (Naud et al., 2007; Naud et al., 2008; Naud et al., 2011). Other genes were measured using appropriate TaqMan gene expression assays from Applied Biosystems (Carlsbad, CA). Table XII shows the TaqMan gene expression assays used for the quantification of mRNA for each transporter. PCR products were analyzed using the $\Delta\Delta C_T$ method (Livak and Schmittgen, 2001) using GAPDH as standard gene.

In Vivo Accumulation of Radio-labeled Drugs in Brain

The intra-cerebral accumulation of radio-labeled drugs was used to determine the activity of the blood-brain-barrier drug transporters. Four different drugs were tested: ^{14}C -enzylpenicillin, an antibiotic and a substrate for Oat3 and Mrps (Kikuchi et al., 2003; Choi et al., 2009), ^3H -digoxin a cardiac glycoside and a substrate for Oatps and P-gp (Goralski et al., 2003), ^{14}C -doxorubicin, an anthracycline antibiotic used in cancer chemotherapy and substrate of P-gp (Chan et al., 2004), and ^3H -verapamil, a calcium channel blocker and substrate of P-gp (Chan et al., 2004). Digoxin (0.5 mg/kg) was administered via intra-peritoneal injection, benzylpenicillin (5 mg/kg CTL, 1 mg/kg CRF) via intra-muscular injection, and doxorubicin (5mg/kg) (Hsieh et al., 2008) and verapamil (0.1 mg/kg) (Hendrikse et al., 1998) were administered in the tail-vein. All were injected

with an approximate 1:1500 hot/cold ratio so the mg amount of radioactive compound wouldn't factor into the final dosage calculation. To evaluate cerebral accumulation, similar plasma concentrations of drugs need to be attained and therefore CRF rats received a lower dose of benzylpenicillin because of its reduced clearance in CRF. Rats were anesthetized using isoflurane 30 minutes (doxorubicin), 60 minutes (verapamil) or 2 hours (benzylpenicillin and digoxin) post-injection and a cardiac puncture was performed to recover the maximum volume of blood in heparinised tubes to obtain plasma. Brains were harvested, rinsed in cold phosphate buffered saline, weighted, minced and placed in 2 mL of Solvable solution (PerkinElmer, Waltham, MA) at 56°C overnight. Dissolved brain volumes were noted and radioactivity was counted on a Wallac 1409 beta-counter (Perkin Elmer) in 1 mL of dissolved brain tissue and 2 mL of plasma after addition of 4 mL ScintiSafe Plus Scintillant (Fisher, Ottawa, Ontario, Canada). The results were calculated as a ratio between the radioactivity count (CPM) for 1 g of brain tissue and the radioactivity count for 1mL of plasma. The mean for the CTL groups was arbitrarily defined as 100%.

Effects of Uremic Serum on Brain Drug Transporters

In order to determine whether uremic serum could affect the expression and function of blood-brain-barrier drug transporters, we incubated rat brain endothelial cells (RBEC) and astrocytes with serum from nephrectomised rat and evaluated the drug transporters' protein expression.

Isolation and Culture of Rat Astrocytes

Rat astrocytes were isolated and cultured as previously described by Perriere *et al.* (Booher and Sensenbrenner, 1972; Perriere et al., 2005). When cells reached confluency, the standard culture medium was changed to culture medium containing 10% serum from either control or nephrectomised rats (1 serum/flask). After 48 h of culture, the culture medium was recovered under sterile conditions to be used for RBEC conditioning and cells

were trypsinized, pelleted and homogenized in phosphate buffered saline containing 0.1 mM PMSF. Protein concentrations were determined using the Micro BCA Protein Assay Kit from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL). 100 ug was loaded for Western Blot analysis of each studied transporter.

Isolation and Culture of Rat Brain Endothelial Cells (RBEC)

Rat brain endothelial cells (RBEC) were isolated and puromycin-purified for 72 h as previously published (Perriere et al., 2005). Culture medium was then changed, for a 24 h period, to endothelial cell basal medium (ECBM) containing 20% bovine plasma-derived serum (BPDS), 2 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), 500 ng/mL hydrocortisone (HC) and 1% Penstrep (a mixture of 20 000 U/mg penicillin and streptomycin)(Perriere et al., 2005). Four days after seeding, the culture medium was again changed to a 50/50 mix of pre-described ECBM culture medium and culture medium recovered from astrocyte cultures containing 10% foetal bovine serum to simulate co-culture with astrocytes. Finally, the culture medium was changed 48h later to a new 50/50 mix of pre-described ECBM containing 20% serum from CTL or nephrectomised rats and astrocyte pre-conditioned medium with sera from CTL of CRF rats. 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP (250 μ mol/L) and the cAMP phosphodiesterase-4-specific inhibitor RO 20 1724 (17.5 μ mol/L) were added to the final mix. After 48 h of culture, cells were trypsinized, pelleted and homogenized in phosphate buffered saline containing 0.1 mM PMSF. Protein concentrations were determined using the Micro BCA Protein Assay Kit from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL). 100 ug were loaded for Western Blot analysis of each studied transporter.

Other Assays.

Blood and urine chemistries were determined with an Architect C1600 clinical analyzer (Abbott, Saint-Laurent, QC, Canada).

Statistical Analysis.

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

4. RESULTS

Biochemical Parameters and Body Weight in Control and CRF Rats

Table XIII presents the biochemical parameters and body weights of both groups of rats. Compared to control animals, CRF rats had higher levels of serum creatinine and urea and lower creatinine clearance (reduced by 80%, $p < 0.001$). There was no difference in body weight between control and CRF rats.

Protein Expression of Brain Drug Transporters in CRF Rats

Figure 22 presents the measured protein expression of various drug transporters in crude brain membranes of control and CRF rats. The expression level of Bcrp, Mrp2, Mrp4, Oat3, Oatp2, Oatp3 and P-gp were significantly decreased from 20 to 50% in CRF rat crude brain membranes as shown by Western blot. The only measured protein that remained stable was Mrp5. We found significant correlations between protein expression and the rat clearance of creatinine for Bcrp ($R = 0.426$, $p < 0.05$), Mrp2 ($R = 0.798$, $p < 0.001$), Mrp4 ($R = 0.594$, $p < 0.005$), Oat3 ($R = 0.557$, $p < 0.05$), Oatp2 ($R = 0.626$, $p < 0.01$), Oatp3 ($R = 0.566$, $p < 0.005$) and P-gp ($R = 0.587$, $p < 0.005$).

mRNA Expression of Brain Drug Transporters in CRF Rats.

Figure 23 presents results from the analysis of mRNA coding for brain drug transporters. There was significant decreases in the expression of Bcrp (35%), Mrp2 (40%), Mrp4 (30%), Oat3 (40%), Oatp2 (35%), Oatp3 (70%) and P-gp (35%) mRNA in CRF rats brain compared to controls. Again, only Mrp5 mRNA remained stable between the groups.

In Vivo Accumulation of Radiolabelled Drugs in the Brain of Rats With Surgically-induced Chronic Renal Failure.

Two hours post-administration, digoxin plasma radioactivity was similar in control and CRF rats, while the plasma radioactivity of benzylpenicillin was slightly elevated by 17% in CRF rats compared to control animals. There was 33% less ^{14}C -benzylpenicillin in the brain of CRF rats (Figure 24). On the other hand, no significant differences in ^3H -digoxin, ^{14}C -doxorubicin or ^3H -verapamil brain accumulation were observed between CTL and CRF rats. These data were obtained via a ratio of radioactivity for 1 g of brain tissue/1 mL of plasma.

Protein Expression of Drug Transporters in Rat Brain Endothelial Cells (RBEC) Incubated With Serum From CRF Rats.

Protein expression of drug transporters was measured in rat brain endothelial cells incubated for 48 h with serum from control or CRF animals (Figure 5). There was a significant decrease in the expression of Bcrp (40%), Mrp2 (25%), Mrp4 (45%), Oat3 (35%), Oatp2 (35%), Oatp3 (25%) and P-gp (30%) protein when incubated with CRF serum compared to controls. On the other hand, the expression of Mrp5 was unaltered. These results were similar to those obtained *in vivo* in CRF rats.

Protein Expression of Drug Transporters in Rat Astrocytes Incubated With Serum From CRF Rats.

Protein expression of drug transporters was measured in rat astrocytes incubated for 48 h with serum from control or CRF animals (Figure 6). Significant decreases in the expression of Bcrp (25%), Mrp2 (25%), Mrp4 (30%), Oat3 (60%), Oatp2 (40%), Oatp3 (50%) and P-gp (30%) protein were observed when incubated with CRF serum compared to controls. The expression of Mrp5 remained unaltered. These results were similar to those obtained *in vivo* in CRF rats.

5. DISCUSSION

This study demonstrated a significant (20-50%) decrease in protein and mRNA expression of Bcrp, Mrp2 and 4, Oat3, Oatp2 and 3, and P-gp in crude rat brain membranes from CRF rats compared to CTL rats, while Mrp5 was unchanged. Similar reductions were observed in RBEC and astrocytes incubated with serum from nephrectomised rat serum, compared to control. Influx and efflux drug transporters expression at the BBB and in the brain thus seem equally affected by CRF. As for BBB permeability, we observed a 30% decrease in the BBB permeability to benzylpenicillin in nephrectomised rats and no change in the BBB permeability to digoxin, doxorubicin and verapamil as measured by their brain/plasma radioactivity ratio.

We found significant correlations between the clearance of creatinine and the expression of all downregulated transporters at the protein level indicating that the changes in transporters are related to the severity of the renal failure. Also, we have demonstrated that the modifications in drug transporter expression occurred in response to one or many factors present in the sera from uremic rats in at least two brain cell types, as demonstrated by the changes in protein expression of transporters in astrocytes and RBEC, which are similar to those observed in CRF rats' brain biopsies.

To our knowledge, no group has studied the impact of renal failure on the expression of brain drug transporters. However, many studies have reported a change in drug transporters in various organs in CRF (Huang et al., 2000; Laouari et al., 2001; Sun et al., 2004; Sun et al., 2006; Naud et al., 2007; Naud et al., 2008; Naud et al., 2011). In some of these studies, uremic circulating factors seemed involved in the expression and activity changes. While no specific factor has been identified, many potential factors include uremic toxins such as CMPF, IS or PAH and proinflammatory cytokines which are known to be elevated in CRF (Oettinger et al., 1994; Sunder-Plassmann et al., 1994; Ziesche et al., 1994; Akahoshi et al., 1995; Higuchi et al., 1997). Indeed, uremic toxins have been shown to inhibit

drug uptake by Oat1, Oat3 and Oatp2 in the rat liver, kidney and brain (Deguchi et al., 2004; Sun et al., 2004; Deguchi et al., 2006; Sun et al., 2006). Also, proinflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor α (TNF α) can modulate drug transporters' expression and activity in various organs including at the BBB (Petrovic et al., 2007; Morgan et al., 2008). For example, *in vitro* studies have demonstrated that IL-1 β and IL-6 can decrease the expression of P-gp and Bcrp in brain capillaries endothelial cells and that IL-6 can decrease P-gp expression in cultured rat astrocytes (Ronaldson and Bendayan, 2006; von Wedel-Parlow et al., 2009; Poller et al., 2010). Proinflammatory cytokines could thus play a role in the BBB drug transporters' expression downregulation observed in CRF.

Despite significant decreases of brain transporter expression in CRF rats, we did not observe *in vivo* brain accumulation of 3 different substrates, namely digoxin, doxorubicin and verapamil. Such discrepancy has also been observed in inflammation studies. Indeed, previously published data demonstrated that systemic inflammation, as seen in CRF, moderately downregulated (-24%) the protein expression of P-gp at the BBB 6h after the induction of inflammation by endotoxin (Zhao et al., 2002). In that study, P-gp expression returned to normal 24h post-inflammation (Zhao et al., 2002). They observed increased plasma and brain concentrations of doxorubicin in mice 6h after the induction of inflammation compared to control. However, endotoxin-induced systemic inflammation did not significantly change the brain/plasma concentration ratio of doxorubicin (Zhao et al., 2002). The authors thus conclude that endotoxin-induced systemic inflammation has no effect on BBB integrity and doxorubicin transport across the blood–brain barrier in mice (Zhao et al., 2002). Also, another study demonstrated that central nervous system inflammation produces a 50% decrease in P-gp mRNA expression and an almost 100% decrease in Oatp2 mRNA in the rat brain 6h post-induction (Goralski et al., 2003). This group used ^3H -digoxin as a probe for P-gp function *in vivo* and observed, 6 and 24h post inflammation induction, an increase in brain and plasma ^3H -radioactivity (Goralski et al., 2003). However, the brain/plasma radioactivity ratio was unchanged (Goralski et al., 2003).

Based on these results, and since CRF is a state of chronic inflammation, it could explain why, like Zhao and Goralski, we observe decreased protein and mRNA expression of P-gp and Oatp2 in the brain of nephrectomised rats but no intracerebral accumulation of digoxin, doxorubicin or verapamil.

We also observed a 30% decrease in the BBB permeability to benzylpenicillin in nephrectomised rats compared to controls as measured by the total brain/plasma radioactivity ratio. *In vitro*, studies showed that benzylpenicillin is a substrate of Mrp2 and Oat3, but no blood to brain transporter has been identified (Kikuchi et al., 2003; Choi et al., 2009). As mentioned earlier, Oat3 is involved in the transport of uremic toxins from the brain (Ohtsuki et al., 2002; Kikuchi et al., 2003; Tahara et al., 2005; Deguchi et al., 2006). In fact, this transporter is typically thought to play a role in the efflux of drugs from the brain. However, a recent study hypothesized that it is also involved in the uptake of Ro 64-0802, a pharmacologically active form of oseltamivir, from the blood to the brain (Ose et al., 2009). It could, thus, be responsible for the blood to brain uptake of substrates like benzylpenicillin or uremic toxins as well as for their brain to blood transport. This hypothesis is supported by a study performed in the 1960s that demonstrated that probenecid, a well known Oat3 inhibitor, limits the entry of benzylpenicillin into rat brain as shown by a decrease in brain/plasma concentration ratio of benzylpenicillin when co-administered with probenecid (Fishman, 1966). The 30% decrease in the brain/blood radioactivity ratio of benzylpenicillin observed in the brain of nephrectomised rats indicates a more efficient efflux of the drug compared to its uptake. However, Mrp2 (efflux) and Oat3 (influx and efflux) were equally reduced by 40% in the brain of nephrectomised rats compared to controls. If the hypothesis of Oat3 involvement in the blood to brain influx of benzylpenicillin and uremic toxins is correct, the greater functional reduction in benzylpenicillin brain uptake could be attributed to competition with accumulating uremic toxins such as CMPF, IS and PAH for blood to brain transport by Oat3 preventing benzylpenicillin entry into the brain. However, it is also possible that Mrp2 plays a more

important functional role in the BBB permeability of benzylpenicillin causing a greater efflux of the drug compared to its influx.

In conclusion, even though we reported significant reductions in the expression of influx and efflux brain drug transporters, it appears that the BBB integrity and permeability to drugs is preserved in renal failure as shown by the unchanged intra-cerebral accumulation of digoxin, doxorubicin and verapamil and by the reduced accumulation of benzylpenicillin.

6. AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Participated in research design: Naud, Laurin, Pichette

Conducted experiments: Naud, Michaud, Beauchemin, Leblond, Laurin

Performed data analysis: Naud, Leblond, Pichette

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Naud, Leblond, Pichette

7. REFERENCES

- Akahoshi T, Kobayashi N, Hosaka S, Sekiyama N, Wada C and Kondo H (1995) In-vivo induction of monocyte chemotactic and activating factor in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **10**:2244-2249.
- Alpay H, Altun O and Biyikli NK (2004) Cefepime-induced non-convulsive status epilepticus in a peritoneal dialysis patient. *Pediatr Nephrol* **19**:445-447.
- Booher J and Sensenbrenner M (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**:97-105.
- Chan LM, Lowes S and Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* **21**:25-51.
- Chatellier D, Jourdain M, Mangalaboyi J, Ader F, Chopin C, Derambure P and Fourrier F (2002) Cefepime-induced neurotoxicity: an underestimated complication of antibiotherapy in patients with acute renal failure. *Intensive Care Med* **28**:214-217.
- Choi MK, Kim H, Han YH, Song IS and Shim CK (2009) Involvement of Mrp2/MRP2 in the species different excretion route of benzylpenicillin between rat and human. *Xenobiotica* **39**:171-181.
- Chow EC, Sun H, Khan AA, Groothuis GM and Pang KS (2010) Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on transporters and enzymes of the rat intestine and kidney in vivo. *Biopharm Drug Dispos* **31**:91-108.
- Ci L, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K and Sugiyama Y (2007) Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol* **71**:1591-1597.
- Deeken JF and Loscher W (2007) The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res* **13**:1663-1674.

- Deguchi T, Isozaki K, Yousuke K, Terasaki T and Otagiri M (2006) Involvement of organic anion transporters in the efflux of uremic toxins across the blood-brain barrier. *J Neurochem* **96**:1051-1059.
- Deguchi T, Kusuhara H, Takadate A, Endou H, Otagiri M and Sugiyama Y (2004) Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. *Kidney Int* **65**:162-174.
- Eyal S, Hsiao P and Unadkat JD (2009) Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy? *Pharmacol Ther* **123**:80-104.
- Ferrara N, Abete P, Giordano M, Ferrara P, Carnovale V, Leosco D, Beneduce F, Ciarambino T, Varricchio M and Rengo F (2003) Neurotoxicity induced by Cefepime in a very old hemodialysis patient. *Clin Nephrol* **59**:388-390.
- Fishman RA (1966) Blood-brain and CSF barriers to penicillin and related organic acids. *Arch Neurol* **15**:113-124.
- Goralski KB, Hartmann G, Piquette-Miller M and Renton KW (2003) Downregulation of mdrla expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin. *Br J Pharmacol* **139**:35-48.
- Hendrikse NH, Schinkel AH, de Vries EG, Fluks E, Van der Graaf WT, Willemsen AT, Vaalburg W and Franssen EJ (1998) Complete in vivo reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography. *Br J Pharmacol* **124**:1413-1418.
- Higuchi T, Yamamoto C, Kuno T, Mizuno M, Takahashi S and Kanmatsuse K (1997) Increased production of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist by peripheral blood mononuclear cells in undialyzed chronic renal failure. *Nephron* **76**:26-31.
- Hsieh YJ, Chang CH, Huang SP, Lin CW, Wang MN, Wu YT, Chen YJ and Tsai TH (2008) Effect of cyclosporin A on the brain regional distribution of doxorubicin in rats. *Int J Pharm* **350**:265-271.

- Huang ZH, Murakami T, Okochi A, Yumoto R, Nagai J and Takano M (2000) Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Eur J Pharmacol* **406**:453-460.
- Kikuchi R, Kusuhara H, Sugiyama D and Sugiyama Y (2003) Contribution of organic anion transporter 3 (Slc22a8) to the elimination of p-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **306**:51-58.
- Kusuhara H and Sugiyama Y (2005) Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx* **2**:73-85.
- Laouari D, Yang R, Veau C, Blanke I and Friedlander G (2001) Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**:F636-645.
- 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.
- Loscher W and Potschka H (2005a) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* **2**:86-98.
- Loscher W and Potschka H (2005b) Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* **6**:591-602.
- Loscher W and Potschka H (2005c) Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* **76**:22-76.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.

- Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson TA, Sharma R and Sinal CJ (2008) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug Metab Dispos* **36**:205-216.
- Mori S, Ohtsuki S, Takanaga H, Kikkawa T, Kang YS and Terasaki T (2004) Organic anion transporter 3 is involved in the brain-to-blood efflux transport of thiopurine nucleobase analogs. *J Neurochem* **90**:931-941.
- Mori S, Takanaga H, Ohtsuki S, Deguchi T, Kang YS, Hosoya K and Terasaki T (2003) Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**:432-440.
- Naud J, Michaud J, Beauchemin S, Hebert MJ, Roger M, Lefrancois S, Leblond FA and Pichette V (2011) Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome p450 in rats. *Drug Metab Dispos* **39**:1363-1369.
- Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond FA, Mitchell A, Jones C, Bonnardeaux A and Pichette V (2007) Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:978-985.
- Naud J, Michaud J, Leblond FA, Lefrancois S, Bonnardeaux A and Pichette V (2008) Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug Metab Dispos* **36**:124-128.
- Nozaki Y, Kusuhara H, Kondo T, Hasegawa M, Shiroyanagi Y, Nakazawa H, Okano T and Sugiyama Y (2007) Characterization of the uptake of organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3 substrates by human kidney slices. *J Pharmacol Exp Ther* **321**:362-369.
- Oettinger CW, Bland LA, Oliver JC, Arduino MJ, McAllister SK and Favero MS (1994) The effect of uremia on tumor necrosis factor-alpha release after an in vitro whole-blood endotoxin challenge. *J Am Soc Nephrol* **4**:1890-1895.

- Ohtsuki S, Asaba H, Takanaga H, Deguchi T, Hosoya K, Otagiri M and Terasaki T (2002) Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. *J Neurochem* **83**:57-66.
- Ohtsuki S and Terasaki T (2007) Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* **24**:1745-1758.
- Ose A, Ito M, Kusuhara H, Yamatsugu K, Kanai M, Shibasaki M, Hosokawa M, Schuetz JD and Sugiyama Y (2009) Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4). *Drug Metab Dispos* **37**:315-321. Epub 2008 Nov 2024.
- Ose A, Kusuhara H, Endo C, Tohyama K, Miyajima M, Kitamura S and Sugiyama Y (2010) Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier. *Drug Metab Dispos* **38**:168-176.
- Oswald S, Grube M, Siegmund W and Kroemer HK (2007) Transporter-mediated uptake into cellular compartments. *Xenobiotica* **37**:1171-1195.
- Perriere N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, Couvreur P, Scherrmann JM, Tamsamani J, Couraud PO, Deli MA and Roux F (2005) Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem* **93**:279-289.
- Petrovic V, Teng S and Piquette-Miller M (2007) Regulation of drug transporters during infection and inflammation. *Mol Interv* **7**:99-111.

- Poller B, Drewe J, Krahenbuhl S, Huwyler J and Gutmann H (2010) Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* **30**:63-70.
- Ronaldson PT and Bendayan R (2006) HIV-1 viral envelope glycoprotein gp120 triggers an inflammatory response in cultured rat astrocytes and regulates the functional expression of P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **70**:1087-1098.
- Sun H, Frassetto L and Benet LZ (2006) Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* **109**:1-11.
- Sun H, Huang Y, Frassetto L and Benet LZ (2004) Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos* **32**:1239-1246.
- Sunder-Plassmann G, Kapiotis S, Gasche C and Klaar U (1994) Functional characterization of cytokine autoantibodies in chronic renal failure patients. *Kidney Int* **45**:1484-1488.
- Tahara H, Shono M, Kusuhara H, Kinoshita H, Fuse E, Takadate A, Otagiri M and Sugiyama Y (2005) Molecular cloning and functional analyses of OAT1 and OAT3 from cynomolgus monkey kidney. *Pharm Res* **22**:647-660.
- Ueo H, Motohashi H, Katsura T and Inui K (2005) Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1. *Biochem Pharmacol* **70**:1104-1113.
- von Wedel-Parlow M, Wolte P and Galla HJ (2009) Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* **111**:111-118.
- Zhao YL, Du J, Kanazawa H, Sugawara A, Takagi K, Kitaichi K, Tatsumi Y and Hasegawa T (2002) Effect of endotoxin on doxorubicin transport across blood-brain barrier and P-glycoprotein function in mice. *Eur J Pharmacol* **445**:115-123.
- Ziesche R, Roth M, Papakonstantinou E, Nauck M, Horl WH, Kashgarian M and Block LH (1994) A granulocyte inhibitory protein overexpressed in chronic renal disease

regulates expression of interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:301-305.

8. FOOTNOTES

This work was financed La Fondation Hôpital Maisonneuve-Rosemont (La néphrologie et son Impact). V Pichette is supported by a career award from FRSQ.

Reprint requests should be sent to: Vincent Pichette MD Ph.D.

Centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada
H1T 2M4

9. Tables

Tableau XII TaqMan gene expression assays used for Real-time PCR. (DMD 2012, brain drug transporters)

	Gene	TaqMan Gene Expression Assay
Bcrp	<i>abcg2</i>	Rn00710585_m1
GAPDH	<i>gapdh</i>	Rn99999916_s1
Mrp4	<i>abcc4</i>	Rn01465702_m1
Mrp5	<i>abcc5</i>	Rn00588341_m1
Oat3	<i>slc22a8</i>	Rn00580082_m1
Oatp3	<i>slco1a5</i>	Rn00578150_m1

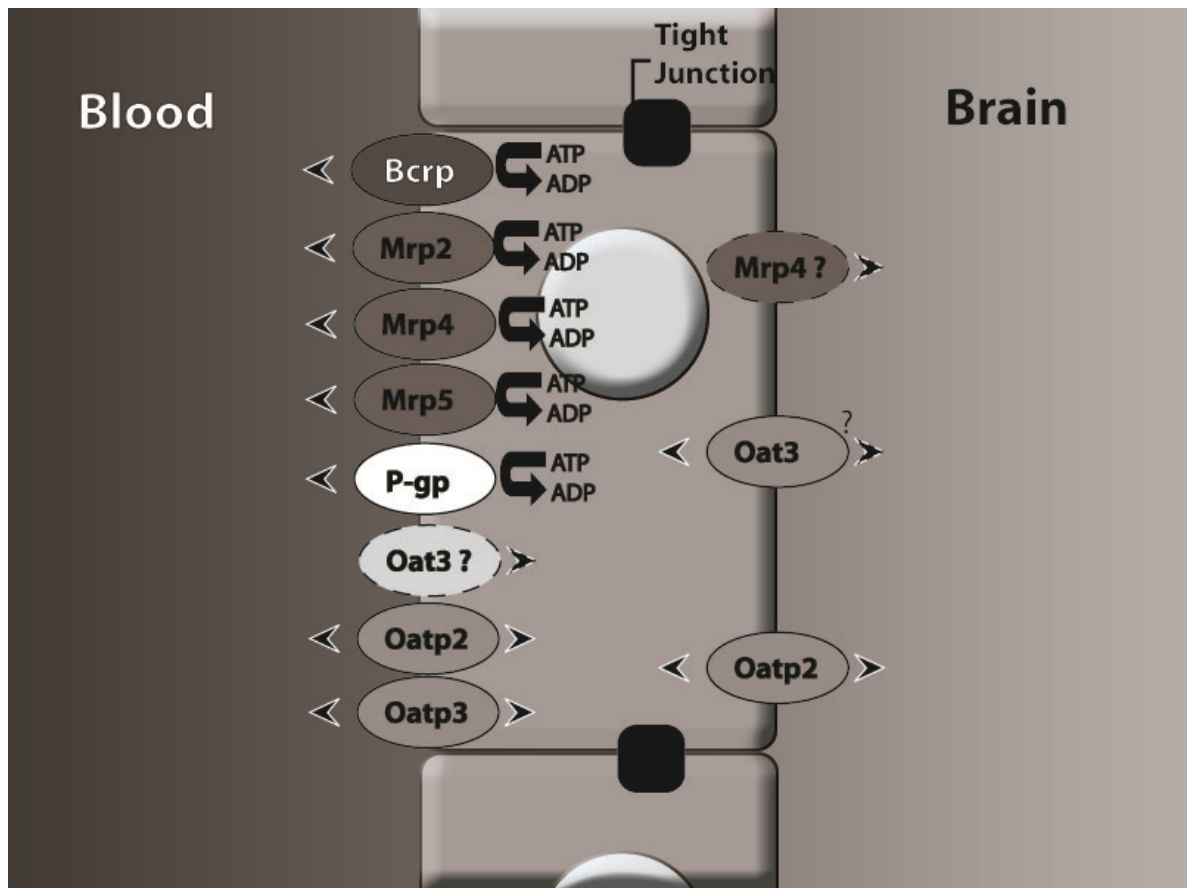
Tableau XIII Characteristics of control and CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)

	Control (n=32)	CRF (n=32)	p-value
Body Weight (grams)	352.8 ± 29.5	333.0 ± 54.5	0.07
Serum creatinine (µmol/L)	55.4 ± 10.5	205.0 ± 90.3	<0.001
Creatinine clearance (µL/100 g of body weight/mi)	309.1 ± 82.4	70.1 ± 35.5	<0.001
Serum urea (mmol/L)	4.5 ± 1.0	38.4 ± 17.9	<0.001

Data are the mean ± SD. Measurements were made at the time of sacrifice. Twenty-four hour urinary collection was begun the day before. Blood urea and creatinine, and urine creatinine were determined with an Architect C1600 clinical analyzer (Abbott, Saint-Laurent, QC, Canada).

10. FIGURES AND LEGENDS

Figure 21 Blood-brain-barrier drug transporters. (DMD 2012, brain drug transporters)

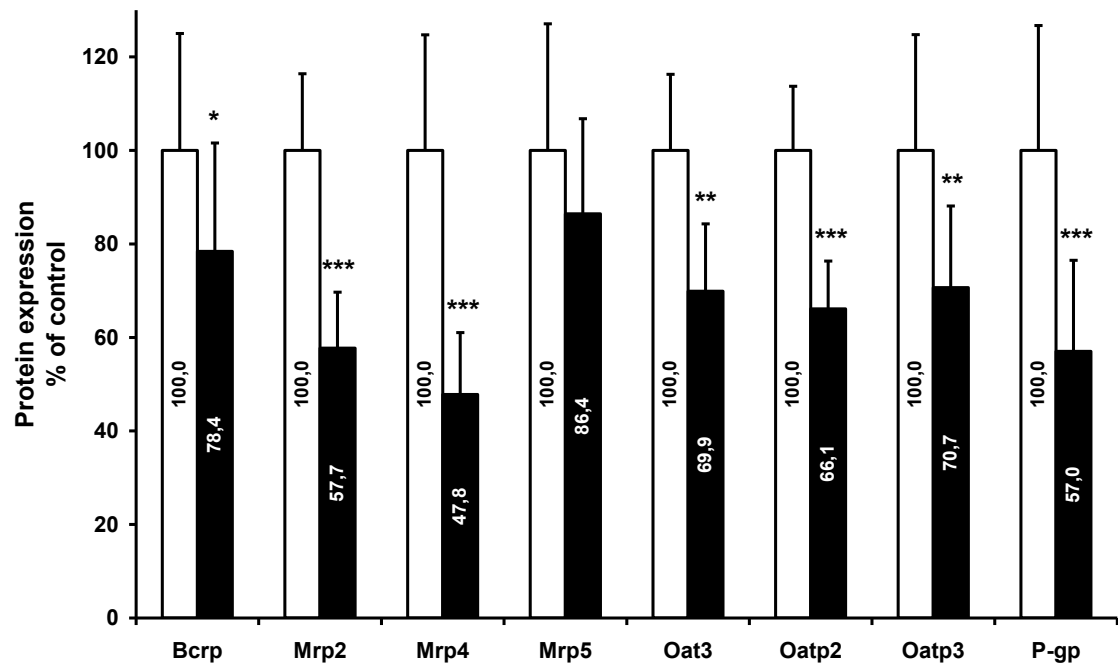


Bcrp: Breast cancer resistance protein, *Mrp*: multidrug resistance related protein, *Oat*: organic anion transporter, *Oatp*: organic anion transporting polypeptide, *P-gp*: p-glycoprotein. *Mrp4* was found on the abluminal side of bovine brain capillaries where it is thought to mediate the efflux of molecules from the capillary cell into the brain, but this was not reported in rat and human brain hence the dotted line (Kusuhara and Sugiyama, 2005; Loscher and Potschka, 2005c; Deeken and Loscher, 2007; Oswald et al., 2007). *Oatps* are widely known to be bidirectional transporters hence the arrows indicating both directions (Loscher and Potschka, 2005c; Deeken and Loscher, 2007; Ohtsuki and

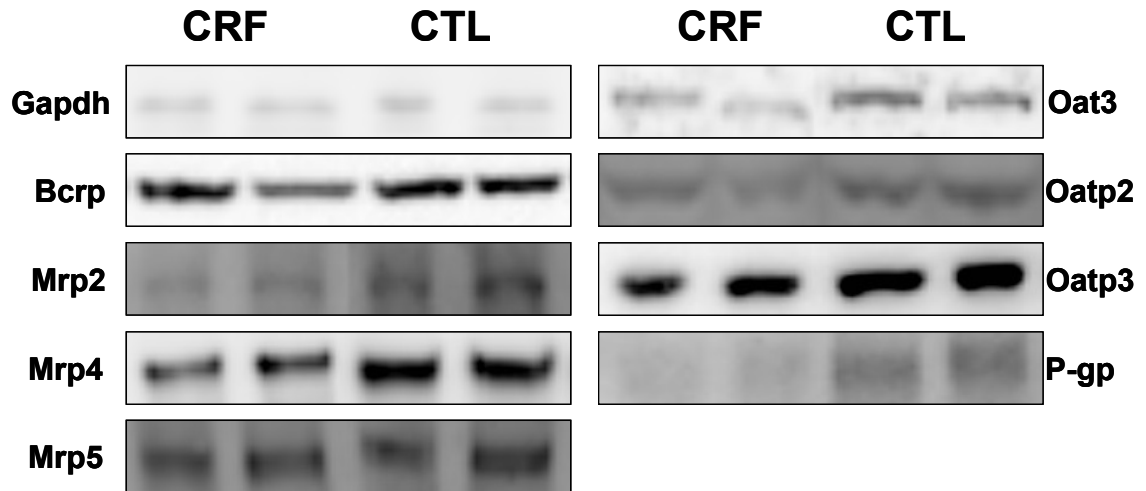
Terasaki, 2007; Ose et al., 2010). It was recently hypothesized that Oat3 mediates import and export from the brain (Ose et al., 2009). Figure based on information from (Kikuchi et al., 2003; Mori et al., 2003; Kusuhara and Sugiyama, 2005; Loscher and Potschka, 2005c; Deeken and Loscher, 2007; Ohtsuki and Terasaki, 2007; Oswald et al., 2007; Eyal et al., 2009; Ose et al., 2009).

Figure 22 Protein expression of various brain drug transporters in CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)

a)

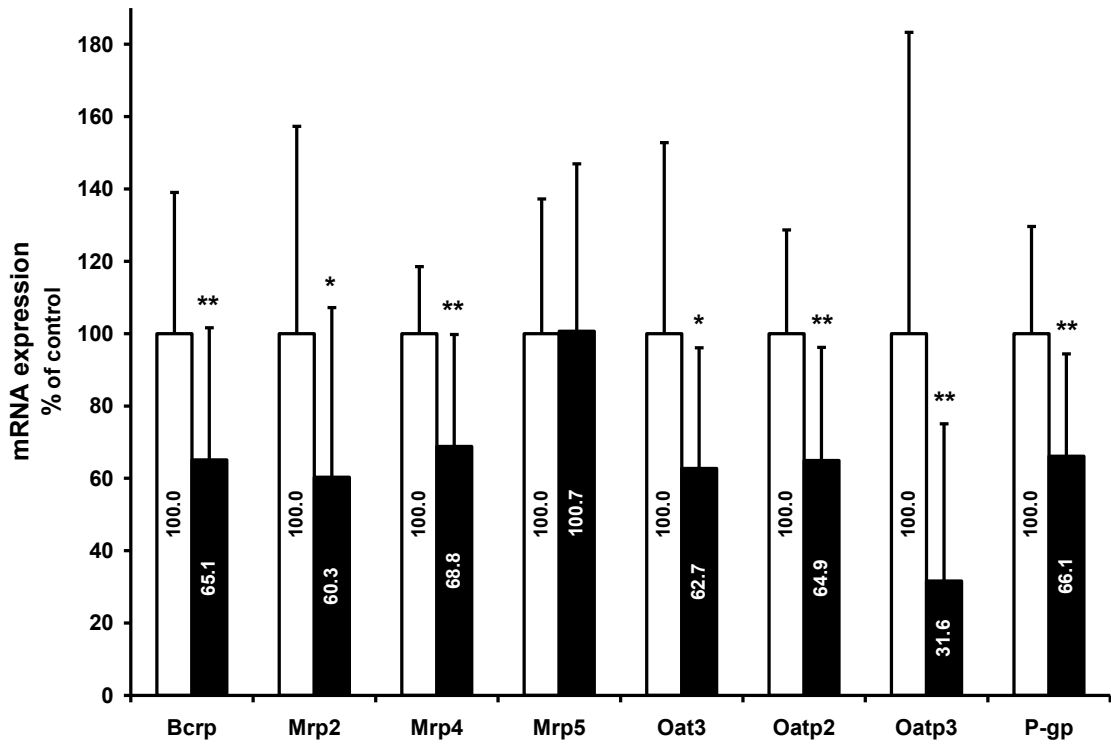


b)



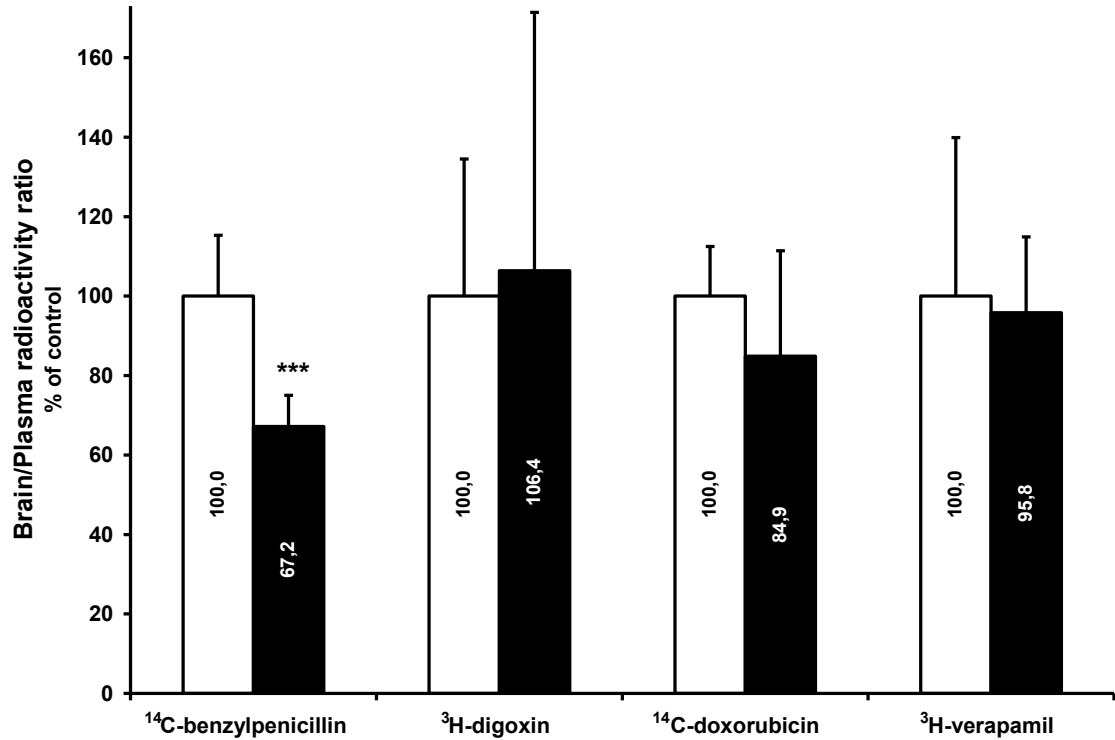
A. Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for transporters in control (CTL) (white bars) and chronic renal failure (CRF) (black bars) rats were standardized by dividing them by the value obtained for GAPDH. The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100%. Graphic shows the mean expression in rats expressed as percent of controls \pm SD of 12 rats in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control rats. *B.* Representative western blots for each transporter. Each blot presents bands for two CRF (left) and two control (right) rats.

Figure 23 mRNA expression of various brain drug transporters in CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)



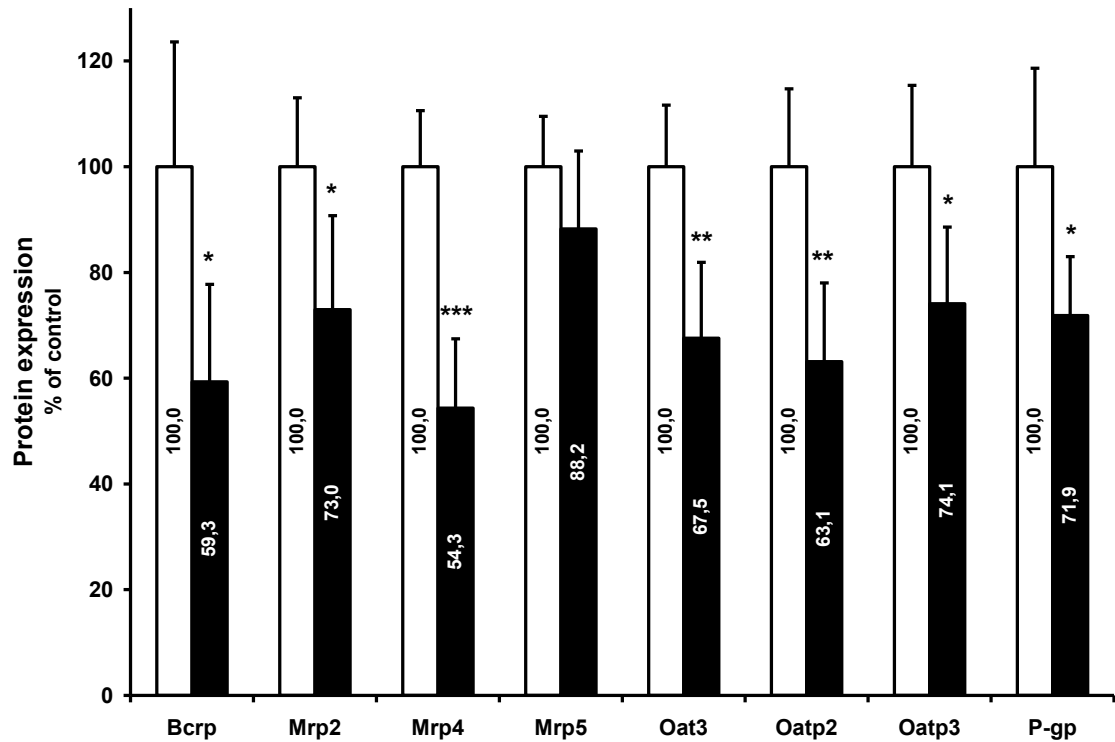
*mRNA encoding brain drug transporters in control (CTL) (white bars) and chronic renal failure (CRF) (black bars) rats were measured by quantitative real time PCR. mRNA levels are expressed in relative quantities using the $\Delta\Delta C_T$ method (Livak and Schmittgen, 2001) with *gapdh* as a reference gene. The mean relative quantity of control rats was arbitrarily defined as 100% (dotted line). Graphic shows the mean expression in rats expressed as percent of controls \pm SD of 12 rats in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control rats.*

Figure 24 In vivo accumulation of radiolabeled drugs in the brain of rats with surgically-induced chronic renal failure. (DMD 2012, brain drug transporters)



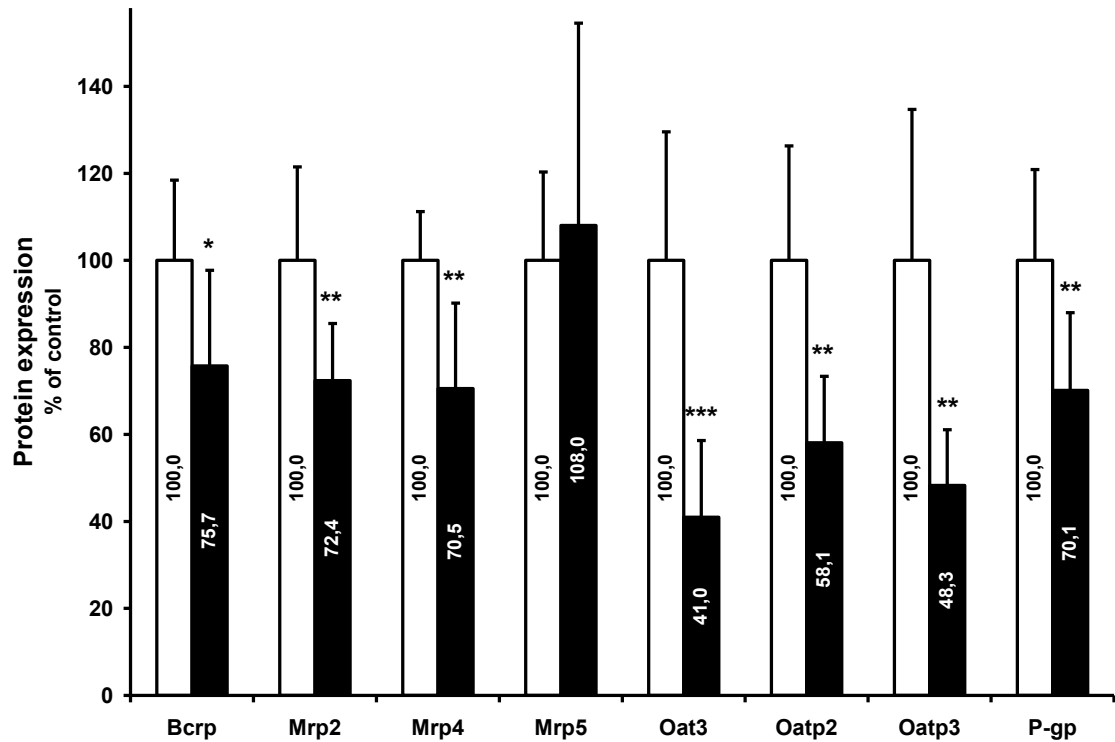
Brain/plasma radioactivity (counts per minute) ratio for 1 g brain tissue/1 mL plasma in control (CTL) (white bars) and chronic renal failure (CRF) (black bars) rats. CRF rats received a fifth of the CTL rats' dose of benzylpenicillin, but had a 17% ($p < 0.05$) higher plasma radioactivity of benzylpenicillin. However, with equal dosing between the groups, digoxin, doxorubicin and verapamil plasma radioactivity was similar in the CTL and CRF rats, respectively. The mean ratio for CTL animals was arbitrarily defined as 100%. Data are expressed as mean \pm SD of at least 4 rats in each group. *** $p < 0.001$ compared to CTL rats.

Figure 25 Protein expression of various drug transporters in rat brain endothelial (RBEC) cells incubated with the serum of CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)



Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for transporters in control (CTL) (white bars) and chronic renal failure (CRF) (black bars) rats were standardized by dividing them by the value obtained for GAPDH. The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100% (dotted line). Graphic shows the mean expression in rats expressed as percent of controls \pm SD of 10 different rat sera in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control rats.

Figure 26 Protein expression of various drug transporters in astrocytes incubated with the serum of CRF rats. (DMD 2012, brain drug transporters)



Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for transporters in control (CTL) (white bars) and chronic renal failure (CRF) (black bars) rats were standardized by dividing them by the value obtained for GAPDH. The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100% (dotted line). Graphic shows the mean expression in rats expressed as percent of controls \pm SD of 10 different rat sera in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control rats.

ESRD impairs nonrenal clearance of fexofenadine but not midazolam

J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(10): p. 2269-76.

Reprinted with permission from the American Society of Nephrology. All rights reserved.

Copyright © 2009 by The Journal of the American Society of Nephrology

**Impaired Nonrenal Clearance of Fexofenadine but Not Midazolam in Patients
with End-Stage Renal Disease**

Authors:

Thomas D. Nolin,* Reginald F. Frye,† Phuong Le,‡ Hooman Sadr,§ Judith Naud,||
Francois A. Leblond, || Vincent Pichette, || and Jonathan Himmelfarb¶

Affiliations:

*Department of Pharmacy & Therapeutics, University of Pittsburgh School of
Pharmacy, Pittsburgh, PA, USA; †Department of Pharmacotherapy and Translational
Research, and Center for Pharmacogenomics, University of Florida College of Pharmacy,
Gainesville, FL, USA; ‡Center for Clinical and Translational Research, Maine Medical
Center Research Institute, Scarborough, ME, USA; §Tidewater Kidney Specialists,
Norfolk, VA, USA; || Service de Néphrologie et Centre de Recherche, Hôpital
Maisonnette-Rosemont, and Département de Pharmacologie, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada; ¶Kidney Research Institute, and Division of Nephrology,
Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA

Running Title: Impaired Nonrenal Clearance in ESRD

Word Counts: Abstract: 227 (250 limit) **Text:** 2536 (3000 limit)

*Corresponding Author: Thomas D. Nolin, Pharm.D., Ph.D.
University of Pittsburgh School of Pharmacy
Department of Pharmacy & Therapeutics

1. ABSTRACT

ESRD can affect the pharmacokinetic disposition of drugs subject to nonrenal clearance. Cytochrome P450 (CYP) enzymes, including CYP3A, and multiple intestinal and hepatic drug transporters are thought to mediate this process, but the extent to which kidney disease alters the function of these proteins in humans is unknown. We used midazolam and fexofenadine to assess CYP3A (intestinal and hepatic) and drug transport, respectively, in patients with ESRD and healthy control subjects. We evaluated the effect of uremia on CYP3A and transporter expression *in vitro* by incubating normal rat hepatocytes and enterocytes with serum drawn from study participants. ESRD dramatically reduced nonrenal transporter function, evidenced by a 63% decrease in clearance ($P < 0.001$) and a 2.8-fold increase in area under the plasma concentration–time curve for fexofenadine ($P < 0.002$), compared with control subjects. We did not observe significant differences in midazolam or 1'-hydroxymidazolam clearance or area under the curve after oral administration, suggesting that CYP3A function is not changed by ESRD. Changes in hepatocyte and enterocyte protein expression in the presence of uremic serum were consistent with *in vivo* results. These findings demonstrate a mechanism for altered drug disposition in kidney disease, which may partially account for the high rates of drug toxicity in this population.

2. INTRODUCTION

The prevalence of chronic kidney disease (CKD) in the adult US population was recently estimated to be >13%, and the number of patients with ESRD continues to rise rapidly (Coresh et al., 2007). Patients with CKD and particularly ESRD require numerous medications, are at high risk for drug accumulation and toxicity, and experience a high rate of adverse drug events (Bates et al., 1999; Evans et al., 2005; Manley et al., 2005). Mild, moderate, and advanced CKD (*i.e.*, stages 2 through 5) have been shown to affect the disposition of drugs subject to nonrenal clearance (CL_{NR}) in both humans and animal models (Nolin et al., 2008). As depicted in Figure 27, CL_{NR} is mediated in large part by the concerted actions of cytochrome P450 (CYP) metabolic enzymes such as CYP3A4 and CYP3A5 (collectively CYP3A), multiple drug transporters including the cellular efflux transporter P-glycoprotein (P-gp), and uptake transporters known as organic anion-transporting polypeptides (OATPs) (Sun et al., 2006); however, the manner and extent to which individual pathways of nonrenal clearance are affected in humans with CKD is largely unknown.

Determination of which drug-metabolizing enzymes or transporters are affected in humans with kidney disease is inherently complicated. There is a complex interplay between enzymes and transporters in the liver, intestine, and other extrarenal organs, making it difficult to interpret clinical pharmacokinetic data mechanistically. Published studies to date have not simultaneously and separately evaluated the function of individual pathways of drug metabolism and transport in multiple organs in patients with ESRD. We hypothesized that uremia differentially affects the functional expression of drug metabolizing enzymes and transporters, which may explain the seeming inconsistent effects of uremia on the clinical pharmacokinetics of various intravenously and orally administered CYP and transporter substrates (Nolin et al., 2008).

To elucidate the physiologic mechanism by which kidney disease affects the nonrenal clearance of drugs in humans, we phenotypically evaluated hepatic and intestinal CYP3A-mediated metabolism and drug transporter activity in patients with ESRD. We investigated the clinical pharmacokinetics of midazolam, a pharmacologic probe of CYP3A metabolism, and fexofenadine, a nonspecific probe of drug transport, *in vivo*, and we assessed the effect of uremic serum on the expression of Cyp3a, Oatp, and P-gp in rat hepatocyte and enterocyte cultures.

3. RESULTS

Study Participants

A total of 10 patients with ESRD (all white, six male) and 10 healthy control subjects without kidney disease (all white, six male) participated in this study. The patients with ESRD were 51.5 ± 15.6 yr of age; weighed 78.1 ± 20.0 kg; and had a body mass index (BMI) of 27.1 ± 4.9 kg/m², a Kt/V urea value of 1.8 ± 0.3 , a blood urea nitrogen (BUN) concentration of 47.8 ± 8.7 mg/dl, and a serum creatinine (S_{CR}) concentration of 7.5 ± 1.6 mg/dl. Control subjects were 45.9 ± 13.2 yr of age; weighed 87.8 ± 33.0 kg; and had a BMI of 26.4 ± 3.0 kg/m², a BUN concentration of 14.4 ± 2.2 mg/dl, a S_{CR} concentration of 0.9 ± 0.1 mg/dl, and an estimated GFR (Levey et al., 1999) of 83.9 ± 13.4 ml/min per 1.73 m². The ESRD and control groups were well matched, with no significant differences in demographic variables except kidney function, BUN, and S_{CR}.

Effect of ESRD on the Pharmacokinetics of Fexofenadine

Mean fexofenadine plasma concentration–time curves observed in patients with ESRD and control subjects are depicted in Figure 28, and the corresponding pharmacokinetic parameters are presented in Table XIV. The findings in control subjects are comparable to the results of previous studies of healthy subjects (Lemma et al., 2006; Robertson et al., 2008). Fexofenadine clearance after oral administration (CL/F), where F is the bioavailability, was 63% slower, 102.8 ± 37.9 L/h in control subjects to 37.9 ± 19.5 L/h ($P < 0.001$) in patients with ESRD, leading to a 2.8-fold higher fexofenadine area under the plasma concentration–time curve from 0 to infinity (AUC_{0 to ∞}) in patients with ESRD ($P < 0.001$; Figure 28). A corresponding 35% longer fexofenadine half-life was also observed ($3.4 < 0.9$ h in control subjects to 4.6 ± 1.3 h in patients with ESRD; $P < 0.019$); maximum plasma concentration (C_{max}) was 74% higher ($P < 0.023$), and the time C_{max} occurred (t_{max}) was not significantly different.

Effect of ESRD on the Pharmacokinetics of Midazolam and 1'-Hydroxymidazolam

No significant differences were observed in the midazolam and 1'-hydroxymidazolam pharmacokinetic parameters after oral administration in patients with ESRD compared with healthy control subjects (Table XV), which resulted in nearly superimposable plasma concentration–time curves in the two groups (Figure 29). Midazolam CL/F values were 88.9 ± 24.6 and 96.9 ± 46.8 L/h in control subjects and patients with ESRD, respectively (NS), similar to what has been reported previously in healthy subjects (Thummel et al., 1996; Masica et al., 2004; Robertson et al., 2008).

Expression of Oatp, P-gp, and Cyp3a in Rat Hepatocytes and Enterocytes Incubated with Serum from Patients with ESRD

There was a 29% decrease ($P < 0.05$) in Oatp1a4 and a 37% increase ($P < 0.05$) in P-gp protein expression in normal hepatocytes incubated with uremic serum compared with control serum, whereas Cyp3a2 protein expression was not affected (Figure 30A). Uremic serum also significantly decreased P-gp (48%; $P < 0.05$) and Cyp3a2 (32%; $P < 0.05$) protein expression in enterocytes compared with control serum and did not affect Oatp1a5 protein expression (Figure 30B).

4. DISCUSSION

We present a phenotypic assessment of hepatic and intestinal CYP3A and transporter function in patients who had ESRD and were receiving conventional hemodialysis and demonstrate that whereas fexofenadine clearance after oral administration is significantly reduced, midazolam clearance after oral administration is not significantly altered in patients with ESRD. These results suggest that nonrenal transporter function (likely intestinal P-gp and/or hepatic OATP) is dramatically reduced, whereas intestinal and hepatic CYP3A function is similar in patients with ESRD compared with healthy control subjects. Changes in protein expression observed in hepatocytes and enterocytes incubated with serum from study participants are consistent with these *in vivo* findings and suggest that kidney disease differentially affects these clearance pathways in the liver and gastrointestinal tract. These data establish a specific uremic phenotype at a molecular and cellular level *in vivo*, which has proved difficult in patients with kidney disease (Meyer and Hostetter, 2007).

The short-acting benzodiazepine midazolam was used as a selective phenotypic probe of CYP3A (Lee et al., 2002) in this study, because it is metabolized predominantly to 1'-hydroxymidazolam by both CYP3A4 and CYP3A5 (Lin et al., 2002), and, unlike many CYP3A substrates, it is neither a P-gp nor an OATP substrate (Kim et al., 1999). No significant differences in the oral midazolam and 1'-hydroxymidazolam pharmacokinetic parameters based on total drug concentrations (protein bound plus unbound) were observed in patients with ESRD compared with healthy control subjects (Table XV). These findings contrast with those of Vinik *et al.* (Vinik et al., 1983), who reported higher clearance of intravenously administered midazolam (based on total drug concentrations) in hemodialysis patients than in matched healthy control subjects; however, after correction for protein binding changes, midazolam pharmacokinetic parameters were nearly identical in the two groups (Vinik et al., 1983). Overall, these data suggest that neither hepatic nor intestinal

CYP3A function is substantially altered in patients who have ESRD and receive conventional hemodialysis therapy.

Several studies using experimental models have suggested that kidney disease leads to decreased activity of hepatic and intestinal CYP3A secondary to reduced gene and protein expression (Leblond et al., 2001; Leblond et al., 2002), findings that differ from this *in vivo* human study. These discrepancies may be due to the more sustained, severe degree of uremia often observed in experimental models, in which, for example, plasma urea nitrogen concentrations have been reported to range from >100 to >500 mg/dl (Guevin et al., 2002; Michaud et al., 2005). These concentrations are considerably higher than are observed in well-dialyzed patients, and our study participants had mean BUN concentrations of 47.8 ± 8.7 mg/dl. It is also possible that dialysis depletes serum of uremic toxins, which may directly affect CYP3A, thereby normalizing CYP3A function.

Previous phenotypic assessments of CL_{NR} in patients with ESRD using the ^{14}C -erythromycin breath test (ErBT) have been reported (Dowling et al., 2003), and we recently demonstrated that hemodialysis acutely improves ErBT results, suggesting that erythromycin clearance is increased after dialysis (Nolin et al., 2006). The ErBT is based on the principle that radiolabeled ^{14}C -erythromycin undergoes N-demethylation by CYP3A4, and the demethylated carbon (^{14}C) rapidly appears in breath as $^{14}CO_2$ (Watkins, 1994). According to the standard interpretation, a decrease in ErBT results (*i.e.*, decreased excretion of $^{14}CO_2$) translates into a reduction in CYP3A4 activity, and *vice versa*. Although the ErBT is a widely used phenotypic trait measure long considered a specific index of hepatic CYP3A4 activity, recent data indicated that erythromycin undergoes OATP uptake and P-gp efflux in addition to CYP3A4 metabolism (Kurnik et al., 2006; Frassetto et al., 2007). It is now recognized that considerable overlapping substrate specificity and complex interplay exist between CYP3A and transporters (Lam et al., 2006), such that alterations in transporters but not CYP3A, *per se*, may result in significant changes in the clinical pharmacokinetics of many CYP3A substrates (Frassetto et al., 2007;

Lau et al., 2007). Reduced OATP uptake lowers the amount of intracellular ^{14}C -erythromycin available for CYP3A4 metabolism and ultimately manifests as decreased excretion of $^{14}\text{CO}_2$ (Frassetto et al., 2007); therefore, the previously reported decrease in ErBT results in patients with ESRD may indicate reduced OATP-mediated hepatic uptake of erythromycin rather than reduced CYP3A4 activity.

A recent clinical pharmacokinetic study of orally and intravenously administered erythromycin to patients with ESRD demonstrated that hepatic clearance but not oral absorption was significantly reduced (Frassetto et al., 2008), further supporting the concept that hepatic OATP uptake is decreased in patients with ESRD. Conversely, an increase in ErBT results may indicate that OATP-mediated hepatic uptake of erythromycin is increased, which then increases the amount of intracellular substrate available for CYP3A4 metabolism, thereby leading to increased $^{14}\text{CO}_2$ excretion. The latter explanation supports previously reported findings of improved ErBT results after dialysis (Nolin et al., 2006), and our findings of significantly reduced fexofenadine clearance and unaltered hepatic and intestinal CYP3A activity in patients with ESRD mechanistically corroborate this reasoning.

There are several possible physiologic explanations for the observed reduction in fexofenadine clearance and corresponding increase in AUC: (1) Reduced intestinal P-gp efflux and increased bioavailability, (2) increased OATP1A2 uptake in the intestine and increased bioavailability, (3) reduced hepatic OATP1B1 or OATP1B3 uptake, and (4) decreased hepatic P-gp efflux. Taking the previously described ErBT data into consideration, however, the most likely explanation for decreased fexofenadine clearance is reduced hepatic OATP (likely OATP1B1 or OATP1B3 (Matsushima et al., 2008b)) uptake and/or reduced enteric P-gp efflux with increased bioavailability (Figure 27). Previous evidence that P-gp plays a vital role in intestinal absorption and only a limited role in biliary excretion of fexofenadine (Tahara et al., 2005), along with recent clinical data demonstrating that hepatic clearance but not oral absorption of the OATP, P-gp, and

CYP3A substrate erythromycin is significantly reduced in patients with ESRD, further supports this explanation (Frassetto et al., 2008). A significant decrease in Oatp1a4 protein expression was observed whereas P-gp expression was increased in hepatocytes incubated with uremic sera (Figure 30A). Conversely, Oatp1a5 expression was unchanged and P-gp expression was significantly decreased in enterocytes incubated with uremic sera (Figure 30B). A reduction in enterocyte P-gp protein expression would likely translate into an increase in the bioavailability of P-gp substrates such as fexofenadine. Furthermore, with a decrease in the expression of liver OATP, a marked increase in serum concentrations, decreased clearance, and increased plasma half-life would be expected, as we observed *in vivo* (Table XIV; Figure 28).

There are several limitations to this study. Polymorphisms in the genes encoding for P-gp (Yi et al., 2004) and OATP (Niemi et al., 2005) have been associated with altered activity of the transporters and may lead to increased plasma concentrations of fexofenadine. Because study participants were not genotyped, the possibility of polymorphically expressed P-gp or OATP in some individuals contributing to the observed reduction in fexofenadine clearance cannot be ruled out; however, given the magnitude of the difference in fexofenadine clearance between patients with ESRD and healthy subjects and the absence of outliers (*i.e.*, individuals who exhibited serum concentrations and pharmacokinetic parameters that were profoundly higher or lower than most), it is unlikely that genotypic differences would explain the observed findings. Moreover, although CYP3A4 and CYP3A5 are polymorphically expressed, allelic variants of each do not seem to have functional phenotypic implications for midazolam (Wandel et al., 2000; Floyd et al., 2003; Kharasch et al., 2007).

Another potential limitation of this work is that midazolam and fexofenadine protein binding (or unbound fraction) and pharmacokinetics of the unbound moieties were not determined. Midazolam is normally 96% protein bound, so it is possible that the midazolam unbound fraction was increased in patients with ESRD, resulting in increased hepatic

clearance; however, in a previous study, unbound midazolam concentrations and corresponding pharmacokinetic parameters were nearly identical in patients with ESRD and healthy control subjects (Vinik et al., 1983). Because the majority of patients with ESRD are functionally anuric, urine could not be collected for determination of 1'-hydroxymidazolam formation clearance to confirm *in vivo* findings of unaltered midazolam systemic clearance.

Although this study was well powered to detect a difference in fexofenadine clearance between patients with ESRD and control subjects, the power to detect a difference in midazolam clearance (the primary surrogate of CYP3A activity) was sufficient only to detect a comparatively large difference (50%); however, this magnitude of difference in midazolam clearance is consistent with moderate inhibitors of CYP3A activity (*e.g.*, diltiazem, fluconazole) and is more likely to be clinically relevant than differences of smaller magnitude. Thus, we cannot entirely exclude the possibility that a true difference exists in midazolam clearance between well dialyzed patients with ESRD and healthy control subjects; however, given that we observed nearly superimposable plasma concentration–time curves in the two groups for midazolam and 1'-hydroxymidazolam (Figure 29), the magnitude of any true difference in midazolam clearance is likely to be small.

Fexofenadine is a widely used probe drug for phenotypically assessing P-gp and OATP in humans (Drescher et al., 2002; Glaeser et al., 2007); however, recent animal studies suggested that it is also a substrate of multidrug resistance–associated proteins and the bile salt export pump (Matsushima et al., 2008a; Tian et al., 2008a; Tian et al., 2008b). Consequently, it is possible that alterations in multidrug resistance–associated protein or bile salt export pump transport contributed to the reduction in fexofenadine clearance observed in this study; however, our results clearly show that transporter function is altered in patients with ESRD and that further study is warranted.

In conclusion, we present a phenotypic assessment of hepatic and intestinal CYP3A and transporter function in patients who have ESRD and receive conventional hemodialysis and demonstrate that transporter function (likely hepatic OATP and/or intestinal P-gp) is significantly reduced whereas hepatic and intestinal CYP3A function is not affected in patients with ESRD compared with healthy control subjects. These data establish a specific *in vivo* phenotype of uremia at the molecular and cellular levels. Moreover, these results provide important mechanistic insight for understanding the physiologic effects of uremia on nonrenal drug metabolism and transport pathways that are critical determinants of drug disposition, response, and outcome and have direct clinical implications because they may ultimately lead to a better understanding of optimal drug choices and dosages to maximize efficacy while minimizing toxicity.

5. CONCISE METHODS

Study Participants

After providing written informed consent, all participants underwent a screening evaluation based on complete medical history, physical examination, medication history, and laboratory testing. Eligibility criteria included age 18 to 70 year, normal hepatic function, BMI \leq 35 kg/m², dialysis Kt/V \geq 1.20, nonsmoking status, and a negative pregnancy test for women of child-bearing potential. Kidney function in control subjects was estimated according to the method of Levey *et al.* (Levey *et al.*, 1999) (Modification of Diet in Renal Disease [MDRD] prediction equation). Individuals who had known hepatic or gastrointestinal disease; were taking drugs or dietary products that are known to inhibit or induce CYP3A, P-gp, or OATP; or had a known sensitivity or previous adverse reaction to midazolam or fexofenadine were excluded. Participants were instructed to abstain from consuming any grapefruit products, alcoholic beverages, herbal supplements/teas, and over-the-counter remedies for at least 72 h before and during the study day, and caffeine-containing products were prohibited on the study day.

Study Design

This was an open-labeled, prospective, fixed-order, parallel-group study, which adhered to the Declaration of Helsinki and was approved by the Maine Medical Center institutional review board. Patients with ESRD were studied the day after regularly scheduled hemodialysis. Each patient received 120 mg of fexofenadine (Teva Pharmaceuticals, Sellersville, PA) orally at time 0, followed by a 2-mg oral dose of midazolam (1 ml, 2 mg/ml oral syrup; Ranbaxy Pharmaceuticals, Jacksonville, FL) at time +2 h. Participants fasted overnight before the study day until time +4 h, when they received a small snack. Standardized meals were given at time +5 and +10 h. Venous blood samples (3 ml) were collected through an indwelling catheter immediately before and serially after administration of each probe drug for pharmacokinetic determination as follows: at baseline

and at 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 480, and 720 min after oral fexofenadine administration and immediately before and at 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, and 240 min after oral midazolam administration. Blood samples were drawn into prechilled EDTA tubes, kept on ice, and centrifuged within 30 min of collection. Plasma was stored at -80°C until analysis.

Analytical Assays

The total (protein bound plus unbound) plasma concentrations of midazolam, 1'-hydroxymidazolam, and fexofenadine were determined by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive electrospray ionization in the selected reaction monitoring mode. The liquid chromatography–tandem mass spectrometry system consists of a Surveyor HPLC autosampler, a Surveyor MS quaternary pump, and a TSQ Quantum Discovery triple quadrupole mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA).

Midazolam and 1'-Hydroxymidazolam

Briefly, plasma (250 µl) was combined with 2 N sodium hydroxide (100 µl) and internal standards (30 µl) and vortex-mixed briefly before the addition of methyl tert-butyl ether (1 ml). Tubes were capped, vortex-mixed, and centrifuged at 20,817 x g for 5 min. The ether layer was transferred, evaporated under nitrogen, reconstituted with 150 µl of methanol:water (1:1), and then injected into the system. The mobile phases used for the analysis were 0.1% formic acid in deionized water (mobile phase A) and 0.1% formic acid in methanol (mobile phase B), delivered in a gradient at a flow rate of 0.2 ml/min. The analytical column was a Phenomenex Synergi Polar-RP, 75.0 x 2.0mm, 4-µ column. The MS acquisition parameters included a spray voltage of 4.0 kV and heated capillary temperature at 300°C. Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas and set to 30 and 15 arbitrary units, respectively. The argon collision gas pressure was set to 1.5 mTorr, and the collision energy was 47 eV for 1'-hydroxymidazolam, 37 eV for midazolam, 38 eV for alprazolam (1'-hydroxymidazolam internal standard), and 42 eV for diazepam (midazolam

internal standard). The selected reaction monitoring scheme followed transitions of the $[M+H]^+$ precursor to selected product ions with the following values: m/z 326.123291.09 for midazolam, m/z 342.103167.90 for 1'-hydroxymidazolam, m/z 309.103281.00 for alprazolam, and m/z 285.103193.08 for diazepam. The lower limit of quantification for midazolam and 1'-hydroxymidazolam was 0.2 ng/ml using 0.25 ml of plasma. The within-run and between-run precision (percentage coefficients of variation) was <7%.

Fexofenadine

Briefly, plasma (100 μ l) was combined with acetonitrile (300 μ l) containing internal standard in a Captiva filter plate and vortex-mixed briefly before allowing the inverted plate to stand at room temperature for 5 min. The filter plate was fitted with a collection plate before the application of the vacuum; the filtrate was then injected into the system. The mobile phase was 0.1% formic acid, 5 mM ammonium acetate in deionized water, and methanol (35:65, vol/vol) delivered at a flow rate of 0.20 ml/min; the column used was a Phenomenex Gemini, 150.0 x 2.0 mm, 5- μ analytical column. The MS acquisition parameters included a spray voltage of 4.6 kV and heated capillary temperature of 375°C. Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas and set to 35 and 10 arbitrary units, respectively. The argon collision gas pressure was set to 1.5 mTorr, and the collision energy was 41 eV for both fexofenadine and fexofenadine-D6 (internal standard). The selected reaction monitoring scheme followed the transitions of m/z 502.33171.0 for fexofenadine and 508.33177.0 for fexofenadine-D6. The limit of quantification for fexofenadine was 0.1 ng/ml using 0.1 ml of plasma, and the within-run and between-run precision was <5%.

Pharmacokinetic Analysis

Fexofenadine pharmacokinetic parameters were estimated from plasma concentration data using standard noncompartmental methods (WinNonlin Professional 4.1; PharSight Corp., Mountain View, CA). The C_{max} , the t_{max} , and the last plasma

concentration measured (*i.e.*, the 12-h concentration in plasma [C_{12}]) were obtained directly from the individual plasma concentration–time profiles. The terminal elimination rate constant (λ_z) was estimated by linear regression of the terminal phase of the logarithmic plasma concentration–time curve. Terminal elimination half-life ($t_{1/2}$) was calculated by dividing 0.693 by λ_z . Area under the plasma concentration–time curve from 0 to 12 h ($AUC_{0\text{ to }12}$) was calculated with the log-linear trapezoidal rule. The $AUC_{0\text{ to }\infty}$ was calculated as $AUC_{0\text{ to }12} + C_{12}/\lambda_z$. The CL/F of fexofenadine was calculated as the oral dosage/ $AUC_{0\text{ to }\infty}$. Midazolam and 1'-hydroxymidazolam pharmacokinetic parameters were also calculated using noncompartmental methods. The $AUC_{0\text{ to }4}$ was calculated with the log-linear trapezoidal rule. $AUC_{0\text{ to }\infty}$, C_{\max} , t_{\max} , λ_z , $t_{1/2}$, and CL/F were calculated as described already.

In Vitro Studies

For investigation of the effects of kidney disease on the expression of P-gp, Oatp, and Cyp3a in liver and intestine, primary cultures of normal rat hepatocytes and enterocytes were incubated with serum drawn from each patient as described previously (Michaud et al., 2005; Naud et al., 2007). Hepatocytes were isolated from normal male Sprague-Dawley rats (Charles River, Saint-Charles, Quebec, Canada) using the two-step liver perfusion method with minor modification using collagenase type 4 (Worthington, Lakewood, NJ) for digestion of hepatic tissue, then incubated for 48 h with 2 ml of William's E medium containing 10% serum obtained at baseline from patients with ESRD or control subjects (Guevin et al., 2002; Michaud et al., 2005). Intestinal membrane proteins were prepared from rat enterocytes as described previously (Naud et al., 2007) using two thirds of the small intestine, then incubated for 48 h in culture medium containing 10% serum from patients with ESRD or control subjects. All experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals and under the supervision of our local animal care committee.

Western Blot Analysis

Protein expression of intestinal and hepatic Cyp3a2 (Leblond et al., 2002), intestinal P-gp and Oatp1a5, and hepatic P-gp and Oatp1a4 was assessed *via* Western blotting as described previously (Naud et al., 2007; Naud et al., 2008). β -Actin and villin were used as loading controls with hepatocytes and enterocytes, respectively. Immune reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry on a Fujifilm LAS-3000 camera system coupled to Multi-Gauge software (Fujifilm Life Science USA, Stamford, CT). Every blot was repeated three times, and results were pooled to obtain the final reported values.

Statistical Analysis

For the *in vivo* study, determination of the target sample size was based on the reported between-subject coefficient of variation for fexofenadine CL/F of approximately 26% (Russell et al., 1998). The sample size of $n=10$ subjects per group was estimated *a priori* to have 84% power (two-sided type I error of 0.05) to detect a 37% difference in fexofenadine clearance. Moreover, on the basis of the reported between-subject coefficient of variation for midazolam total clearance after oral administration of approximately 36% (Wandel et al., 2000), a sample size of $n=10$ subjects per group was estimated *a priori* to have 82% power (two-sided type I error of 0.05) to detect a 50% difference in midazolam clearance. For avoiding the assumption of normally distributed data, group-wise (patients with ESRD *versus* control subjects) comparisons of fexofenadine and midazolam pharmacokinetic parameters were made by the Mann-Whitney *U* test. Power calculations were carried out with G*Power 3.0.10 (Faul et al., 2007), and all other statistical calculations were performed with Prism 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA). Data are presented as means \pm SD unless otherwise noted. For *in vitro* studies, differences between groups were assessed by the unpaired two-sided *t* test or an ANOVA test. Significant ANOVA was followed by a *post hoc* Scheffe analysis. $P < 0.05$ was considered significant for all comparisons.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from the Maine Medical Center Research Institute (T.D.N.), the Satellite Healthcare Research Foundation (T.D.N.), the Canadian Institute of Health Research (V.P.), and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (V.P. and J.N.).

This study was presented in part at the annual meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics; April 2 through 5, 2008; Orlando, FL; and has appeared in abstract form (*Clin Pharmacol Ther* 83[Suppl 1]: S58, 2008).

During this research, Dr. Nolin was a clinical pharmacologist, Dr. Sadr was a renal fellow, and Dr. Himmelfarb was Director, Division of Nephrology and Transplantation, Department of Medicine, Maine Medical Center (Portland, ME).

7. REFERENCES

- Bates DW, Miller EB, Cullen DJ, Burdick L, Williams L, Laird N, Petersen LA, Small SD, Sweitzer BJ, Vander Vliet M and Leape LL (1999) Patient risk factors for adverse drug events in hospitalized patients. ADE Prevention Study Group. *Arch Intern Med* **159**:2553-2560.
- Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F and Levey AS (2007) Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* **298**:2038-2047.
- 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.
- Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M, Hofmann U, Schwab M, Brinkmann U, Eichelbaum M and Fromm MF (2002) MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol* **53**:526-534.
- Evans RS, Lloyd JF, Stoddard GJ, Nebeker JR and Samore MH (2005) Risk factors for adverse drug events: a 10-year analysis. *Ann Pharmacother* **39**:1161-1168.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG and Buchner A (2007) G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* **39**:175-191.
- Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL, Jr., Bhat K, Kim RB and Wilkinson GR (2003) Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* **13**:595-606.
- Frassetto LA, Poon S, Tsourounis C, Valera C and Benet LZ (2007) Effects of uptake and efflux transporter inhibition on erythromycin breath test results. *Clin Pharmacol Ther* **81**:828-832.

- Frassetto LA, Sun H, Huang Y and Benet LZ (2008) Uremic toxins decrease hepatic clearance but not oral bioavailability of erythromycin in patients with end stage renal disease [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* **19**:929A.
- Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG and Kim RB (2007) Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* **81**:362-370.
- 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.
- Kharasch ED, Walker A, Isoherranen N, Hoffer C, Sheffels P, Thummel K, Whittington D and Ensign D (2007) Influence of CYP3A5 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cytochrome P4503A probes alfentanil and midazolam. *Clin Pharmacol Ther* **82**:410-426.
- Kim RB, Wandel C, Leake B, Cvetkovic M, Fromm MF, Dempsey PJ, Roden MM, Belas F, Chaudhary AK, Roden DM, Wood AJ and Wilkinson GR (1999) Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* **16**:408-414.
- Kurnik D, Wood AJ and Wilkinson GR (2006) The erythromycin breath test reflects P-glycoprotein function independently of cytochrome P450 3A activity. *Clin Pharmacol Ther* **80**:228-234.
- Lam JL, Okochi H, Huang Y and Benet LZ (2006) In vitro and in vivo correlation of hepatic transporter effects on erythromycin metabolism: characterizing the importance of transporter-enzyme interplay. *Drug Metab Dispos* **34**:1336-1344.
- Lau YY, Huang Y, Frassetto L and Benet LZ (2007) effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **81**:194-204.
- 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.
- Lee JI, Chaves-Gnecco D, Amico JA, Kroboth PD, Wilson JW and Frye RF (2002) Application of semisimultaneous midazolam administration for hepatic and intestinal cytochrome P450 3A phenotyping. *Clin Pharmacol Ther* **72**:718-728.
- Lemma GL, Wang Z, Hamman MA, Zaheer NA, Gorski JC and Hall SD (2006) The effect of short- and long-term administration of verapamil on the disposition of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein substrates. *Clin Pharmacol Ther* **79**:218-230.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N and Roth D (1999) A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* **130**:461-470.
- Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, Schuetz EG and Thummel KE (2002) Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* **62**:162-172.
- Manley HJ, Cannella CA, Bailie GR and St Peter WL (2005) Medication-related problems in ambulatory hemodialysis patients: a pooled analysis. *Am J Kidney Dis* **46**:669-680.
- Masica AL, Mayo G and Wilkinson GR (2004) In vivo comparisons of constitutive cytochrome P450 3A activity assessed by alprazolam, triazolam, and midazolam. *Clin Pharmacol Ther* **76**:341-349.
- Matsushima S, Maeda K, Hayashi H, Debori Y, Schinkel AH, Schuetz JD, Kusuhara H and Sugiyama Y (2008a) Involvement of multiple efflux transporters in hepatic disposition of fexofenadine. *Mol Pharmacol* **73**:1474-1483. Epub 2008 Feb 1471.
- Matsushima S, Maeda K, Ishiguro N, Igarashi T and Sugiyama Y (2008b) Investigation of the inhibitory effects of various drugs on the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug Metab Dispos* **36**:663-669.

- Meyer TW and Hostetter TH (2007) Uremia. *N Engl J Med* **357**:1316-1325.
- 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.
- Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond FA, Mitchell A, Jones C, Bonnardeaux A and Pichette V (2007) Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:978-985.
- Naud J, Michaud J, Leblond FA, Lefrancois S, Bonnardeaux A and Pichette V (2008) Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug Metab Dispos* **36**:124-128.
- Niemi M, Kivisto KT, Hofmann U, Schwab M, Eichelbaum M and Fromm MF (2005) Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SLCO1B1 gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol* **59**:602-604.
- 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.
- 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.
- Robertson SM, Davey RT, Voell J, Formentini E, Alfaro RM and Penzak SR (2008) Effect of Ginkgo biloba extract on lopinavir, midazolam and fexofenadine pharmacokinetics in healthy subjects. *Curr Med Res Opin* **24**:591-599.
- Russell T, Stoltz M and Weir S (1998) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerance of single- and multiple-dose fexofenadine hydrochloride in healthy male volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **64**:612-621.
- Sun H, Frassetto L and Benet LZ (2006) Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* **109**:1-11.

- Tahara H, Kusuhara H, Fuse E and Sugiyama Y (2005) P-glycoprotein plays a major role in the efflux of fexofenadine in the small intestine and blood-brain barrier, but only a limited role in its biliary excretion. *Drug Metab Dispos* **33**:963-968.
- Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD and Wilkinson GR (1996) Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **59**:491-502.
- Tian X, Swift B, Zamek-Gliszczyński MJ, Belinsky MG, Kruh GD and Brouwer KL (2008a) Impact of basolateral multidrug resistance-associated protein (Mrp) 3 and Mrp4 on the hepatobiliary disposition of fexofenadine in perfused mouse livers. *Drug Metab Dispos* **36**:911-915.
- Tian X, Zamek-Gliszczyński MJ, Li J, Bridges AS, Nezasa K, Patel NJ, Raub TJ and Brouwer KL (2008b) Multidrug resistance-associated protein 2 is primarily responsible for the biliary excretion of fexofenadine in mice. *Drug Metab Dispos* **36**:61-64.
- Vinik HR, Reves JG, Greenblatt DJ, Abernethy DR and Smith LR (1983) The pharmacokinetics of midazolam in chronic renal failure patients. *Anesthesiology* **59**:390-394.
- Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ and Wilkinson GR (2000) CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* **68**:82-91.
- Watkins PB (1994) Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* **4**:171-184.
- Yi SY, Hong KS, Lim HS, Chung JY, Oh DS, Kim JR, Jung HR, Cho JY, Yu KS, Jang IJ and Shin SG (2004) A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. *Clin Pharmacol Ther* **76**:418-427.

8. TABLES

Tableau XIV Pharmacokinetic parameter estimates of fexofenadine after oral administration of 120 mg. (JASN 2009)

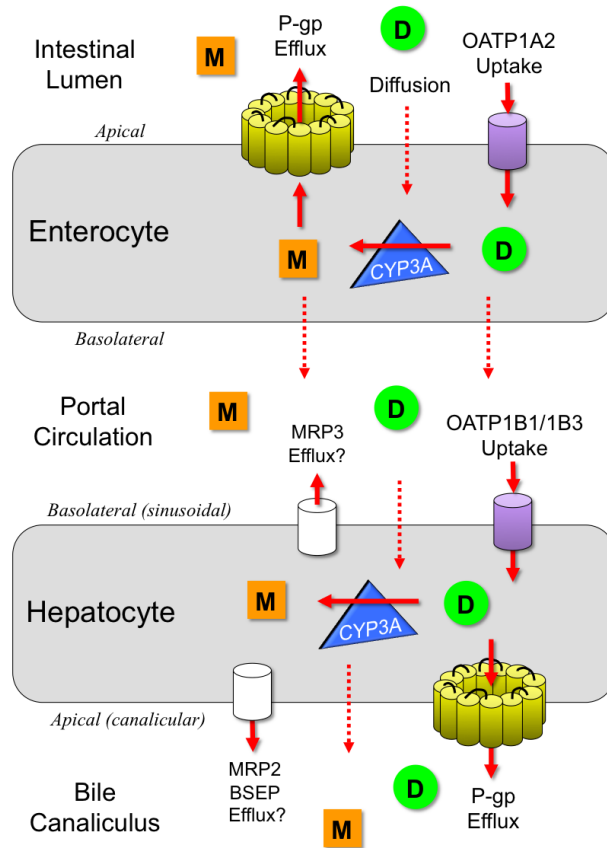
Parameter	Control subjects	Patients with ESRD	P
C_{\max} (ng/ml; mean \pm SD)	267.2 \pm 130.3	464.2 \pm 194.7	0.023
t_{\max} (h; median [range])	2 (1 to 4)	2 (1 to 6)	NS
$t_{1/2}$ (h; mean \pm SD)	3.4 \pm 0.9	4.6 \pm 1.3	0.019
CL/F (L/h; mean \pm SD)	102.8 \pm 37.9	37.9 \pm 19.5	<0.001
$AUC_{0\text{ to }\infty}$ (h/ng per ml; mean \pm SD)	1380.2 \pm 674.1	3926.2 \pm 1842.8	<0.001

Tableau XV Pharmacokinetic parameter estimates of midazolam and 1'-hydroxymidazolam after oral administration of midazolam 2 mg. (JASN 2009)

Parameter	Control Subjects	Patients with ESRD	P
Midazolam			
C_{\max} (ng/ml; mean \pm SD)	12.3 \pm 3.9	11.0 \pm 5.3	NS
t_{\max} (h; median [range])	0.50 (0.33 to 0.75)	0.5. (0.33 to 1.50)	NS
$t_{1/2}$ (h; mean \pm SD)	1.8 \pm 0.7	2.6 \pm 2.4	NS
CL/F (L/h; mean \pm SD)	88.9 \pm 26.4	96.9 \pm 46.8	NS
AUC _{0 to ∞} (h/ng per ml; mean \pm SD)	23.8 \pm 5.7	26.1 \pm 13.1	NS
1'-Hydroxymidazolam			
C_{\max} (ng/ml; mean \pm SD)	3.6 \pm 1.5	3.0 \pm 1.3	NS
t_{\max} (h; median [range])	0.750 (0.330 to 0.750)	0.625 (0.330 to 1.500)	NS
AUC _{0 to ∞} (h/ng per ml; mean \pm SD)	6.4 \pm 2.5	6.2 \pm 2.3	NS

9. FIGURES AND LEGENDS

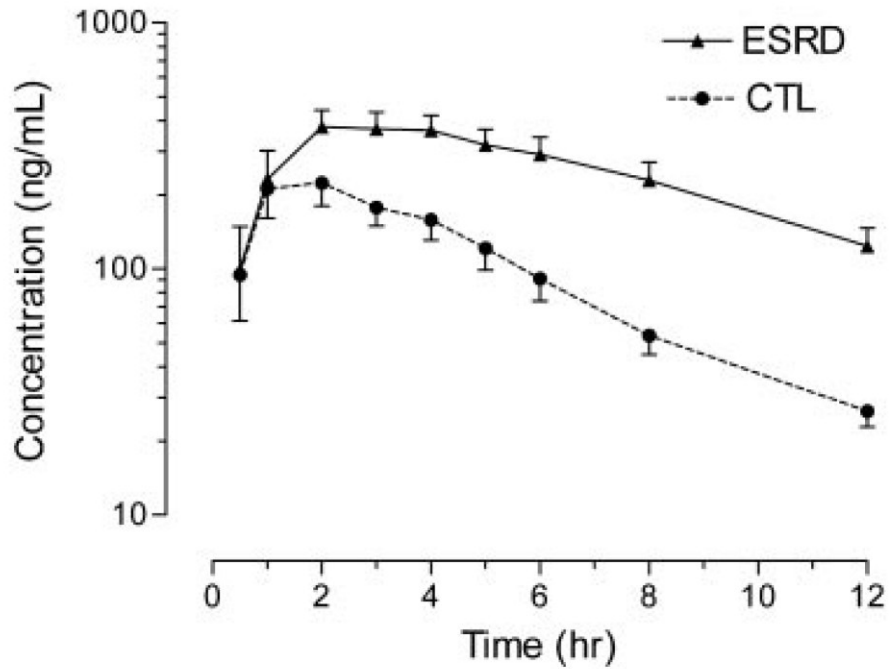
Figure 27 OATP, P-gp, and CYP3A interplay in the disposition of drugs.



The concerted actions of OATP, P-gp, and CYP3A determine the disposition of many drugs. Briefly, after oral administration, a drug (D, green circle) comes into contact with enterocytes lining the lumen of the gut wall, where it may diffuse or undergo active OATP-mediated transport (uptake) across the apical membrane into the enterocyte, frequently followed by CYP3A-mediated metabolism. Subsequently, the parent drug and/or metabolite (M, orange square) may be either (1) actively countertransported (effluxed) via P-gp back across the apical membrane into the gut lumen to be fecally excreted or endure repeated uptake-metabolism-efflux cycling or (2) translocated across the basolateral membrane into the portal circulation. Once in the portal circulation, drugs and metabolites may either

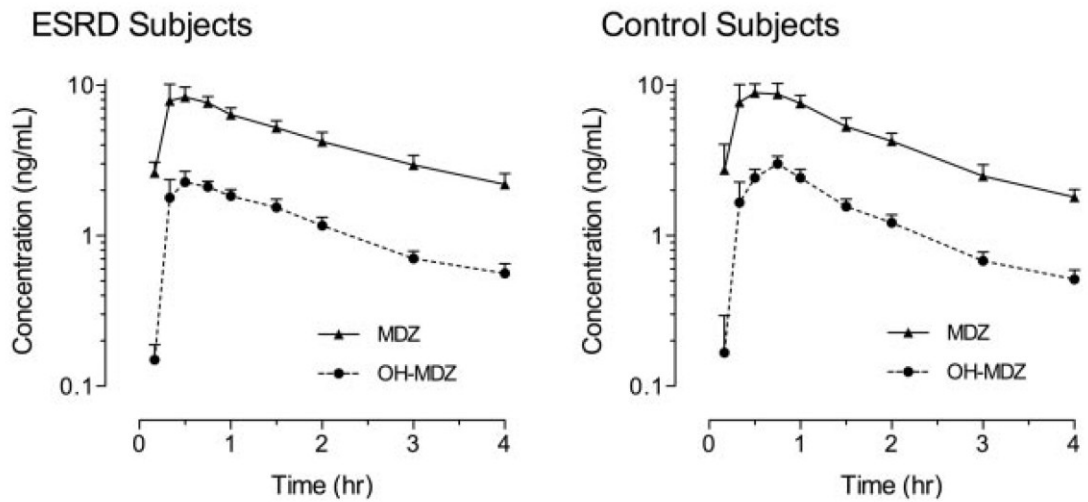
diffuse or undergo active OATP-mediated uptake across the basolateral (sinusoidal) membrane of the hepatocyte, again followed by CYP3A-mediated metabolism, then diffusion or P-gp-mediated efflux across the apical (canalicular) membrane into the bile for excretion. Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and bile salt export pump (BSEP) may also be involved in the biliary excretion and MRP3 in the basolateral efflux of fexofenadine. Enterohepatic recirculation of drugs from the bile back into the gut is possible.

Figure 28 Effect of ESRD on the pharmacokinetics of fexofenadine. (JASN 2009)



Mean \pm SEM fexofenadine serum concentration–time curves observed in patients with ESRD (solid line) and healthy control subjects (dashed line) after administration of a single oral dose of 120 mg.

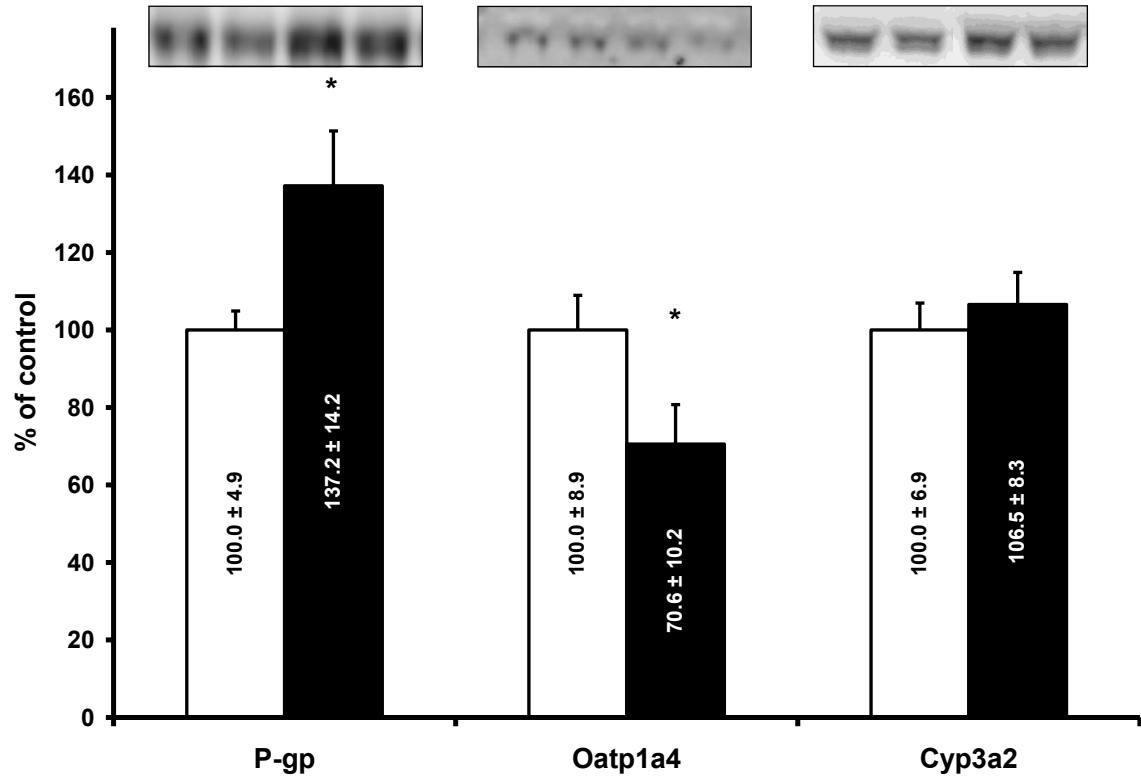
Figure 29 Effect of ESRD on the pharmacokinetics of midazolam and 1'-hydroxymidazolam (JASN 2009)



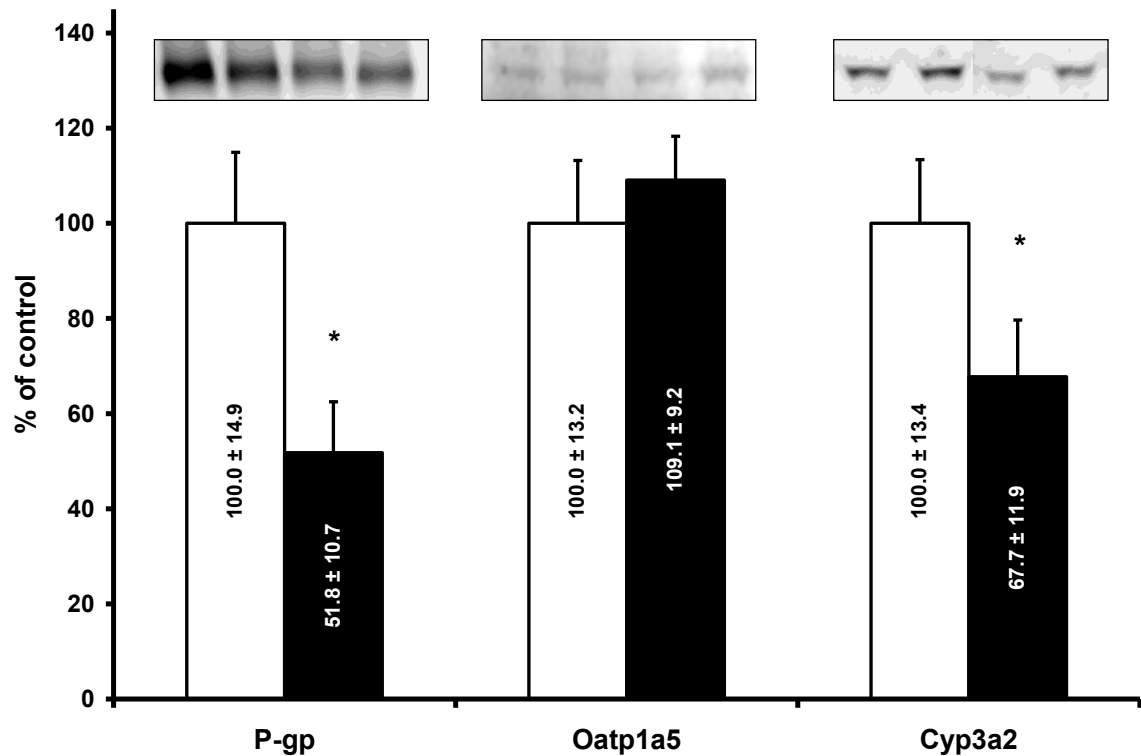
Mean \pm SEM midazolam (solid line) and 1'-hydroxymidazolam (dashed line) serum concentration–time curves observed in patients with ESRD (left) and healthy control subjects (right) after administration of a single oral dose of midazolam 2 mg.

Figure 30 Expression of Oatp, P-gp, and Cyp3a in rat hepatocytes and enterocytes incubated with serum from patients with ESRD (JASN 2009)

A.



B.



(A and B) Protein expression of P-gp, Oatp1a4, and Cyp3a2 (A) in normal rat hepatocytes, and P-gp, Oatp1a5, and Cyp3a2 (B) in normal rat enterocytes incubated for 48 h with serum from healthy control subjects (open bars) or patients with ESRD (filled bars). The standardized densitometry units of control samples were defined as 100%. Data are means \pm SEM of three experiments. * $P < 0.05$ compared with control subjects.

Discussion

Le but de ce travail de doctorat était d'étudier les effets de l'IRC sur la cinétique des médicaments, particulièrement sur leur transport actif, afin de bien comprendre les mécanismes conduisant à l'importante incidence de toxicité et d'effets indésirables observée chez les sujets souffrant d'insuffisance rénale chronique. Mon hypothèse de travail étant que l'IRC affecte l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments situés dans l'intestin, le foie, les reins et à la barrière hématoencéphalique modifiant la biodisponibilité, l'élimination hépatique, la sécrétion tubulaire active et l'entrée des médicaments dans le cerveau.

Pour ce faire, nous avons réalisé trois études mesurant l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments hépatiques, rénaux et cérébraux dans un modèle de rat souffrant d'insuffisance rénale chronique induite par néphrectomie 5/6°. L'expression et l'activité intestinale des transporteurs ayant déjà été évaluées dans le cadre de ma maîtrise⁵⁵. Les animaux du groupe témoin ont subi deux laparotomies blanches. Lors du sacrifice, six semaines après la première chirurgie, on observe une nette différence entre la clairance de la créatinine et l'urée sanguine dans les deux groupes, deux marqueurs d'insuffisance rénale, ce qui démontre bien l'IRC des animaux dans le cadre des trois études utilisant ce modèle.

Finalement, nous avons réalisé une étude en collaboration avec le Maine Medical Center qui visait à mesurer les impacts de l'IRC sur la pharmacocinétique des médicaments administrés chez l'humain. Dans cette étude, la pharmacocinétique de deux médicaments, la fexofénadine et le midazolam, a été évaluée chez des sujets humains souffrant d'insuffisance rénale terminale nécessitant des traitements d'hémodialyse et chez des sujets témoins paires selon leur âge, leur poids et leur origine ethnique.

1. LES ETUDES CHEZ LE RAT

1.1 LES IMPACTS DE L'IRC SUR LE TRANSPORT DES MEDICAMENTS DANS LE FOIE DE RATS

La première étude consistait à évaluer les impacts de l'IRC sur les transporteurs hépatiques de médicaments chez des rats. Tout d'abord, nous avons mesuré l'expression protéique et l'ARNm de Mrp2, Oatp2 et P-gp dans le foie d'animaux souffrant d'IRC ou témoins. Ensuite, nous avons mesuré, *in vivo*, l'activité de la P-gp hépatique par la mesure de l'excrétion biliaire de la rhodamine 123 chez ces animaux. Finalement, nous avons voulu déterminer si les changements observés *in vivo* étaient attribuables à la présence d'un facteur circulant s'accumulant dans le sérum des animaux néphrectomisés en mesurant l'expression protéique des transporteurs dans des hépatocytes de rat en culture incubée avec du sérum de rats souffrant d'IRC ou témoins.

Tout d'abord, dans le foie, nos résultats montrent que l'expression protéique de la P-gp, mesurée dans des homogénats de foie par immunobuvardage de type Western, est significativement augmentée, alors que celle de Mrp2 demeure inchangée et celle de Oatp2 est significativement diminuée chez les animaux néphrectomisés comparativement aux animaux témoins. L'augmentation de l'expression protéique de la P-gp semble être due à une augmentation de l'expression de son ARNm puisque celui-ci est induit. On observe aussi une induction de l'ARNm de Mrp2 bien que son expression protéique ne soit pas modifiée. Finalement, la diminution de l'expression protéique de Oatp2 ne semble pas associée à une diminution de la transcription de son gène puisque les niveaux d'ARNm d'Oatp2 sont identiques chez les animaux témoins et les animaux néphrectomisés.

Ces résultats diffèrent de ceux précédemment publiés par Laouari *et al.* qui avaient observé, dans le foie de rats souffrant d'insuffisance rénale, une augmentation de l'expression protéique et de l'ARNm de Mrp2⁹⁵. En effet, nous avons obtenu une augmentation

comparable de l'ARNm de Mrp2 sans toutefois observer d'augmentation de son expression protéique³³⁰. Cette divergence pourrait être attribuée à une différence dans la spécificité de l'anticorps anti-Mrp2 utilisé. Toutefois, Laouari *et al.* n'avaient pas observé de changement significatif de l'expression protéique et de l'ARNm de la P-gp⁹⁵ alors que nous observons une augmentation significative. Cela pourrait être dû au degré de sévérité de l'IRC dans les deux études, puisque nous avons précédemment montré une corrélation entre la clairance de la créatinine et l'expression protéique de la P-gp⁵⁵. Les animaux néphrectomisés de l'étude de Laouari *et al.* présentaient une diminution d'environ 60 % de la clairance de la créatinine alors que nos animaux présentaient une diminution d'environ 75 % par rapport aux animaux témoins. Le degré plus sévère de l'IRC chez nos animaux pourrait donc avoir favorisé l'apparition de ces changements d'expression.

De plus, pour Oatp2 et Mrp2, l'expression de l'ARNm chez les sujets néphrectomisés n'est pas corrélée avec l'expression de la protéine. En effet, on observe une diminution de 40 % de l'expression protéique de Oatp2 alors que l'expression de son ARNm n'est pas différente de celle des animaux témoins et, à l'inverse, on observe une augmentation de 40 % de l'ARNm de Mrp2 sans augmentation de son expression protéique. Ceci suggère que des modulations post-traductionnelles régissent l'expression de Oatp2 et Mrp2 dans le foie des animaux néphrectomisés.

Ces modifications post-traductionnelles pourraient être de plusieurs ordres. Tout d'abord, la maturation ou le repliement de la protéine pourraient être affectés. Ensuite, la migration vers la membrane apicale (Mrp2) ou basolatérale (Oatp2), l'internalisation et la dégradation de l'Oatp2 et de Mrp2 pourraient être modifiées en IRC.

À ce jour, aucune étude n'a démontré qu'une pathologie affecte le repliement ou la maturation de Mrp2 à l'exception du Syndrome de Dubin-Johnson qui est dû à un mauvais repliement de Mrp2³⁴³. Ce problème de maturation est toutefois dû à une mutation dans le gène de Mrp2³⁴³, ce qui n'est évidemment pas le cas chez les rats IRC.

Une étude publiée en 2002 par Kikuchi *et al.*, a démontré que la radixine est essentielle à la migration de Mrp2 à la membrane apicale des cellules polarisées³⁴⁴. La radixine fait partie de la famille des ezrine-radixine-moesine à qui l'on a attribué des rôles dans la motilité cellulaire, l'adhésion cellulaire et la prolifération en général³⁴⁵⁻³⁴⁷. Ces auteurs ont démontré que, dans le foie de souris knock-out pour la radixine, il y a une forte diminution de Mrp2 à la membrane apicale des villi des cellules canaliculaires, sans toutefois qu'il y ait de diminution du Mrp2 total des hépatocytes. Aussi, une étude récente a démontré qu'une perte de l'interaction protéine-protéine entre la radixine et Mrp2 était impliquée dans l'internalisation rapide de Mrp2 de la membrane canaliculaire hépatique en situation de stress oxydatif causé par l'endotoxine³⁴⁸. Toutefois, l'internalisation de Mrp2 par perte d'interaction avec la radixine ne semble pas entraîner sa dégradation, mais bien seulement sa séquestration intracellulaire, cette voie ne semble donc pas impliquée dans l'absence d'augmentation de l'expression protéique de Mrp2 en présence d'un ARNm augmenté en IRC. Il faudra donc continuer à chercher quels sont les mécanismes post-traductionnels qui régulent l'expression protéique de Mrp2 et évaluer leur rôle en IRC.

Pour ce qui est de Oatp2, on connaît très peu de choses sur sa régulation post-traductionnelle. Tout d'abord, on sait que quatre sites de glycosylation extracellulaires sont conservés parmi les Oatp³⁴⁹. Une étude a démontré à l'aide d'ovocytes de *Xenopus laevis* surexprimant le gène de Oatp1 que la migration à la membrane et l'activité de Oatp1 dépendent de sa N-glycosylation sur les quatre sites conservés³⁴⁹. En effet, lorsque les ovocytes étaient traités avec de la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation, l'activité de Oatp1, mesurée par le transport de taurocholate, était pratiquement nulle. De plus, la mutation des quatre sites de glycosylation entraînait une diminution du poids moléculaire ainsi qu'une perte totale de fonction de la protéine. De plus, très peu des quadruples mutants atteignaient la membrane basolatérale, alors que la majorité restaient enfermés dans des compartiments intracellulaires. Toutefois, la localisation et la fonction des simples mutants semblaient conservées. Seuls les doubles et triples mutants commençaient à

présenter des altérations fonctionnelles. La N-glycosylation sur les quatre sites conservés des Oatp est donc essentielle à la localisation et la fonction de ces transporteurs d'au moins Oatp1³⁴⁹. De la même façon, une étude a démontré que la localisation à la membrane et la fonction de OATP2B1 était sensible à sa glycosylation sur trois sites situés sur la boucle extracellulaire IX-X³⁵⁰. Toutefois, nous n'avons pas observé de changement de poids moléculaire de Oatp2 dans le foie des animaux néphrectomisés. Il ne semble donc pas que sa glycosylation soit modifiée en IRC.

On sait aussi que la phosphorylation des OATP par la protéine kinase C (PKC) entraîne une régulation rapide de leur activité. En effet, la phosphorylation de l'Oatp1 hépatique par la PKC, et non par la PKA, inhibe l'activité de Oatp1 sans changer son expression à la surface cellulaire^{351, 352}. Toutefois, le mécanisme par lequel la phosphorylation de Oatp1 entraîne la perte de son activité reste à identifier³⁵². Aussi, la phosphorylation par la PKC entraîne une régulation rapide de l'activité de OATP2B1. En effet, la phosphorylation de OATP2B1 entraîne son internalisation rapide par un mécanisme dépendant de la clathrine et sa dégradation lysosomale³⁵³. Un tel mécanisme pourrait expliquer la baisse de l'expression protéique et de l'activité de Oatp2 chez les animaux néphrectomisés en présence d'une expression d'ARNm normale.

Le second objectif de cette étude était de déterminer si l'augmentation de l'expression de la P-gp observée chez les animaux urémiques entraîne une augmentation de l'activité de la protéine. Pour ce faire, nous avons mesuré le transport *in vivo* de la rhodamine 123 (Rho123), un substrat spécifique à la P-gp^{354, 355}, chez des rats anesthésiés selon un protocole adapté de Yumoto *et al.*³³² dans lequel la Rho123 est injectée par voie intraveineuse et son élimination biliaire et urinaire est mesurée par canulation directe de la voie biliaire et de la vessie, ce qui permet de récupérer la totalité de ces liquides biologiques. Un échantillon de sérum est prélevé à mi-chemin de chacune des périodes de collecte biliaire et urinaire afin de déterminer la concentration sanguine de Rho123. L'ajout de cyclosporine A, un inhibiteur de la P-gp, à la perfusion i.v. a permis d'évaluer la spécificité de l'essai pour le transporteur

P-gp. Les concentrations de Rho123 ont été mesurées dans chaque échantillon biologique par chromatographie liquide de haute performance et la clairance biliaire (CL_b) ainsi que la clairance urinaire (CL_u) de la rhodamine ont été calculées chez les animaux témoins et chez les animaux souffrant d'IRC à l'aide de la formule $CL_{b\ ou\ u} = (C_{b\ ou\ u}V_{b\ ou\ u})/(C_{p,ss}t)$ où $C_{b\ ou\ u}$ est la concentration biliaire (b) ou urinaire (u) de Rho123, $V_{b\ ou\ u}$ est le volume excrété, $C_{p,ss}$ est la concentration plasmatique de Rho123 à l'état d'équilibre et t est le temps.

Nous avons ainsi observé une augmentation significative d'environ 60 % de la clairance biliaire de la Rho123 chez les animaux néphrectomisés par rapport aux animaux témoins (1,55 mL/min vs 0,95 mL/min). L'ajout de cyclosporine A à la solution de perfusion entraînait une importante diminution du transport biliaire de la Rho123 dans les deux groupes d'animaux. De plus, l'absence de différence significative dans le transport résiduel en présence de l'inhibiteur laisse croire que seul le transport par la P-gp hépatique était affecté par l'IRC. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression protéique de la P-gp dans le foie des animaux souffrant d'IRC est accompagnée d'une hausse de l'activité du transporteur. D'un autre côté, la clairance urinaire de la Rho123 était fortement diminuée (près de 100 %) chez les animaux néphrectomisés (0,06 mL/min contre 1,26 mL/min chez les animaux témoins). Encore une fois, l'ajout de la cyclosporine A à la solution de perfusion entraîne une réduction importante du transport, ramenant la clairance urinaire de la Rho123 dans les deux groupes à des niveaux semblables.

Bien que le devis expérimental de cette étude ne nous permette pas de démontrer une diminution de l'activité de Oatp2 hépatique chez les rats souffrant d'IRC, des études récentes semblent appuyer cette hypothèse. Une première étude a été menée par Sun *et al.* qui ont étudié les impacts de ces toxines sur le transport de l'érythromycine dans des hépatocytes en culture⁹¹. La clairance hépatique de l'érythromycine est diminuée chez les patients en IRC⁴¹. Son élimination se fait surtout par transport actif de la molécule intacte par la voie biliaire, et un peu par détoxification par le CYP³³⁵. Pour son élimination biliaire, l'érythromycine est importée dans les hépatocytes par l'Oatp2 et est rejetée dans la bile par

la P-gp⁹¹. Sun *et al.* ont démontré que le 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid (CMPF), une toxine urémique, peut directement inhiber le transport de l'érythromycine par une diminution de l'activité de Oatp2. De plus, Tsujimoto *et al.* ont évalué les effets du sérum urémique et de toxines urémiques sur l'importation hépatique de la digoxine³⁵⁶. Ils ont ainsi démontré que le sérum urémique inhibait l'import de la digoxine dans des hépatocytes de rats de façon dose-dépendante³⁵⁶. Ils ont aussi démontré que le CMPF, l'acide hippurique, l'acide indole-3-acétique, l'indoxyl sulfate et le p-cresol réduisaient de façon dose-dépendante l'importation de la digoxine dans des hépatocytes en culture. En effet, le CMPF et le p-cresol la réduisaient d'environ 25 % dans des hépatocytes de rats et humains à des concentrations présentes dans le sérum de patients urémiques³⁵⁶. Ils n'ont toutefois pas mesuré l'expression protéique de Oatp2 dans les hépatocytes³⁵⁶.

Le troisième objectif de l'étude consistait à déterminer si les changements d'expression des transporteurs observés *in vivo* sont attribuables à la présence d'un facteur circulant s'accumulant dans le sérum des animaux néphrectomisés. Pour ce faire, des hépatocytes de rats normaux ont été incubés pendant 48 h avec du sérum de rats souffrant d'IRC ou de rats témoins. Les expressions protéique et génique de la P-gp, de MRP2 et de Oatp2 ont ensuite été évaluées dans ces échantillons à l'aide d'immunobuvardage de type Western et de PCR en temps réel. Les résultats obtenus semblent appuyer l'hypothèse d'un facteur sérique puisque l'incubation d'hépatocytes de rats normaux avec le sérum de rats néphrectomisés pendant une période de 48h permet de reproduire les changements d'expression protéiques observés *in vivo*. L'expression de la P-gp est augmentée de 34 %, celle de Oatp2 diminuée de 25 % alors que celle de MRP2 reste stable. Nous n'avons toutefois pas observé de modulation de l'ARNm des différents transporteurs dans les hépatocytes de rats incubés.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude démontrent que l'IRC affecte le transport des médicaments de plusieurs façons. En effet, l'expression du transporteur d'importation Oatp2 est diminuée significativement alors que le transporteur d'extrusion

P-gp voit son expression et son activité augmentées par l'IRC. Ces augmentations de l'expression et de l'activité de la P-gp pourraient être une réponse adaptative à la grande quantité de déchets organiques accumulés dans le sang des rats néphrectomisés. Par contre, comme mentionné précédemment, l'Oatp2 et la P-gp travaillent de concert pour assurer l'élimination des médicaments. De plus, l'entrée des médicaments par Oatp2 peut être l'étape limitante dans le métabolisme de plusieurs médicaments par le CYP450 hépatique ou encore par les transporteurs d'exportation puisqu'il permet l'accès de ses substrats aux mécanismes d'élimination subséquents^{23, 62}. La diminution d'expression d'Oatp2 observée dans le foie des animaux souffrant d'IRC pourrait ainsi expliquer la diminution de l'élimination des médicaments par le foie rapportée chez les patients dialysés.

1.2. LES IMPACTS DE L'IRC SUR LE TRANSPORT DES MEDICAMENTS DANS LE REIN DE RATS

Les impacts de l'IRC sur les transporteurs rénaux de médicaments ont été évalués à l'aide de notre modèle de rats néphrectomisés. Comme dans l'étude précédente, nous avons tout d'abord mesuré l'expression protéique et l'ARNm de transporteurs de médicaments rénaux dans le rein restant des animaux souffrant d'IRC comparativement aux témoins. Nous avons ensuite évalué l'accumulation intrarénale de médicaments radiomarqués chez ces mêmes animaux. De plus, nous avons déterminé *in vitro* l'effet du sérum urémique sur l'expression protéique des transporteurs et sur l'activité de la P-gp dans une lignée cellulaire de cellules tubulaires proximales humaines (Human Kidney-2).

Tout d'abord, dans le rein, nous avons mesuré l'expression protéique et l'ARNm de nombreux transporteurs de médicaments. Nous avons ainsi observé des diminutions de l'expression protéique des transporteurs Npt1, Oat1, Oat2, Oat3, OatK1/K2, Oatp1, Oatp4c1, P-gp et Urat1 ainsi que du Cyp1a. À l'inverse, nous avons observé des augmentations de l'expression protéique des transporteurs Mrp2, Mrp3, Mrp4, Oatp2 et Oatp3. Seule l'expression du Cyp3a n'était pas influencée par l'IRC. Les changements de

l'expression protéique des différents transporteurs semblaient être le résultat de modulations de leur ARNm puisque nous avons pu établir une corrélation entre les niveaux d'ARNm et l'expression protéique des différents transporteurs et du Cyp1a.

Peu d'études ont tenté de mesurer les impacts de l'IRC sur l'expression des différents transporteurs de médicaments rénaux. Nos résultats concordent toutefois en partie avec ceux de Takeuchi *et al.* qui ont démontré une baisse de l'ARNm de OatK1 et OatK2 dans le rein de rats quatre semaines post-néphrectomie 5/6^e, mais aucun changement de l'expression de Mrp2¹¹². En effet, nous avons aussi observé une baisse de l'expression de OatK1/K2 six semaines post-néphrectomie, mais cette diminution était accompagnée d'une augmentation de l'expression de Mrp2. Par contre, le groupe de Laouari *et al.* mentionné précédemment a, comme nous, démontré une augmentation de l'expression protéique et de l'ARNm de Mrp2 dans le rein restant trois et six semaines après la néphrectomie comparativement à des rats témoins⁹⁵. Ce groupe n'a toutefois pas observé d'altération de l'expression de la P-gp trois semaines post-néphrectomie et a même mesuré une augmentation de son ARNm six semaines post-néphrectomie⁹⁵ alors que nous observons des diminutions de sa protéine et de son ARNm d'environ 50 %. Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer ces résultats divergents. Finalement, deux groupes ont mesuré l'expression de Oat1 et Oat3 dans le rein de rats néphrectomisés. Le premier groupe de Ji *et al.* n'a pas noté de modification deux semaines post-néphrectomies bien qu'ils aient observé une diminution de la sécrétion de para-aminohippurate (PAH), un de leurs substrats¹¹⁰. Le second groupe de Deguchi *et al.* ont observé des diminutions d'environ 50 % de l'expression protéique de Oat1 et Oat3 quatre semaines post-néphrectomie qui corrélaient avec la capacité de transport d'acide hippurique des animaux¹¹¹. De notre côté, nous avons mesuré des diminutions d'au moins 50 % de l'expression protéique et de l'ARNm de ces deux transporteurs six semaines après la néphrectomie ce qui est en accord avec les résultats présentés par Deguchi *et al.* Il est possible que deux semaines soient insuffisantes pour développer les effets à long terme de l'IRC et cela pourrait expliquer l'absence de différence d'expression de Oat1 et Oat3 entre les

animaux néphrectomisés et témoins deux semaines après la chirurgie tel que mesuré par Ji *et al.*

Dans le rein, l'influx des anions organiques à la membrane basolatérale est plus efficace que leur efflux dans l'urine pouvant ainsi entraîner une accumulation d'anions à l'intérieur des cellules rénales et, potentiellement, des effets toxiques³⁵⁷. L'accumulation intrarénale des anions dépend donc de l'équilibre entre leur influx tubulaire, leur distribution intracellulaire et leur efflux urinaire³⁵⁷. De plus, comme mentionné précédemment, de nombreuses toxines urémiques s'accumulent dans le sérum de patients souffrant d'IRC. Il s'agit de composés exerçant une action biologique et s'accumulant dans le corps des sujets souffrant d'IRC puisqu'ils ne sont plus éliminés dans l'urine en raison de la défaillance rénale. Plusieurs de ces toxines ont déjà été abordées dans le cadre de cette thèse, les principales étant le CMPF, le PAH et l'IS. Ces toxines sont des anions organiques et des études ont montré qu'elles étaient normalement éliminées dans le rein par un mécanisme de transport incluant les transporteurs Oat1 et Oat3 à la membrane basolatérale ainsi que par les Mrp à la membrane apicale. Elles peuvent aussi agir comme inhibiteurs de l'activité de ces mêmes transporteurs^{23, 324, 358-362}. L'accumulation de ces toxines chez les sujets souffrant d'IRC pourrait donc entraîner une diminution de la clairance rénale des substrats des Oat et des Mrp. D'autres études ont même suggéré que l'IS était impliqué dans la progression de l'IRC puisqu'il a été démontré qu'il peut induire des dommages au tissu rénal^{23, 363-365}.

Dans le cadre de cette étude, nous avons observé des diminutions de l'expression des transporteurs d'influx basolatéraux Oat1, Oat2, Oat3 et Oatp4c1, des transporteurs bilatéraux apicaux OatK1/K, Oatp1 et Urat1 ainsi que du transporteur d'efflux apical Npt1. De plus, nous avons observé des augmentations de l'expression des transporteurs d'efflux apicaux Mrp2 et Mrp4 de même que du transporteur d'efflux basolatéral Mrp3. Ce sont tous des transporteurs d'anions organiques. La diminution de l'expression des transporteurs d'influx et l'augmentation de l'expression des transporteurs favorisant l'efflux des anions organiques observées dans le cadre de cette étude pourraient ainsi être une réponse adaptative et

protectrice contre la toxicité rénale des anions organiques. C'est ce que nous avons tenté de démontrer en mesurant l'accumulation intrarénale de la benzylpénicilline, un médicament anionique substrat des Oat et des Mrp^{152, 333} pouvant aussi être transporté par l'Urat1 et le Npt1^{313, 321}, dans le rein de rats néphrectomisés et témoins. Toutefois, nous avons observé une accumulation 9 fois plus importante de benzylpénicilline dans le rein des animaux malades comparativement aux animaux témoins. Il semble donc que, malgré la diminution de l'expression des transporteurs d'influx rénaux et l'augmentation de l'expression des transporteurs d'efflux rénaux, l'influx des anions organiques demeure plus efficace que leur efflux. Les modifications ne sont donc pas suffisantes pour protéger le rein contre l'accumulation de substrats anioniques et, potentiellement, contre la progression de l'IRC causée par l'accumulation intrarénale de toxines urémiques. Une inhibition compétitive des transporteurs d'efflux par les toxines urémiques accumulées dans les cellules rénales pourrait expliquer ce phénomène.

Bien que l'expression de la plupart des transporteurs d'efflux mesurés dans le cadre de cette étude ait été augmentée chez les rats souffrant d'IRC, l'expression de la P-gp y était significativement réduite. Nous avons déjà démontré que l'élimination rénale de la rhodamine 123 par la P-gp était presque anéantie chez des rats néphrectomisés démontrant une importante diminution de son activité³³⁰ (voir article sur le foie). Nous étions maintenant intéressés à savoir si la diminution de l'expression et de l'activité de la P-gp chez les rats souffrant d'IRC pouvait aussi entraîner une accumulation intrarénale de ses substrats. Nous avons donc évalué l'accumulation intrarénale de la digoxine, un substrat de Oatp4c1 et de la P-gp²³⁹. Nous avons ainsi observé une accumulation 4 fois plus importante de la digoxine dans le rein des rats néphrectomisés comparativement aux animaux témoins. Ceci suggère donc que les diminutions de l'expression et de l'activité de la P-gp chez les sujets souffrant d'IRC pourraient favoriser l'accumulation intrarénale de médicaments transportés par la P-gp et causer de la néphrotoxicité.

Dans le cadre de cette étude, nous avons aussi mesuré l'expression protéique et l'ARNm des Cyp1a et Cyp3a dans le rein de rats témoins et insuffisants rénaux. Les Cyp1a et Cyp3a sont des enzymes de biotransformation de phase I des médicaments ayant une multitude de substrats. Chez l'humain, le CYP3A est impliqué dans la biotransformation de près de 60 % des médicaments métabolisés par les cytochromes P450 comme la cyclosporine et l'érythromycine alors que le CYP1A est surtout impliqué dans la biotransformation de polluants environnementaux comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou la fumée de cigarette et de xénobiotiques comme la caféine et le tamoxifène³⁴. Dans le rein, les Cyp1a et Cyp3a sont exprimés dans les cellules tubulaires où ils peuvent activer ou désactiver leurs substrats avant leur élimination dans l'urine. Nous avons démontré une diminution de l'expression du Cyp1a dans le rein des rats néphrectomisés comparativement aux témoins qui pourrait entraîner la néphrotoxicité de composés actifs normalement désactivés par le Cyp1a s'ils devaient s'accumuler dans le rein en raison de la diminution de l'activité des transporteurs de médicaments rénaux. L'expression du Cyp3a ne semblait toutefois pas influencée par l'IRC. On suppose donc que son activité serait normale et permettrait l'activation ou la désactivation de ses substrats dans les cellules tubulaires. De la néphrotoxicité pourrait toutefois apparaître si des métabolites actifs devaient s'accumuler à l'intérieur des cellules tubulaires rénales. Nous ne pouvons toutefois que supposer des effets de l'IRC sur l'activité des Cyp rénaux puisque nous ne l'avons pas mesurée. Il serait donc intéressant de la mesurer à l'aide de microsomes de rein de rats témoins et néphrectomisés en utilisant, par exemple l'érythromycine et l'éthoxyrésorufine comme substrats des Cyp3a et Cyp1a, respectivement.

Nous avons finalement pu démontrer qu'un ou des facteurs urémiques présents dans le sérum de rats souffrant d'IRC semblaient responsables des modifications de l'expression des différents transporteurs de médicaments et du Cyp1a rénaux. En effet, nous avons observé une corrélation significative entre leur expression protéique et la clairance de créatinine des sujets, un marqueur de la sévérité de l'IRC, suggérant que les modifications d'expressions observées en IRC sont directement liées à la sévérité de l'atteinte rénale. De

plus, nous avons pu reproduire les changements d'expression protéique observés *in vivo* en incubant des cellules HK-2 avec du sérum de rats néphrectomisés pendant 48 h. Nous avons aussi pu démontrer *in vitro* que la diminution de l'expression de la P-gp est accompagnée d'une diminution de son activité telle que mesurée par le transport de la rhodamine 123 à travers une monocouche de cellules HK-2 cultivées sur des transwells. En effet, nous avons observé une augmentation significative de la perméabilité apparente de la rhodamine 123 traversant la monocouche cellulaire du côté apical vers le côté basolatéral, appuyant l'hypothèse d'une diminution de l'activité facilitant la migration de la rhodamine vers le côté basolatéral. De plus, l'ajout de cyclosporine, un inhibiteur de la P-gp, des deux côtés de la monocouche a entraîné une augmentation de la perméabilité apparente de la rhodamine du côté apical vers le côté basolatéral dans les cellules incubées avec du sérum de rats témoins, alors qu'aucun changement significatif n'a été observé dans les cellules incubées avec du sérum de rats urémiques. Ceci indique que ces dernières possédaient déjà un très faible niveau d'activité de la P-gp avant même l'ajout de cyclosporine. Comme mentionné précédemment, un très faible niveau d'activité de la P-gp avait déjà été démontré *in vivo* par la presque totale diminution de l'élimination rénale de la rhodamine 123 chez des rats souffrant d'IRC³³⁰.

En conclusion, cette étude démontre que l'IRC altère significativement l'expression et l'activité de nombreux transporteurs de médicaments rénaux et que ces altérations pourraient causer une diminution de la clairance rénale ou une accumulation intrarénale de certains médicaments et favoriser la néphrotoxicité. Ces modifications ont pu être reproduites dans un modèle *in vitro* par l'incubation de cellules rénales avec du sérum de rats urémiques suggérant qu'un ou des facteurs s'accumulent dans le sérum de sujets souffrant d'IRC en étaient responsables *in vivo*.

1.3. LES IMPACTS DE L'IRC SUR LE TRANSPORT DES MÉDICAMENTS DANS LE CERVEAU DE RATS

Nous avons évalué les impacts de l'IRC sur les transporteurs de médicaments exprimés à la BHE dans notre modèle de rats IRC. Comme précédemment, nous avons en premier lieu mesuré l'expression protéique et l'ARNm de transporteurs de médicaments exprimés dans le cerveau de rats néphrectomisés et témoins. Nous avons ensuite évalué la fonction de la BHE en mesurant *in vivo* l'accumulation intracérébrale de la benzylpénicilline, la digoxine, la doxorubicine et du vérapamil radiomarqués chez les animaux IRC comparativement aux témoins. Finalement, nous avons déterminé *in vitro* l'effet du sérum urémique sur l'expression protéique des transporteurs dans des astrocytes et des cellules endothéliales de cerveau de rat en culture.

Nos résultats montrent des diminutions de 20 à 50 % de l'expression protéique et de l'ARNm de la majorité des différents transporteurs mesurés, c'est-à-dire, Bcrp, Mrp2, Mrp4, Oat3, Oatp2, Oatp3 et P-gp dans le cerveau de rats néphrectomisés comparativement aux rats témoins. Seule l'expression de Mrp5 était inchangée. À notre connaissance, nous sommes le premier groupe à étudier les impacts de l'IRC sur l'expression des transporteurs de médicaments du cerveau.

Nous avons donc démontré que l'expression des transporteurs favorisant l'entrée des médicaments au cerveau était réduite de même que celle des transporteurs favorisant plutôt leur retour vers la circulation sanguine systémique. Il nous semblait important de déterminer si les modifications de l'expression des transporteurs de médicaments mesurées entraînaient un déséquilibre de l'équilibre entre l'influx et l'efflux à la BHE et, ainsi, une accumulation intracérébrale de médicaments. Nous avons donc administré de la benzylpénicilline, de la digoxine, de la doxorubicine et du vérapamil marqués dans la circulation systémique et mesuré leur accumulation intracérébrale.

Malgré des réductions significatives de l'expression des transporteurs de médicaments cérébraux chez les rats néphrectomisés, nous n'avons observé aucune accumulation intracérébrale de trois des différents substrats mesurés, plus précisément la digoxine, la doxorubicine et le vérapamil qui sont tous des substrats de la P-gp. La digoxine est aussi un substrat des Oatp. Ce phénomène a déjà été observé dans des études traitant des effets de l'inflammation sur le transport des médicaments à la BHE. En effet, des études ont démontré que l'inflammation systémique, telle que retrouvée en IRC, diminuait l'expression protéique de la P-gp de façon modérée (-24 %) à la BHE de souris 6 h après l'induction de l'inflammation à l'aide d'endotoxine¹³⁷. Dans cette étude, la diminution de l'expression de la P-gp était toutefois transitoire et les valeurs retournaient à la normale 24h après l'induction de l'inflammation¹³⁷. Les auteurs ont aussi mesuré l'accumulation intracérébrale de la doxorubicine chez ces animaux. Ils ont ainsi observé une augmentation de ses concentrations plasmatiques et intracérébrales 6 h après l'induction de l'inflammation, toutefois, le ratio cerveau/plasma de la doxorubicine était le même chez les souris témoins et les souris inflammées¹³⁷. Les auteurs ont donc conclu que l'inflammation induite par l'endotoxine n'avait aucun effet sur l'intégrité de la BHE et sur le transport de la doxorubicine à travers cette membrane chez les souris¹³⁷. Une autre étude a démontré que l'inflammation du système nerveux central entraînait une diminution de 50 % de l'ARNm de la P-gp et une diminution presque totale de l'ARNm de l'Oatp2 dans le cerveau de rat 6 h après son induction¹³⁵. Ce groupe a utilisé la digoxine comme marqueur *in vivo* de l'activité de la P-gp et ils ont observé une augmentation de ses concentrations plasmatiques et cérébrales 6 et 24h après l'induction de l'inflammation¹³⁵. Toutefois, encore une fois, le ratio cerveau/plasma était le même entre les rats inflammés et témoins¹³⁵. En nous appuyant sur ces résultats, et puisque l'IRC est un état chronique d'inflammation, il est tout à fait probable que, comme Zhao et Goralski, nous observions des diminutions de l'expression protéique et de l'ARNm de la P-gp et des Oatp dans le cerveau de rats néphrectomisés sans toutefois observer d'accumulation intracérébrale de la digoxine, de la doxorubicine ou du vérapamil.

Nous avons toutefois observé une diminution de 30 % de la perméabilité de la benzylpénicilline à travers la BHE des rats néphrectomisés tel que démontré par son ratio cerveau/plasma. Des études *in vitro* ont montré que la benzylpénicilline est un substrat de Mrp2 et Oat3, mais son transporteur du sang vers le cerveau n'a jamais été identifié^{123, 152}. Plusieurs études ont montré que Oat3 est impliqué dans l'extraction des toxines urémiques du cerveau^{123, 274, 276, 277}. En effet, Oat3 est surtout considéré comme un transporteur favorisant l'extraction des médicaments du cerveau. Toutefois, une étude récente suggère qu'il serait aussi impliqué dans le transport du Ro 64-0802, une forme active de l'oseltamivir, vers le cerveau¹²⁷. Il pourrait donc être impliqué dans le transport de substrats tels la benzylpénicilline et les toxines urémiques vers le cerveau en plus de leur extraction. Cette hypothèse est soutenue par une étude publiée à la fin des années 1960 montrant que le probénécid, un inhibiteur connu de l'Oat3, limite l'entrée de la benzylpénicilline dans le cerveau de rats tel que mesuré par le ratio cerveau/plasma de la benzylpénicilline quand elle est coadministrée avec du probénécid³⁶⁶. La diminution de l'accumulation de benzylpénicilline observée dans le cerveau des rats néphrectomisés indique que son efflux du cerveau est plus efficace que son entrée. Toutefois, l'expression de Mrp2, impliquée dans l'efflux de la benzylpénicilline, et de Oat3, impliqué dans l'efflux et potentiellement l'influx de la benzylpénicilline, est diminuée de façon similaire dans le cerveau des rats néphrectomisés. Si Oat3 est bel et bien un transporteur capable de favoriser l'entrée de substrats tels que la benzylpénicilline et les toxines urémiques au cerveau, l'entrée de la benzylpénicilline au cerveau pourrait être réduite en IRC en raison d'une compétition entre celle-ci et les toxines urémiques telles que le CMPF, l'IS et le PAH qui peuvent inhiber Oat3²⁷⁴. Il est toutefois tout aussi probable que les mécanismes d'efflux de la benzylpénicilline à la BHE par Mrp2 et Oat3 soient fonctionnellement plus importants que ses mécanismes d'influx empêchant son accumulation intracérébrale.

D'autres facteurs pourraient affecter la perméabilité de la barrière hématoencéphalique. En effet, une étude a démontré chez des rats que l'insuffisance rénale aiguë pouvait entraîner une augmentation de la perméabilité de la BHE pour l'inuline et le

sucrose³⁶⁷. De plus, des études ont démontré que le LPS appliqué de façon topique chez le rat et le TNF- α administré par voie intraveineuse augmentaient la perméabilité de la BHE pour le FITC-dextran-10K^{368, 369}. Une augmentation de la perméabilité de la BHE pour la sodium-fluorescéine en présence de TNF- α a aussi été démontrée chez la souris³⁷⁰. Ces résultats ont été corroborés dans des modèles BHE *in vitro*. En effet, le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β et le LPS entraînent une diminution de la résistance électrique transendothéliale de cellules endothéliales de cerveau en culture primaire^{371, 372}. Toutefois, une étude a démontré que, bien que l'inflammation systémique puisse augmenter la perméabilité de la BHE pour le colorant Evans Blue chez le rat, il y avait aussi une diminution de la perméabilité de la BHE pour l'aténolol, la morphine et l'oxycodone, des molécules ayant respectivement une faible, moyenne et grande perméabilité cérébrale³⁷³. Les auteurs concluent que, bien que la présence d'inflammation puisse affecter la pénétration de certains composés dans le cerveau, il est peu probable qu'elle mène à une défaillance non sélective de la BHE³⁷³. Il est donc possible que, même en présence d'une augmentation de la perméabilité de la BHE pour l'inuline et le sucrose en IRC³⁶⁷, la BHE continue d'offrir une barrière sélective aux médicaments. Dans le même ordre d'idée, il est bien connu que l'IRC entraîne un état d'hypertension chronique. Des études récentes ont démontré que l'hypertension pouvait entraîner une augmentation de la perméabilité de la BHE pour le colorant Evans Blue^{374, 375}. Il se pourrait donc que l'hypertension observée chez les rats IRC modifie la perméabilité de la BHE. Toutefois, nous ne semblons pas observer de défaillance non sélective de la BHE dans notre modèle tel que mesuré par l'accumulation intracérébrale de la benzylpénicilline, de la digoxine, du vérapamil et de la doxorubicine.

Tous les substrats utilisés dans le cadre de cette étude ont été administrés par voie systémique, soit intramusculaire, intrapéritonéale ou intraveineuse. Il aurait pu être intéressant de mesurer l'indice d'efflux cérébral (*brain efflux index*) des différents substrats. Cette méthode consiste à injecter un substrat directement dans le cerveau d'un animal et à mesurer le pourcentage de la dose donnée toujours présente dans le cerveau à un temps donné après l'injection¹²³. Nous aurions ainsi pu démontrer sans interférence avec l'influx

des substrats au cerveau, les impacts de l'IRC sur l'extraction des substrats du cerveau vers le sang.

Finalement, nous avons incubé deux types de cellules cérébrales, des astrocytes et des cellules endothéliales de cerveau de rat, avec du sérum provenant de rats souffrant d'IRC ou témoins dans le but de déterminer si le sérum d'animaux urémiques pouvait reproduire les changements de l'expression protéique des transporteurs de médicaments cérébraux observés *in vivo*. Nous avons, au préalable, démontré une corrélation significative entre l'expression protéique des transporteurs et la clairance de la créatinine des animaux indiquant un lien direct entre la sévérité de l'atteinte rénale et l'expression protéique des transporteurs à la BHE. Ceci suggère l'implication de facteurs s'accumulant dans le sérum urémique pouvant moduler l'expression des transporteurs de médicaments à la BHE. L'incubation de RBEC et d'astrocytes de rats avec le sérum urémique a pu confirmer cette hypothèse puisque nous avons ainsi observé des modulations de l'expression des transporteurs de médicaments cérébraux semblables à celles observées *in vivo*.

En conclusion, il semble que même si l'IRC entraîne des diminutions significatives de l'expression protéique de différents transporteurs d'efflux et d'influx cérébraux, l'intégrité et la perméabilité de la BHE au passage de médicaments sont conservées tels que démontré par l'absence d'accumulation intracérébrale de digoxine, doxorubicine, vérapamil et benzylpénicilline.

1.4. QUELS FACTEURS URÉMIQUES?

Dans chacune des études réalisées chez le rat, le premier objectif était de mesurer les expressions protéique et génique des transporteurs dans le tissu cible. Nous avons ainsi démontré que l'IRC modifie l'expression des transporteurs de médicaments différemment selon les organes où ils sont exprimés. De plus, nous avons démontré que les modifications

de l'expression protéique des transporteurs de médicaments mesurés dans le foie, le rein et le cerveau étaient influencées par la sévérité de l'IRC chez les animaux testés. En effet, nous avons obtenu des corrélations significatives entre l'expression protéique des transporteurs et la clairance de créatinine, un marqueur de la fonction rénale, des animaux. De plus, les modifications de l'expression des transporteurs semblent se produire en réponse à des facteurs urémiques présents dans le sang des rats souffrant d'IRC tel que démontré par l'incubation d'hépatocytes de rats, de cellules rénales humaines HK-2, ainsi que d'astrocytes et de cellules endothéliales de cerveau de rat (RBEC) avec du sérum provenant de rats néphrectomisés ou témoins. Parmi les facteurs potentiels, on retrouve les toxines urémiques, telles que l'hormone parathyroïdienne (PTH), le PAH, le CMPF, l'IS, et les cytokines pro-inflammatoires qui sont fortement augmentées en IRC.

Les toxines urémiques sont des composés exerçant une activité biologique, s'accumulant chez les sujets souffrant d'IRC, qui sont normalement éliminés dans les urines chez les sujets sains. À ce jour, on en a dénombré pas moins de 115³⁷⁶. Ces toxines sont de poids moléculaires variés, le European Uremic Toxin Work Group en a identifié 68 de moins de 500 Da, 12 excédant 12 000 Da et 10 ayant un poids moléculaire entre 500 et 12 000 Da³⁷⁷. Certaines de ces toxines, par exemple, le 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan-propanoic acid (CMPF), l'indoxyl sulfate (IS) et l'acide hippurique (AH), sont reconnues, non seulement pour inhiber la liaison des médicaments à l'albumine^{378, 379}, mais aussi pour leur capacité à inhiber l'activité de différents transporteurs de médicaments hépatiques, rénaux et à la barrière hématoencéphalique (voir sections précédentes). Les différentes études n'ont toutefois pas mesuré si ces toxines pouvaient moduler l'expression protéique des différents transporteurs.

Une autre toxine urémique peu abordée dans le cadre de ce travail, l'hormone parathyroïdienne (PTH), est fortement augmentée chez les sujets souffrant d'IRC qui développent une hyperparathyroïdie secondaire due à des hautes concentrations sériques de phosphate combinées à de faibles concentrations sériques de 1,25(OH)vitamine D3 et de

calcium³⁸⁰. Nous avons déjà démontré que la PTH pouvait diminuer l'expression protéique du Cyp3a hépatique chez le rat de façon dose-dépendante⁸⁴. De plus, nous avons déjà démontré une corrélation entre les niveaux de PTH mesurés dans le sérum de patients souffrant d'IRC et l'inhibition du Cyp3a dans des hépatocytes de rat exposés à ce sérum⁸¹. Une ablation des glandes parathyroïdes avant l'induction de l'IRC peut même prévenir la diminution du Cyp3a hépatique normalement observée chez les rats néphrectomisés⁸⁴. Finalement, l'expression du Cyp3a est régulée par des voies de signalisation impliquant des récepteurs nucléaires pouvant aussi réguler l'expression des Mrp et de la P-gp tels que le *pregnane-X-receptor* (PXR), le *constitutive-androstane-receptor* (CAR) et le *vitamin-D-receptor* (VDR)³⁸¹⁻³⁸³. Bien que les voies de signalisations impliquées dans la régulation du Cyp3a hépatique par la PTH n'aient pas encore été identifiées, il est possible que la PTH puisse aussi réguler l'expression des transporteurs de médicaments de la même façon que celle du Cyp3a. Toutefois, l'IRC, tout comme une concentration élevée de PTH, a pour effet de diminuer l'expression du Cyp3a hépatique alors que l'expression protéique de la P-gp est augmentée dans le foie IRC et celle de Mrp2 reste inchangée. Les voies de signalisations impliquées devraient donc avoir un effet inverse sur l'expression des Cyp et des transporteurs de médicaments hépatiques. De plus, des études non publiées dans lesquelles nous avons mesuré l'expression protéique des transporteurs de médicaments dans l'intestin et le foie d'animaux ayant subi une parathyroïdectomie avant l'induction de l'IRC démontrent que la parathyroïdectomie ne prévient pas les changements de l'expression des transporteurs de médicaments hépatiques que nous avons observés. Il est donc peu probable que la PTH joue un rôle important dans la régulation de l'expression des transporteurs de médicaments en IRC.

Toutefois, une étude dans une lignée cellulaire de rein d'opossum a démontré que la PTH pouvait réduire le transport du PAH du côté basolatéral vers le côté apical de façon dose- et temps-dépendante par un mécanisme dépendant de l'activation de la PKC³⁸⁴. Le PAH est un anion organique principalement transporté par Oat1 et Oat3. Des études ont plus tard démontré que la PKC entraînait l'internalisation de l'OAT1 et une réduction de

son activité³⁸⁵. De plus, une étude récente a démontré que la PTH pouvait inhiber l'import du losartan dans des hépatocytes de rats³⁸⁶. Finalement, une expérience faite dans notre laboratoire dont les résultats n'ont jamais été publiés démontre que la parathyroïdectomie restaure l'activité de la P-gp intestinale chez les animaux néphrectomisés tel que mesuré par la technique de l'intestin inversé « Everted Gut ». Les mécanismes impliqués n'ont toutefois pas été étudiés. Il semble donc que bien que la PTH ne puisse pas moduler l'expression des transporteurs de médicaments, elle pourrait en inhiber l'activité.

Un autre type de toxines urémiques accumulées chez les sujets souffrant d'IRC sont les cytokines pro-inflammatoires, plus particulièrement les interleukines -1 β , -6 et le *tumor necrosis factor* (TNF)- α , causant un état inflammatoire chronique^{88, 377}. Non seulement les cytokines sont accumulées en raison d'une élimination rénale déficiente, mais l'accumulation de diverses toxines urémiques crée des dommages tissulaires activant les monocytes et les macrophages causant ainsi la relâche de cytokines pro-inflammatoires^{376, 387}. Plusieurs études ont démontré que l'inflammation induite par l'endotoxine (LPS) possède un effet régulateur sur l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments.

Tout d'abord, l'inflammation induite par l'endotoxine entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm *mdr1a* de la P-gp dans, entre autres, le foie, l'intestin, les reins et le cerveau de rats^{135, 388-390}. Une diminution de l'activité de la P-gp hépatique en inflammation a aussi été démontrée par une diminution de l'efflux de la rhodamine 123 par des hépatocytes de rats inflammés comparativement à des hépatocytes de rats témoins³⁹⁰. De plus, des diminutions de l'ARNm des Mrp2, Oatp1 et Oatp2 hépatiques 6 heures après l'induction de l'inflammation ont été observées chez le rat^{135, 391, 392}. L'ARNm hépatique de *mdr1b* est toutefois induit par l'inflammation induite par l'endotoxine chez le rat, mais réduit chez la souris^{135, 393, 394}. Il semble donc qu'il y ait une différence interspèce dans la modulation de la P-gp hépatique par l'inflammation.

D'autres études ont tenté d'identifier les impacts de chaque cytokine sur les transporteurs de médicaments. Il a ainsi été démontré *in vitro* que le TNF- α peut augmenter de façon temps- et dose-dépendante l'ARNm (*mdr1a* et *mdr1b*), l'expression protéique et l'activité de la P-gp dans des hépatocytes de rats incubés³³⁶. Aussi, le TNF- α peut réduire l'ARNm de la P-gp intestinale dans des cellules Caco-2 ainsi que son activité telle que mesurée par le transport vectoriel de la rhodamine 123³³⁷. Finalement, l'incubation de cellules endothéliales de cerveau de porc avec du TNF- α entraîne une augmentation de l'expression protéique de la P-gp après 6 h, suivie d'une diminution de son expression après 24 et 48 h³⁹⁵. Aussi, des études *in vivo* réalisées chez la souris indiquent que l'injection de TNF- α entraîne une induction de l'ARNm hépatique de *mdr1b*, mais pas de *mdr1a*³⁹³, ainsi qu'une réduction de l'expression hépatique de Mrp2 et Oatp2³⁹⁶. De plus, le rôle du TNF- α dans la modulation de l'expression protéique de la P-gp hépatique en réponse à l'inflammation induite par l'endotoxine a été mesuré chez des souris déficientes en TNF- α , mais les auteurs n'ont pas mesuré son ARNm³⁹⁷. Les auteurs n'ont pas observé de modulation de l'expression protéique de la P-gp chez les souris déficientes en TNF- α , alors que les souris sauvages présentaient une diminution de son expression protéique³⁹⁷. Comme la souris et le rat, tel que démontré *in vitro*, ne semblent pas répondre de la même façon au stimulus inflammatoire en ce qui a trait à l'expression de la P-gp hépatique et qu'aucune étude n'a tenté de démontrer les effets de l'injection de TNF- α sur l'expression des transporteurs de médicaments chez le rat, les études *in vivo* réalisées chez la souris ne sont pas nécessairement représentatives des effets engendrés par le TNF- α chez le rat.

D'autres cytokines pro-inflammatoires surexprimées en IRC sont l'IL-6 et l'IL-1 β . Deux études *in vivo* réalisées chez la souris ont démontré que l'injection d'IL-1 β entraîne des diminutions de l'ARNm de *mdr1a*, Mrp2 et Oatp2, sans changement de l'expression de *mdr1b*, alors que l'injection d'IL-6 entraîne des diminutions de l'ARNm de *mdr1b*, Mrp2 et Oatp2, sans modification de *mdr1a*^{393, 396}. L'incubation d'une lignée cellulaire d'hépatocytes de souris (Hepa 1-6) avec les mêmes cytokines a pu reproduire *in vitro* les diminutions de l'expression de Mrp2 observées *in vivo*³⁹⁶. De plus, l'absence de modulation

de Mrp2 hépatique chez des souris déficientes en IL-6 semble confirmer l'importance de cette cytokine dans la modulation de Mrp2 par l'inflammation^{396, 398}. Il a aussi été démontré *in vitro* que l'IL-1 β et l'IL-6 peuvent réduire l'expression de la P-gp et de Bcrp dans des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et que l'IL-6 peut réduire l'expression de la P-gp dans des astrocytes de rat en culture^{395, 399, 400}. Encore une fois, aucune étude n'a tenté de démontrer les effets de l'injection d'IL-1 β ou d'IL-6 sur l'expression des transporteurs de médicaments chez le rat. On ne peut donc que supposer que le rat et la souris répondent de la même façon.

Les études démontrent donc clairement que l'inflammation et les cytokines pro-inflammatoires peuvent moduler l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments. Toutefois, la plupart des études ont été réalisées chez des souris et se concentraient sur quelques transporteurs hépatiques des médicaments (P-gp, Mrp2 et Oatp2). De plus, les effets de l'inflammation et des cytokines sur l'expression et l'activité des Mrp4 et Mrp5 ainsi que des Oat n'ont, à notre connaissance, pas été étudiés à ce jour.

Tout de même, quelques études *in vitro* ont démontré les effets des toxines urémiques sur les cellules du cerveau et dans des hépatocytes de rats nous permettant de spéculer sur l'implication des différentes cytokines dans la modulation des transporteurs de médicaments par l'IRC. En effet, nos résultats démontrent une augmentation de l'expression et de l'activité de la P-gp dans le foie des rats néphrectomisés alors qu'elle est diminuée dans les reins, à la barrière hématoencéphalique et dans l'intestin⁵⁵. Bien que les trois cytokines pro-inflammatoires présentées ici favorisent une réduction de l'expression de la P-gp dans des cellules cérébrales^{395, 399, 400}, seul le TNF- α peut induire l'expression de la P-gp dans des cellules hépatiques³³⁶. Il est donc possible que le TNF- α soit une molécule importante dans la régulation de l'expression de la P-gp en IRC, particulièrement dans le foie. De plus, IL-1 β et IL-6 pourraient aussi être impliquées dans la régulation des transporteurs de médicaments dans le cerveau tel que montré dans les études *in vitro*^{395, 399, 400}. À notre connaissance, aucune étude n'a tenté de déterminer le rôle des cytokines

pro-inflammatoires dans la régulation de l'expression des transporteurs de médicaments rénaux.

La modulation de l'expression et de l'activité des transporteurs est complexe pouvant répondre à toute une variété de stimuli par de multiples voies de signalisation. De plus, l'IRC est une pathologie complexe affectant virtuellement tous les organes en raison de l'accumulation d'au moins 115 toxines urémiques ayant des actions biologiques diverses³⁷⁶. Il est donc très peu probable qu'une seule molécule soit responsable des modulations de l'expression et de l'activité des transporteurs de médicaments observées en IRC.

2. IMPACTS DE L'IRC SUR LA PHARMACOCINÉTIQUE DES MÉDICAMENTS CHEZ L'HUMAIN

Les résultats des études précédentes démontrent clairement que l'IRC affecte le transport des médicaments dans plusieurs organes. En plus des études présentées dans le cadre de cette thèse, nous avons déjà démontré que l'IRC pouvait aussi modifier l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments intestinaux chez des rats néphrectomisés⁵⁵. De plus, tel que démontré en introduction, il a aussi été démontré que l'IRC affecte la biotransformation intestinale et hépatique des médicaments par le cytochrome P450 dans notre modèle de rats néphrectomisés. Une étude chez l'humain portant sur la pharmacocinétique de l'érythromycine chez des sujets souffrant d'IRC terminale semblent le confirmer⁶³, mais des études récentes ont suggéré que la biotransformation de l'érythromycine par les CYP n'était pas modifiée en IRC et que c'était plutôt son influx dans les hépatocytes qui était diminué, compromettant l'accès de l'érythromycine aux CYP hépatiques^{91, 401}.

Le but de la dernière étude, réalisée en collaboration avec un groupe de recherche américain, consistait donc à évaluer, chez l'humain, comment l'insuffisance rénale sévère affecte la clairance non rénale des médicaments en étudiant la biotransformation et le transport intestinal et hépatique des médicaments chez des patients souffrant d'insuffisance

rénale terminale. La pharmacocinétique du midazolam et de la fexofénadine a été évaluée chez les patients dialysés. Nous avons déterminé les effets du sérum provenant des sujets de l'étude sur l'expression protéique des transporteurs de médicaments Oatp et P-gp et du cytochrome P450 3a dans des entérocytes et des hépatocytes de rats en culture.

La fexofénadine est un antihistaminique presque exclusivement éliminé par sécrétion biliaire. En effet, seulement 10 % de la dose administrée est éliminée dans l'urine et moins de 5 % est métabolisé par le foie^{402, 403}. La fexofénadine est un substrat pour les transporteurs Oatp et P-gp⁴⁰⁴ et a une faible biodisponibilité associée à un transport rétrograde par la P-gp intestinale⁴⁰³. Ceci fait d'elle une molécule de choix pour évaluer *in vivo* les effets de l'IRC sur le transport des médicaments chez l'humain. Le midazolam est une benzodiazépine principalement métabolisée en 1'-hydroxymidazolam par les CYP3A4 et CYP3A5 et n'est pas transporté par la P-gp ou les Oatp ce qui en fait un candidat idéal pour l'étude de la fonction du CYP3A hépatique chez l'humain^{182, 405, 406}.

La pharmacocinétique de la fexofénadine et du midazolam a été mesurée chez 10 patients ainsi que 10 personnes en santé appariées pour la taille, le poids et l'âge après une seule administration par voie orale. Tous les sujets devaient éviter la consommation de produits pouvant influencer l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments (jus de fruit, alcool, produits naturels, etc.). Une dose orale de chaque médicament a été administrée chez chacun des patients, puis des prises de sang étaient effectuées à des temps prédéterminés jusqu'à un maximum de 12 h post-administration. Les concentrations plasmatiques ont ensuite été mesurées dans chaque échantillon à l'aide de chromatographie liquide et spectrométrie de masse. Finalement, les paramètres pharmacocinétiques suivants ont été déterminés chez chaque individu : concentration plasmatique maximale (C_{max}), temps nécessaire pour atteindre C_{max} (t_{max}) et concentration plasmatique 12 heures post-dose (C_{12}). Les autres paramètres évalués étaient la constante d'élimination (λ_z), le temps de demi-vie ($t_{1/2}$), la surface sous la courbe de l'intervalle 0-12 heures (SSC_{0-12}) de même que la clairance pour une dose orale (CL_o). À l'exception du t_{max} , tous les paramètres ont été transformés

logarithmiquement pour assurer leur distribution normale, puis groupés pour pouvoir comparer les résultats entre les patients dialysés et le groupe témoin.

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec Thomas D. Nolin un chercheur associé au Maine Medical Center. Les résultats obtenus sont les suivants. Ils ont observé une augmentation de 240 % de la SSC_{0-12} de la fexofénadine chez les patients par rapport aux témoins ($1\ 245,5 \pm 618,8$ h·ng/mL chez les sujets témoins versus $3\ 035,4 \pm 1\ 393,8$ h·ng/mL chez les patients dialysés, $p=0,003$). De plus, la CL_o de la fexofénadine semblait significativement diminuée de $102,8 \pm 37,9$ L/h, chez les témoins à $37,9 \pm 19,5$ L/h ($p<0,001$) chez les patients. Finalement, la demie-vie de la fexofénadine était augmentée à $4,6 \pm 1,3$ h dans ce groupe par rapport aux témoins ($3,4 \pm 0,9$ h), ce qui correspond à une hausse d'environ 35 % ($p = 0,019$). À l'inverse, la pharmacocinétique du midazolam et du 1'-hydroxymidazolam n'était pas modifiée chez les sujets dialysés comparativement aux sujets témoins selon les paramètres tenant compte de la concentration plasmatique totale du midazolam et non de sa fraction libre. Ceci suggère que la fonction du CYP3A hépatique et intestinal n'est pas affectée chez des sujets souffrant d'IRC terminale sous-dialyse.

Pourtant il a été démontré chez le rat que l'IRC entraînait des diminutions de plusieurs Cyp hépatiques et intestinaux et, particulièrement, du Cyp3a^{50, 75}. Un niveau d'urémie plus élevé et constant chez les animaux néphrectomisés pouvant atteindre des concentrations plasmatiques d'urée allant jusqu'à <100 et même <500 mg/dL^{80, 81} comparativement aux sujets dialysés de l'étude qui présentent une concentration plasmatique moyenne d'urée de 47.8 ± 8.7 mg/dL pourrait expliquer cette différence. La dialyse permet aussi d'épurer le sang de plusieurs toxines urémiques capables de moduler le CYP3A s'accumulant en IRC, les patients dialysés pourraient ainsi avoir une meilleure expression et activité du CYP3A que les rats néphrectomisés non dialysés.

Deux études récentes menées par le même groupe que celle-ci tendent à confirmer cette hypothèse. En effet, Nolin *et al.* ont repris l'expérience de Dowling *et al.*⁶³ mesurant

la clairance non rénale de l'érythromycine par test d'exhalation chez des sujets souffrant d'IRC, mais ils l'ont mesurée avant puis après une séance d'hémodialyse⁴⁰⁷. Ils ont démontré une augmentation de 27 % de l'activité du CYP3A4 chez les patients après la séance de dialyse, tel que mesuré par l'exhalation de $^{14}\text{CO}_2$, suggérant une augmentation de la clairance non rénale de l'érythromycine après la dialyse⁴⁰⁷. Toutefois, l'étude ne comprenait pas de groupe témoin. On ne peut donc pas comparer l'exhalation du $^{14}\text{CO}_2$ chez les sujets après la dialyse à celle de sujets sains⁴⁰⁷. Le test d'exhalation de l'érythromycine est basé sur le principe que la N-déméthylation par le CYP3A de l'érythromycine marquée au ^{14}C libère le carbone marqué qui est ensuite exhalé sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ ⁴⁰⁸. Il a longtemps été considéré qu'une diminution de la quantité de CO_2 radiomarqué exhalé signifiait une diminution de l'activité du CYP3A hépatique. Toutefois, comme mentionné précédemment, des études démontrent que, en plus d'être biotransformée par le CYP3A, l'érythromycine est sujette au transport par l'OATP et la P-gp^{409, 410} et qu'une diminution de l'influx de l'érythromycine dans les cellules par l'OATP pourrait aussi se traduire par une diminution de l'exhalation de $^{14}\text{CO}_2$ ⁴⁰⁹.

La diminution de la biotransformation de l'érythromycine chez les sujets souffrant d'IRC terminale avant la dialyse est-elle donc due à une diminution de l'activité du CYP3A4 ou à une diminution de l'influx hépatique de l'érythromycine par l'OATP? Lequel de ces paramètres est restauré par la dialyse augmentant la biotransformation de l'érythromycine? Une étude a démontré que l'incubation de microsomes de foie de rats normaux avec du sérum provenant de rats souffrant d'insuffisance rénale pouvait diminuer de 50 % le métabolisme du losartan par le Cyp3a microsomial⁹⁰. De la même façon, une étude a démontré que des microsomes de foie humain normaux présentent une diminution de 80 % de la biotransformation du midazolam lorsqu'ils sont en présence de plasma provenant de patients souffrant d'IRC⁴¹¹. Ceci démontre que, indépendamment de l'expression protéique du Cyp3a, le sérum ou le plasma de sujets urémiques peut diminuer son activité. De plus, une autre étude *in vitro* a démontré que le sérum prélevé sur des patients après la séance de dialyse n'avait plus d'effet modulateur sur l'expression des

Cyp1a, Cyp2c et Cyp3a exprimés dans des hépatocytes de rats normaux incubés avec ce sérum et améliorait significativement l'activité du Cyp3a hépatique tel que mesuré dans des microsomes d'hépatocytes de rats⁷⁷. Il est donc possible que les bienfaits de la dialyse sur l'expression et l'activité du CYP3A4 aient permis d'augmenter de 27 % la biotransformation de l'érythromycine dans l'étude de Nolin *et al.* publiée en 2006⁴⁰⁷. Il est aussi possible que la dialyse ait augmenté l'expression et l'activité du CYP3A4 chez les sujets dialysés de cette étude pour les ramener à des valeurs équivalentes à celles observées chez les sujets sains, entraînant une biotransformation équivalente du midazolam chez les sujets sains et les sujets dialysés de cette étude. Toutefois, nous ne pouvons exclure qu'une diminution, puis une restauration de l'activité de l'OATP soient en cause dans les études sur l'érythromycine.

La fexofénadine est un substrat des OATP1B1 et OATP1B3 hépatiques ainsi que de l'OATP1A2 intestinal et de la P-gp⁴¹². On observe une augmentation de sa SSC₀₋₁₂ chez les patients dialysés, ce qui démontre qu'il semble bien y avoir un effet de l'IRC sur le transport de la fexofénadine. Il est toutefois difficile de distinguer si cet effet se situe dans l'intestin, le foie ou les deux. En effet, une augmentation de la SSC₀₋₁₂ est généralement attribuable à une augmentation de la biodisponibilité d'un substrat, une diminution de sa clairance, ou aux deux phénomènes combinés. La biodisponibilité de la fexofénadine pourrait, dans ce cas-ci, être due à un efflux réduit par la P-gp intestinale ou à une augmentation de son influx intestinal par l'OATP1A2. Une diminution de la clairance hépatique de la fexofénadine pourrait être causée par une diminution de son influx hépatique par OATP1B1 et OATP1B3 ou par une réduction de son efflux biliaire par la P-gp.

La fexofénadine n'ayant jamais été administrée par voie intraveineuse, on ne connaît pas sa biodisponibilité exacte⁴¹³, de même qu'il est impossible de la déterminer à l'aide des données recueillies dans cette étude. Toutefois, il a été démontré que la P-gp intestinale joue un rôle essentiel dans l'absorption de la fexofénadine⁴¹⁴. De plus, nous

avons précédemment démontré que l'IRC entraînait une diminution de l'expression et de l'activité de la P-gp intestinale chez le rat⁵⁵. Aussi, nous avons démontré que le plasma des patients de l'étude pouvait diminuer l'expression de la P-gp dans des entérocytes de rats comparativement au plasma des sujets témoins. Une telle diminution dans l'intestin humain pourrait faire diminuer le transport rétrograde de la fexofénadine chez les patients et en augmenter le pourcentage de la dose absorbée, par le fait même, la SSC_{0-12} serait augmentée proportionnellement. Aucune modification de l'expression de l'Oatp3 intestinal n'a été observée chez le rat⁵⁵ et dans les entérocytes de rats incubés avec le plasma des sujets à l'étude, suggérant un influx normal de la fexofénadine.

De plus, une diminution importante de la clairance de la fexofénadine a été observée. Il s'agit toutefois de CL_o mesurée selon l'équation $CL_o = (\text{dose} / SSC_{0-\infty})$. Le calcul de clairance dépend donc de la dose administrée par voie orale et non de la quantité réelle de médicament à avoir atteint la circulation systémique. Ainsi, les modifications de la biodisponibilité du médicament qui pourraient survenir chez les patients souffrant d'IRC ne sont pas prises en compte dans cette équation. On ne peut donc déterminer avec certitude l'ampleur de la diminution de la CL_o de la fexofénadine secondaire à une diminution de transport vers la bile, puisqu'on ne peut affirmer que l'augmentation de la SSC_{0-12} n'est pas en partie due à une augmentation de la biodisponibilité du médicament suite à la diminution de P-gp intestinale. L'augmentation de la demi-vie permet toutefois de supposer que la clairance biliaire est bien diminuée par l'IRC. En effet, la demi-vie dépend de la constante d'élimination qui n'est pas modifiée par la biodisponibilité d'un composé. Le volume de distribution (V_d) du médicament peut aussi influencer la demi-vie. Toutefois, la fexofénadine est un composé basique, moyennement lié à l' α_1 -glycoprotéine, avec un très grand V_d , il est donc peu probable que l'IRC affecte son V_d . L'augmentation de la demi-vie est donc probablement due à une diminution de la CL_o de la fexofénadine.

Comme mentionné précédemment, la fexofénadine est principalement éliminée par sécrétion biliaire. Elle est un substrat des OATP1B1 et OATP1B3 et de la Pgp hépatiques.

Toutefois, il a été démontré que la P-gp hépatique jouait un rôle très limité dans son excrétion biliaire⁴¹⁴. De plus, l'expression et l'activité de la Pgp hépatique sont induites chez les rats souffrant d'IRC³³⁰ et son expression protéique est induite dans des hépatocytes de rats incubés avec le plasma des sujets à l'étude. Le transport par la P-gp ne semble donc pas responsable de la diminution de la clairance de la fexofénadine chez les sujets dialysés. Chez les rats néphrectomisés, de même que dans les hépatocytes incubés avec le plasma des sujets à l'étude, on observe une diminution de l'expression de l'Oatp2 hépatique. Il est donc probable qu'une diminution de l'influx de la fexofénadine par les OATP hépatiques entraîne la diminution de la clairance de la fexofénadine observée *in vivo* ainsi que l'augmentation de sa demi-vie et de sa SSC₀₋₁₂ chez les sujets dialysés.

Une étude récente visait à évaluer la pharmacocinétique de l'érythromycine après une dose unique donnée par voie orale ou par voie intraveineuse chez des patients souffrant d'IRC terminale⁴¹⁵. Les chercheurs ont observé des augmentations de 158 % et 68 % de la SSC de l'érythromycine chez les patients comparativement aux témoins après l'administration par voie orale et intraveineuse, respectivement. Bien qu'on puisse croire que l'augmentation de la SSC de l'érythromycine après l'administration par voie orale soit attribuable à une diminution de l'activité de la P-gp intestinale, les chercheurs l'ont entièrement attribuée à une diminution de la clairance hépatique puisqu'ils n'ont pas observé de différence dans la biodisponibilité intestinale de l'érythromycine entre les deux groupes. Les chercheurs ont aussi démontré que le métabolisme par le CYP450 représente moins de 15 % de la clairance de l'érythromycine. Ils en concluent donc qu'une diminution de son import dans les hépatocytes par OATP est probablement aussi impliquée dans l'augmentation de la SSC de l'érythromycine chez les sujets souffrant d'IRC terminale⁴¹⁵.

Il existe plusieurs limitations à cette étude. Tout d'abord, des polymorphismes des gènes codant pour la P-gp⁴¹⁶ et les OATP⁴¹⁷ ont été associés à des altérations de l'activité de ces transporteurs pouvant mener à une augmentation de la concentration plasmatique de la fexofénadine. Puisque les sujets de l'étude n'ont pas été génotypés, il est possible qu'une

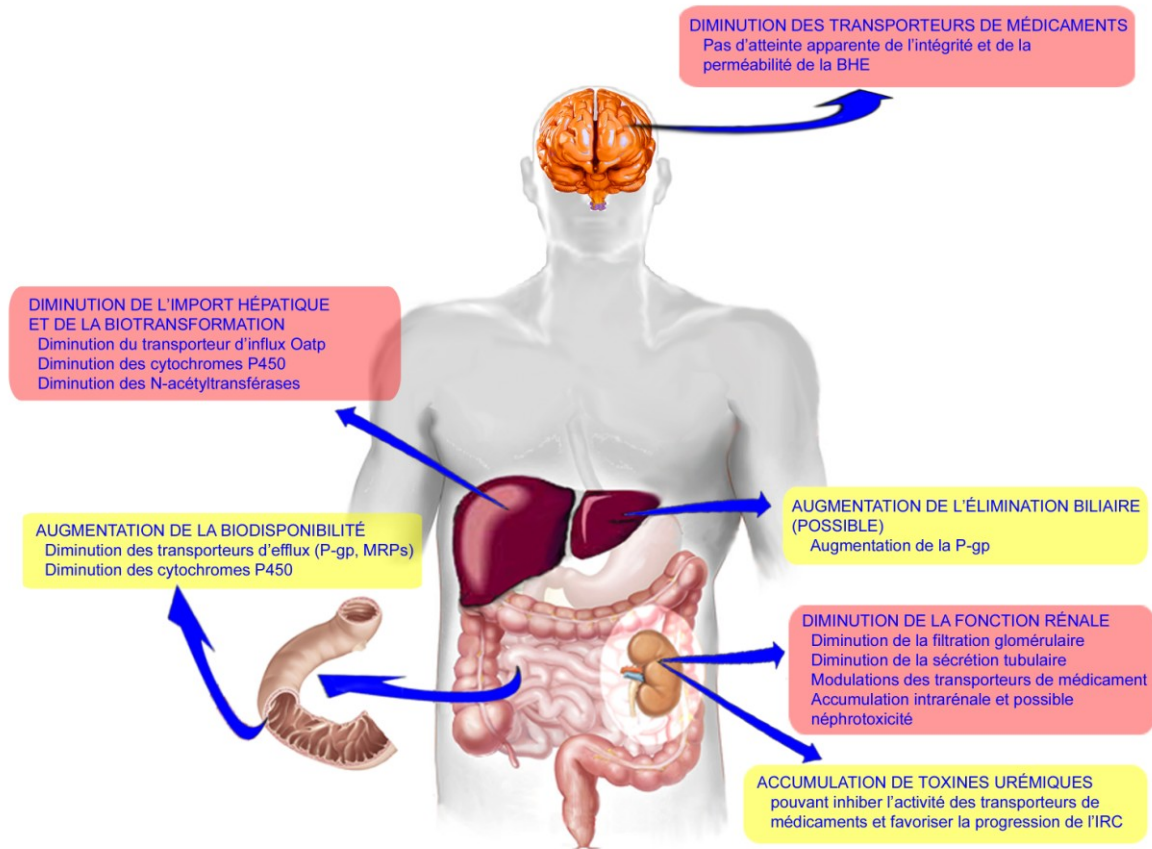
expression polymorphique de la P-gp ou des OATP chez certains sujets contribue à la diminution de la clairance de la fexofénadine observée dans cette étude. Toutefois, devant l'ampleur de la différence observée et l'absence de sujets présentant des données extrêmes à l'intérieur des groupes, il est peu probable que des différences génotypiques soient responsables des résultats obtenus. De plus, même s'il existe des polymorphismes des CYP3A4 et CYP3A5 les variants ne semblent pas entraîner de modifications phénotypiques de l'activité des enzymes pour la biotransformation du midazolam⁴¹⁸⁻⁴²⁰. Dans cette étude, les patients prenant des substances connues pour être des modulateurs de l'expression et de l'activité des enzymes de biotransformation ou des transporteurs de médicaments étaient exclus. Il n'en demeure pas moins que les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale sont polymédicamentés et nous ne pouvons exclure qu'une interaction médicamenteuse imprévue ait pu modifier la pharmacocinétique de la fexofénadine. Nous ne pouvons non plus exclure que la présence des médicaments dans le sérum des patients ait affecté l'expression des transporteurs de médicaments dans les cellules en culture.

En conclusion, cette étude rapporte les répercussions de l'IRC sur les paramètres pharmacocinétiques d'une molécule biotransformée par le CYP3A et de deux molécules sujettes au transport par les OATP et la P-gp chez des patients traités par hémodialyse. Elle démontre que l'activité du CYP3A ne semble pas différente de celle de témoins en santé, mais que le transport des médicaments par la P-gp intestinale et les OATP hépatiques pourrait être altéré. En dressant le phénotype des sujets souffrant d'IRC traités en dialyse, cette étude permet de mieux comprendre les mécanismes affectant le métabolisme et le transport non rénal des médicaments chez ces patients. Les données recueillies dans cette étude permettront ultimement d'aider les praticiens à identifier les options de traitement et de dosage entraînant un effet maximum avec un minimum de toxicité.

Conclusion

Il est bien démontré que les patients souffrant d'IRC présentent une forte incidence d'effets indésirables qui entraînent des coûts de traitement très élevés. Il a déjà été démontré que des diminutions de l'élimination rénale, associée au taux de filtration glomérulaire, et de l'élimination métabolique des médicaments peuvent être responsables de l'augmentation des concentrations sanguines observées chez les sujets souffrant d'IRC. De plus, des altérations dans l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments intestinaux pouvant entraîner une augmentation de la biodisponibilité des médicaments ont été démontrées chez le rat. Dans le cadre de cette thèse, nous avons démontré, dans un modèle de rat, des altérations de l'expression et de l'activité des transporteurs de médicaments hépatiques, rénaux et cérébraux qui pourraient affecter l'élimination hépatique et rénale ainsi que la distribution des médicaments au cerveau. La figure 31 résume les impacts de l'insuffisance rénale chronique sur la pharmacocinétique des médicaments tels que nous les comprenons à ce jour.

Figure 31 Les impacts de l'insuffisance rénale chronique sur la pharmacocinétique des médicaments



Dans le foie de rats néphrectomisés, nous avons observé une diminution de l'expression de *Oatp2* accompagnée d'une augmentation de l'expression et de l'activité de la *P-gp* telle que mesurée par la clairance biliaire de la rhodamine 123. Toutefois, l'influx des médicaments vers l'intérieur de l'hépatocyte est une étape limitante dans leur élimination hépatique puisqu'elle permet l'exposition des xénobiotiques aux cytochromes P450 et enzymes de conjugaison hépatiques, de même qu'aux transporteurs apicaux favorisant l'élimination biliaire des médicaments. Une diminution de l'expression de l'*Oatp2* hépatique, telle qu'observée ici, et, surtout, une diminution de son activité par compétition avec les toxines urémiques, tel que suggéré par Sun *et al.*^{91, 415}, en IRC peut

ainsi réduire la clairance métabolique hépatique et la clairance biliaire des médicaments ayant pour conséquence une augmentation des concentrations plasmatiques et, potentiellement, la toxicité.

Nous avons également évalué les impacts de l'IRC sur les transporteurs de médicaments rénaux. Nous avons tout d'abord démontré une diminution de la clairance urinaire de la rhodamine 123, suggérant une altération de l'activité de la P-glycoprotéine rénale. De plus, nous avons démontré que malgré une diminution de l'expression de nombreux transporteurs d'influx rénaux (Oat1, Oat2, Oat3, OatK1/K2, Oatp1, Oatp4c1) et l'augmentation de l'expression d'au moins deux transporteurs d'efflux (Mrp2, Mrp4), les composés s'accumulent à l'intérieur des cellules épithéliales rénales entraînant ainsi une diminution de la clairance rénale et pouvant favoriser l'apparition de néphrotoxicité. De plus, il a été montré que des toxines urémiques, particulièrement l'indoxyl sulfate, s'accumulant chez les sujets souffrant d'IRC pouvaient favoriser la progression de l'IRC lorsqu'elles s'accumulent dans les cellules rénales. Les altérations du transport rénal des médicaments en IRC pourraient donc former un cercle vicieux favorisant la progression de l'IRC, puisque, de plus, nous avons montré une corrélation entre la sévérité de l'IRC et l'importance des altérations de l'expression des transporteurs de médicaments.

Finalement, nous avons démontré que malgré une diminution de l'expression protéique des transporteurs de médicaments exprimés à la barrière hématoencéphalique, son intégrité et sa perméabilité ne sont pas affectées puisque nous n'observons pas d'accumulation intracérébrale de médicaments chez les animaux néphrectomisés.

Les mécanismes exacts entraînant les modulations de l'expression et de l'activité des transporteurs de médicaments en IRC demeurent inconnus. Nos résultats suggèrent toutefois qu'un ou des facteurs présents dans le sérum des rats IRC en soient responsables. En effet, l'incubation d'hépatocytes, de cellules rénales, d'astrocytes ou de cellules endothéliales de cerveau de rat avec du sérum de rat urémique entraîne des altérations de

l'expression des transporteurs similaires à celles observées *in vivo*. De plus, l'incubation d'une monocouche de cellules HK-2 avec ce sérum entraîne une diminution du transport de la rhodamine 123, un substrat spécifique de la P-gp.

La dernière étude visait à établir si les modulations de l'expression et de l'activité des cytochromes P450 et des transporteurs de médicaments intestinaux et hépatiques observées chez le rat étaient aussi observées chez des sujets humains souffrant d'IRC. Les résultats de l'étude pharmacocinétique du midazolam et de la fexofénadine suggèrent que le transport intestinal par la P-gp et hépatique par les OATP puissent être affectés en IRC augmentant les concentrations plasmatiques et diminuant la clairance de la fexofénadine, alors que l'activité du cytochrome P450 3A ne semble pas différente entre des sujets témoins et des sujets souffrant d'IRC dialysés.

Il reste maintenant à déterminer quels facteurs urémiques sont responsables des modulations de l'expression et de l'activité des transporteurs de médicaments chez les sujets souffrant d'IRC. Les études déjà publiées sur l'impact de différentes toxines urémiques telles que la PTH, le CMPF, l'IS et le AH sur l'activité des transporteurs de médicaments dans plusieurs organes en font des molécules de choix comme responsables de ces modulations. De plus, les cytokines pro-inflammatoires fortement exprimées en IRC sont aussi reconnues pour leur capacité à réguler l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments dans différents tissus. Toutefois, il existe de nombreuses toxines urémiques (à ce jour, 115 ont été identifiées) possédant toutes une activité biologique. Il sera un travail ardu de déterminer lesquelles, seules ou en combinaison, sont capables de moduler l'expression et l'activité des transporteurs de médicaments.

Ces travaux sont importants puisqu'ils mettent à jour une nouvelle problématique chez les sujets souffrant d'IRC. Nous devons maintenant identifier les facteurs et les mécanismes impliqués afin d'ultimement développer des stratégies pour prévenir l'apparition de toxicité et la progression de la maladie chez les patients et entre temps, aider

les praticiens à identifier les options de traitement et de dosage entraînant un effet maximum avec un minimum de toxicité.

Bibliographie

1. A. S. Levey. Clinical practice. Nondiabetic kidney disease. *N Engl J Med* 2002;347(19):1505-11.
2. A. S. Levey, A. C. Schoolwerth, N. R. Burrows, *et al.* Comprehensive public health strategies for preventing the development, progression, and complications of CKD: report of an expert panel convened by the Centers for Disease Control and Prevention. *Am J Kidney Dis* 2009;53(3):522-35.
3. Rapport annuel du Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes; Traitement du stade terminal de l'insuffisance organique au Canada, de 2000 à 2009, Ottawa (Ontario), 1,
4. J. Coresh, E. Selvin, L. A. Stevens, *et al.* Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007;298(17):2038-47.
5. D. E. Weiner. Public health consequences of chronic kidney disease. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(5):566-9.
6. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
7. S. Campoy and R. Elwell. Pharmacology & CKD: how chronic kidney disease and its complications alter drug response. *Am J Nurs* 2005;105(9):60-71; quiz 72.
8. T. D. Nolin, J. Naud, F. A. Leblond and V. Pichette. Emerging evidence of the impact of kidney disease on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83(6):898-903.

9. D. W. Bates, E. B. Miller, D. J. Cullen, *et al.* Patient risk factors for adverse drug events in hospitalized patients. ADE Prevention Study Group. *Arch Intern Med* 1999;159(21):2553-60.
10. G. E. Matzke and R. F. Frey, Drug dosing in patients with impaired renal function, New York, 750-763
11. G. R. Matzke and R. F. Frye. Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* 1997;16(3):205-31.
12. R. Zaidenstein, S. Eyal, S. Efrati, *et al.* Adverse drug events in hospitalized patients treated with cardiovascular drugs and anticoagulants. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2002;11(3):235-8.
13. T. G. Cantu, E. F. Ellerbeck, S. W. Yun, S. D. Castine and D. M. Kornhauser. Drug prescribing for patients with changing renal function. *Am J Hosp Pharm* 1992;49(12):2944-8.
14. V. Pichette and F. A. Leblond. Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* 2003;4(2):91-103.
15. A. W. Dreisbach. The influence of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(5):553-6.
16. A. W. Dreisbach and J. J. Lertora. The effect of chronic renal failure on hepatic drug metabolism and drug disposition. *Semin Dial* 2003;16(1):45-50.
17. A. W. Dreisbach and J. J. Lertora. The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(8):1065-74.
18. A. C. Elston, M. K. Bayliss and G. R. Park. Effect of renal failure on drug metabolism by the liver. *Br J Anaesth* 1993;71(2):282-90.

19. J. D. Momper, R. Venkataramanan and T. D. Nolin. Nonrenal drug clearance in CKD: Searching for the path less traveled. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010;17(5):384-91.
20. T. D. Nolin. Altered nonrenal drug clearance in ESRD. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17(6):555-9.
21. T. D. Nolin, R. F. Frye and G. R. Matzke. Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42(5):906-25.
22. V. Pichette and F. Leblond. Metabolism of drugs in chronic renal failure. *Recent Res Devel Drug Metabol Disposition* 2002;1:43-56.
23. H. Sun, L. Frassetto and L. Z. Benet. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol Ther* 2006;109(1-2):1-11.
24. J. Naud, T. D. Nolin, F. A. Leblond and V. Pichette. Current understanding of drug disposition in kidney disease. *J Clin Pharmacol* 2012;52(1 Suppl):10S-22S.
25. L. Barthe, J. Woodley and G. Houin. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clin Pharmacol* 1999;13(2):154-68.
26. L. Z. Benet and C. L. Cummins. The drug efflux-metabolism alliance: biochemical aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50(Suppl 1):S3-S11.
27. S. D. Hall, K. E. Thummel, P. B. Watkins, *et al.* Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos* 1999;27(2):161-6.
28. D. R. Krishna and U. Klotz. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 1994;26(2):144-60.
29. V. J. Wachter, L. Salphati and L. Z. Benet. Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46(1-3):89-102.

30. T. D. Nolin, R. F. Frye, P. Le, *et al.* ESRD impairs nonrenal clearance of fexofenadine but not midazolam. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(10):2269-76.
31. L. S. Kaminsky and M. J. Fasco. Small intestinal cytochromes P450. *Crit Rev Toxicol* 1991;21(6):407-22.
32. F. P. Guengerich, Human cytochrome P450 enzymes, New York, 473-536
33. A. Galetin, M. Gertz and J. B. Houston. Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010;25(1):28-47.
34. F. P. Guengerich. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* 2003;3(4):194-204.
35. R. J. Fontana, K. S. Lown, M. F. Paine, *et al.* Effects of a chargrilled meat diet on expression of CYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. *Gastroenterology* 1999;117(1):89-98.
36. W. M. McDonnell, J. M. Scheiman and P. G. Traber. Induction of cytochrome P450IA genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. *Gastroenterology* 1992;103(5):1509-16.
37. L. Balant, A. Gorgia, A. Marmy and J. M. Tschopp. [Clearance concept applied to pharmacokinetics: 2. Experience with tolamolol (beta-blocking agent) in renal insufficiency (author's transl)]. *Nephrologie* 1980;1(4):177-82.
38. J. N. Barnes, A. J. Williams, M. J. Tomson, P. A. Toseland and F. J. Goodwin. Dihydrocodeine in renal failure: further evidence for an important role of the kidney in the handling of opioid drugs. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;290(6470):740-2.

39. G. Bianchetti, G. Graziani, D. Brancaccio, *et al.* Pharmacokinetics and effects of propranolol in terminal uraemic patients and in patients undergoing regular dialysis treatment. *Clin Pharmacokinet* 1976;1(5):373-84.
40. T. P. Gibson, K. M. Giacomini and W. A. Briggs. Propoxyphene and norpropoxyphene plasma concentrations in the anephric patients. *Clin Pharmacol Ther* 1980;27:665-770.
41. A. Kanfer, G. Stamatakis, J. C. Torlotin, *et al.* Changes in erythromycin pharmacokinetics induced by renal failure. *Clin Nephrol* 1987;27(3):147-50.
42. H. Okabe, Y. Hashimoto and K. I. Inui. Pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J Pharm Pharmacol* 2000;52(12):1467-72.
43. R. L. Talbert. Drug dosing in renal insufficiency. *J Clin Pharmacol* 1994;34(2):99-110.
44. L. Z. Benet, T. Izumi, Y. Zhang, J. A. Silverman and V. J. Wachter. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 1999;62(1-2):25-31.
45. P. Du Souich, H. Maurice and L. Heroux. Contribution of the small intestine to the first-pass uptake and systemic clearance of propranolol in rabbits. *Drug Metab Dispos* 1995;23(2):279-84.
46. Y. W. Lam, S. Banerji, C. Hatfield and R. L. Talbert. Principles of drug administration in renal insufficiency. *Clin Pharmacokinet* 1997;32(1):30-57.
47. S. Gabardi and S. Abramson. Drug dosing in chronic kidney disease. *Med Clin North Am* 2005;89(3):649-87.

48. R. Gugler and H. Allgayer. Effects of antacids on the clinical pharmacokinetics of drugs. An update. *Clin Pharmacokinet* 1990;18(3):210-9.
49. W. L. St Peter, K. A. Redic-Kill and C. E. Halstenson. Clinical pharmacokinetics of antibiotics in patients with impaired renal function. *Clin Pharmacokinet* 1992;22(3):169-210.
50. F. A. Leblond, M. Petrucci, P. Dube, *et al.* Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(6):1579-85.
51. H. Okabe, I. Yano, Y. Hashimoto, H. Saito and K. Inui. Evaluation of increased bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J Pharm Pharmacol* 2002;54(1):65-70.
52. Z. H. Huang, T. Murakami, A. Okochi, *et al.* Expression and function of P-glycoprotein in rats with glycerol-induced acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 2000;406(3):453-60.
53. T. Murakami, R. Yumoto, J. Nagai and M. Takano. Factors affecting the expression and function of P-glycoprotein in rats: drug treatments and diseased states. *Pharmazie* 2002;57(2):102-7.
54. C. Veau, C. Leroy, H. Banide, *et al.* Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(8):1607-14.
55. J. Naud, J. Michaud, C. Boisvert, *et al.* Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(3):978-85.
56. R. Vanholder, R. De Smet and S. Ringoir. Factors influencing drug protein binding in patients with end stage renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1993;44(Suppl 1):S17-21.

57. S. K. Swan and W. M. Bennett. Drug dosing guidelines in patients with renal failure. *West J Med* 1992;156(6):633-8.
58. S. Erill, P. du Souich and H. Courteau. Carbamylation of proteins and sulfacetamide free fraction in serum in experimentally-induced high blood urea states. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1985;50(1):45-56.
59. R. Vanholder, N. Van Landschoot, R. De Smet, A. Schoots and S. Ringoir. Drug protein binding in chronic renal failure: evaluation of nine drugs. *Kidney Int* 1988;33(5):996-1004.
60. S. V. Vormfelde, W. Muck, S. M. Freudenthaler, *et al.* Pharmacokinetics of cerivastatin in renal impairment are predicted by low serum albumin concentration rather than by low creatinine clearance. *J Clin Pharmacol* 1999;39(2):147-54.
61. Y. Shitara, T. Itoh, H. Sato, A. P. Li and Y. Sugiyama. Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(2):610-6.
62. M. Yamazaki, S. Akiyama, R. Nishigaki and Y. Sugiyama. Uptake is the rate-limiting step in the overall hepatic elimination of pravastatin at steady-state in rats. *Pharm Res* 1996;13(10):1559-64.
63. T. C. Dowling, A. E. Briglia, J. C. Fink, *et al.* Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73(5):427-34.
64. P. B. Watkins, S. A. Murray, L. G. Winkelman, *et al.* Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J Clin Invest* 1989;83(2):688-97.

65. P. Nicolas, M. Tod, C. Padoin and O. Petitjean. Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clin Pharmacokinet* 1998;35(5):347-59.
66. P. Debord, K. Louchahi, M. Tod, *et al.* Influence of renal function on the pharmacokinetics of diacerein after a single oral dose. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994;19(1):13-9.
67. R. Osborne, S. Joel, K. Grebenik, D. Trew and M. Slevin. The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronides in kidney failure. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54(2):158-67.
68. E. Singlas, J. C. Pioger, A. M. Taburet, J. N. Colin and J. P. Fillastre. Zidovudine disposition in patients with severe renal impairment: influence of hemodialysis. *Clin Pharmacol Ther* 1989;46(2):190-7.
69. P. du Souich and S. Erill. Metabolism of procainamide in patients with chronic heart failure, chronic respiratory failure and chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol* 1978;14(1):21-7.
70. T. P. Gibson, A. J. Atkinson, Jr., E. Matusik, L. D. Nelson and W. A. Briggs. Kinetics of procainamide and N-acetylprocainamide in renal failure. *Kidney Int* 1977;12(6):422-9.
71. E. Karlsson. Clinical pharmacokinetics of procainamide. *Clin Pharmacokinet* 1978;3(2):97-107.
72. Y. G. Kim, J. G. Shin, S. G. Shin, *et al.* Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54(6):612-20.
73. S. N. de Wildt, G. L. Kearns, J. S. Leeder and J. N. van den Anker. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* 1999;37(6):485-505.

74. K. Venkatakrishnan, L. L. Von Moltke and D. J. Greenblatt. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol* 2001;41(11):1149-79.
75. F. Leblond, C. Guevin, C. Demers, *et al.* Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(2):326-32.
76. F. A. Leblond, L. Giroux, J. P. Villeneuve and V. Pichette. Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos* 2000;28(11):1317-20.
77. J. Michaud, T. D. Nolin, J. Naud, *et al.* Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression. *J Pharmacol Sci* 2008;108(2):157-63.
78. H. Okabe, M. Hasunuma and Y. Hashimoto. The hepatic and intestinal metabolic activities of P450 in rats with surgery- and drug-induced renal dysfunction. *Pharm Res* 2003;20(10):1591-4.
79. N. Uchida, N. Kurata, K. Shimada, *et al.* Changes of hepatic microsomal oxidative drug metabolizing enzymes in chronic renal failure (CRF) rats by partial nephrectomy. *Jpn J Pharmacol* 1995;68(4):431-9.
80. C. Guevin, J. Michaud, J. Naud, F. A. Leblond and V. Pichette. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* 2002;137(7):1039-46.
81. J. Michaud, P. Dubé, J. Naud, *et al.* Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol* 2005;144(8):1067-77.
82. C. Yu, J. K. Ritter, R. J. Krieg, *et al.* Effect of chronic renal insufficiency on hepatic and renal udp-glucuronyltransferases in rats. *Drug Metab Dispos* 2006;34(4):621-7.

83. E. Simard, J. Naud, J. Michaud, *et al.* Downregulation of hepatic acetylation of drugs in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(7):1352-9.
84. J. Michaud, J. Naud, J. Chouinard, *et al.* Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(11):3041-8.
85. B. R. Bistrian. Role of the systemic inflammatory response syndrome in the development of protein-calorie malnutrition in ESRD. *Am J Kidney Dis* 1998;32(6 Suppl 4):S113-7.
86. P. Stenvinkel. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology (Carlton)* 2006;11(1):36-41.
87. P. Stenvinkel, O. Heimbürger, F. Paulter, *et al.* Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;55(5):1899-911.
88. P. Stenvinkel, M. Ketteler, R. J. Johnson, *et al.* IL-10, IL-6, and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005;67(4):1216-33.
89. Z. Abdel-Razzak, P. Loyer, A. Fautrel, *et al.* Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1993;44(4):707-15.
90. T. Yoshitani, H. Yagi, N. Inotsume and M. Yasuhara. Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats. *Biol Pharm Bull* 2002;25(8):1077-83.
91. H. Sun, Y. Huang, L. Frassetto and L. Z. Benet. Effects of uremic toxins on hepatic uptake and metabolism of erythromycin. *Drug Metab Dispos* 2004;32(11):1239-46.

92. P. J. Meier and B. Stieger. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 2002;64:635-61.
93. H. Takikawa. Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9(4):443-7.
94. G. A. Kullak-Ublick, B. Stieger and P. J. Meier. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 2004;126(1):322-42.
95. D. Laouari, R. Yang, C. Veau, I. Blanke and G. Friedlander. Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280(4):F636-45.
96. A. A. El-Sheikh, R. Masereeuw and F. G. Russel. Mechanisms of renal anionic drug transport. *Eur J Pharmacol* 2008;585(2-3):245-55.
97. B. Feng, J. L. LaPerle, G. Chang and M. V. Varma. Renal clearance in drug discovery and development: molecular descriptors, drug transporters and disease state. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;6(8):939-52.
98. K. M. Giacomini, S. M. Huang, D. J. Tweedie, *et al.* Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(3):215-36.
99. K. I. Inui, S. Masuda and H. Saito. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int* 2000;58(3):944-58.
100. R. Masereeuw and F. G. Russel. Therapeutic implications of renal anionic drug transporters. *Pharmacol Ther* 2010;126(2):200-16.
101. J. Nagai and M. Takano. Molecular-targeted approaches to reduce renal accumulation of nephrotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;6(9):1125-38.
102. F. G. Russel, R. Masereeuw and R. A. van Aubel. Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* 2002;64:563-94.

103. T. Sekine, H. Miyazaki and H. Endou. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290(2):F251-61.
104. B. Hsiang, Y. Zhu, Z. Wang, *et al.* A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 1999;274(52):37161-8.
105. Y. Zhang, L. Zhang, S. Abraham, *et al.* Assessment of the impact of renal impairment on systemic exposure of new molecular entities: evaluation of recent new drug applications. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85(3):305-11.
106. C. B. Landersdorfer, C. M. Kirkpatrick, M. Kinzig, *et al.* Competitive inhibition of renal tubular secretion of gemifloxacin by probenecid. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(9):3902-7.
107. C. Yanxiao, X. Ruijuan, Y. Jin, *et al.* Organic anion and cation transporters are possibly involved in renal excretion of entecavir in rats. *Life Sci* 2011;89(1-2):1-6.
108. T. Nakatani-Freshwater and D. R. Taft. Renal excretion of emtricitabine I: effects of organic anion, organic cation, and nucleoside transport inhibitors on emtricitabine excretion. *J Pharm Sci* 2008;97(12):5401-10.
109. Y. Sakurai, H. Motohashi, H. Ueo, *et al.* Expression levels of renal organic anion transporters (OATs) and their correlation with anionic drug excretion in patients with renal diseases. *Pharm Res* 2004;21(1):61-7.
110. L. Ji, S. Masuda, H. Saito and K. Inui. Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy. *Kidney Int* 2002;62(2):514-24.

111. T. Deguchi, M. Takemoto, N. Uehara, *et al.* Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314(2):932-8.
112. A. Takeuchi, S. Masuda, H. Saito, T. Doi and K. Inui. Role of kidney-specific organic anion transporters in the urinary excretion of methotrexate. *Kidney Int* 2001;60(3):1058-68.
113. N. J. Abbott. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 2002;200(6):629-38.
114. N. J. Abbott, L. Ronnback and E. Hansson. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7(1):41-53.
115. R. C. Janzer and M. C. Raff. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987;325(6101):253-7.
116. W. Neuhaus and C. R. Noe, Transport at the blood-brain barrier, Weinheim, Germany, 263-298
117. P. T. Ronaldson, K. Babakhanian and R. Bendayan, Drug transport in the brain, Hoboken, NJ, 411-462
118. J. F. Deeken and W. Loscher. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res* 2007;13(6):1663-74.
119. S. Eyal, P. Hsiao and J. D. Unadkat. Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy? *Pharmacol Ther* 2009;123(1):80-104.
120. H. Kusuvara and Y. Sugiyama. Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx* 2005;2(1):73-85.

121. W. Loscher and H. Potschka. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 2005;76(1):22-76.
122. S. Oswald, M. Grube, W. Siegmund and H. K. Kroemer. Transporter-mediated uptake into cellular compartments. *Xenobiotica* 2007;37(10-11):1171-95.
123. R. Kikuchi, H. Kusuhara, D. Sugiyama and Y. Sugiyama. Contribution of organic anion transporter 3 (Slc22a8) to the elimination of p-aminohippuric acid and benzylpenicillin across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(1):51-8.
124. S. Mori, S. Ohtsuki, H. Takanaga, *et al.* Organic anion transporter 3 is involved in the brain-to-blood efflux transport of thiopurine nucleobase analogs. *J Neurochem* 2004;90(4):931-41.
125. S. Mori, H. Takanaga, S. Ohtsuki, *et al.* Rat organic anion transporter 3 (rOAT3) is responsible for brain-to-blood efflux of homovanillic acid at the abluminal membrane of brain capillary endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(4):432-40.
126. S. Ohtsuki and T. Terasaki. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* 2007;24(9):1745-58.
127. A. Ose, M. Ito, H. Kusuhara, *et al.* Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4). *Drug Metab Dispos* 2009;37(2):315-21.

128. A. Ose, H. Kusuhara, C. Endo, *et al.* Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier. *Drug Metab Dispos* 2010;38(1):168-76.
129. H. Alpay, O. Altun and N. K. Biyikli. Cefepime-induced non-convulsive status epilepticus in a peritoneal dialysis patient. *Pediatr Nephrol* 2004;19(4):445-7.
130. D. Chatellier, M. Jourdain, J. Mangalaboyi, *et al.* Cefepime-induced neurotoxicity: an underestimated complication of antibiotherapy in patients with acute renal failure. *Intensive Care Med* 2002;28(2):214-7.
131. N. Ferrara, P. Abete, M. Giordano, *et al.* Neurotoxicity induced by Cefepime in a very old hemodialysis patient. *Clin Nephrol* 2003;59(5):388-90.
132. L. Ci, H. Kusuhara, M. Adachi, *et al.* Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol* 2007;71(6):1591-7.
133. Y. Nozaki, H. Kusuhara, T. Kondo, *et al.* Characterization of the uptake of organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3 substrates by human kidney slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321(1):362-9.
134. H. Ueo, H. Motohashi, T. Katsura and K. Inui. Human organic anion transporter hOAT3 is a potent transporter of cephalosporin antibiotics, in comparison with hOAT1. *Biochem Pharmacol* 2005;70(7):1104-13.
135. K. B. Goralski, G. Hartmann, M. Piquette-Miller and K. W. Renton. Downregulation of mdr1a expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin. *Br J Pharmacol* 2003;139(1):35-48.
136. V. Petrovic, S. Teng and M. Piquette-Miller. Regulation of drug transporters during infection and inflammation. *Mol Interv* 2007;7(2):99-111.

137. Y. L. Zhao, J. Du, H. Kanazawa, *et al.* Effect of endotoxin on doxorubicin transport across blood-brain barrier and P-glycoprotein function in mice. *Eur J Pharmacol* 2002;445(1-2):115-23.
138. T. Akahoshi, N. Kobayashi, S. Hosaka, *et al.* In-vivo induction of monocyte chemotactic and activating factor in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10(12):2244-9.
139. T. Higuchi, C. Yamamoto, T. Kuno, *et al.* Increased production of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist by peripheral blood mononuclear cells in undialyzed chronic renal failure. *Nephron* 1997;76(1):26-31.
140. C. W. Oettinger, L. A. Bland, J. C. Oliver, *et al.* The effect of uremia on tumor necrosis factor-alpha release after an in vitro whole-blood endotoxin challenge. *J Am Soc Nephrol* 1994;4(11):1890-5.
141. G. Sunder-Plassmann, S. Kapiotis, C. Gasche and U. Klaar. Functional characterization of cytokine autoantibodies in chronic renal failure patients. *Kidney Int* 1994;45(5):1484-8.
142. R. Ziesche, M. Roth, E. Papakonstantinou, *et al.* A granulocyte inhibitory protein overexpressed in chronic renal disease regulates expression of interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(1):301-5.
143. L. A. Stanley, B. C. Horsburgh, J. Ross, N. Scheer and C. R. Wolf. Drug transporters: gatekeepers controlling access of xenobiotics to the cellular interior. *Drug Metab Rev* 2009;41(1):27-65.
144. C. F. Higgins. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007;446(7137):749-57.

145. U. Hoffmann and H. K. Kroemer. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev* 2004;36(3-4):669-701.
146. A. H. Schinkel and J. W. Jonker. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(1):3-29.
147. T. Lin, O. Islam and K. Heese. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis-a different perspective. *Cell Res* 2006;16(11):857-71.
148. M. Dean, A. Rzhetsky and R. Allikmets. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001;11(7):1156-66.
149. H. Lage. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22(3):188-99.
150. P. M. Jones and A. M. George. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(6):682-99.
151. P. M. Jones, M. L. O'Mara and A. M. George. ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends Biochem Sci* 2009;34(10):520-31.
152. M. K. Choi, H. Kim, Y. H. Han, I. S. Song and C. K. Shim. Involvement of Mrp2/MRP2 in the species different excretion route of benzylpenicillin between rat and human. *Xenobiotica* 2009;39(2):171-81.
153. Y. Cui, J. Konig, J. K. Buchholz, *et al.* Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 1999;55(5):929-37.
154. C. J. Endres, P. Hsiao, F. S. Chung and J. D. Unadkat. The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci* 2006;27(5):501-17.

155. K. Jemnitz, K. Heredi-Szabo, J. Janossy, *et al.* ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. *Drug Metab Rev* 2010;42(3):402-36.
156. D. Keppler. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2011;201(201):299-323.
157. U. Roy, G. Chakravarty, K. Honer Zu Bentrup and D. Mondal. Montelukast is a potent and durable inhibitor of multidrug resistance protein 2-mediated efflux of taxol and saquinavir. *Biol Pharm Bull* 2009;32(12):2002-9.
158. S. Shen and W. Zhang. ABC transporters and drug efflux at the blood-brain barrier. *Rev Neurosci* 2010;21(1):29-53.
159. A. T. Nies, M. Rius and D. Keppler, Multidrug resistance proteins of the ABCC subfamily, Hoboken, NJ, 263-318
160. J. Wijnholds, G. L. Scheffer, M. van der Valk, *et al.* Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage. *J Exp Med* 1998;188(5):797-808.
161. K. C. Peng, F. Cluzeaud, M. Bens, *et al.* Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem Cytochem* 1999;47(6):757-68.
162. R. G. Deeley, C. Westlake and S. P. Cole. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 2006;86(3):849-99.
163. T. Litman, T. E. Druley, W. D. Stein and S. E. Bates. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(7):931-59.

164. R. L. Juliano and V. Ling. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455(1):152-62.
165. C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, *et al.* Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986;47(3):381-9.
166. P. Gros, M. Raymond, J. Bell and D. Housman. Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol* 1988;8(7):2770-8.
167. S. I. Hsu, L. Lothstein and S. B. Horwitz. Differential overexpression of three *mdr* gene family members in multidrug-resistant J774.2 mouse cells. Evidence that distinct P-glycoprotein precursors are encoded by unique *mdr* genes. *J Biol Chem* 1989;264(20):12053-62.
168. W. Loscher and H. Potschka. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* 2005;2(1):86-98.
169. A. M. van der Blik, P. M. Kooiman, C. Schneider and P. Borst. Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein. *Gene* 1988;71(2):401-11.
170. A. H. Schinkel. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997;8(3):161-70.
171. Y. Shitara, H. Sato and Y. Sugiyama. Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:689-723.
172. W. T. Bellamy. P-glycoproteins and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:161-83.
173. M. M. Gottesman and I. Pastan. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.

174. M. M. Gottesman, I. Pastan and S. V. Ambudkar. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 1996;6(5):610-7.
175. H. Kusuhara, H. Suzuki and Y. Sugiyama. The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *J Pharm Sci* 1998;87(9):1025-40.
176. A. H. Schinkel. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;36(2-3):179-194.
177. F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(21):7735-8.
178. A. H. Schinkel, C. A. Mol, E. Wagenaar, *et al.* Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur J Cancer* 1995;31A(7-8):1295-8.
179. R. Callaghan and J. R. Riordan. Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 1993;268(21):16059-64.
180. K. Ueda, N. Okamura, M. Hirai, *et al.* Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992;267(34):24248-52.
181. A. H. Schinkel, J. J. Smit, O. van Tellingen, *et al.* Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77(4):491-502.
182. R. B. Kim, C. Wandel, B. Leake, *et al.* Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* 1999;16(3):408-14.
183. C. Wandel, R. B. Kim, S. Kajiji, *et al.* P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res* 1999;59(16):3944-8.

184. H. Glaeser. Importance of P-glycoprotein for drug-drug interactions. *Handb Exp Pharmacol* 2011;201(201):285-97.
185. E. B. Leahey, Jr., J. A. Reiffel, R. E. Drusin, *et al.* Interaction between quinidine and digoxin. *JAMA* 1978;240(6):533-4.
186. C. Woodland, S. Ito and G. Koren. A model for the prediction of digoxin-drug interactions at the renal tubular cell level. *Ther Drug Monit* 1998;20(2):134-8.
187. S. Ito, C. Woodland, P. A. Harper and G. Koren. The mechanism of the verapamil-digoxin interaction in renal tubular cells (LLC-PK1). *Life Sci* 1993;53(24):PL399-403.
188. Y. Tanigawara, N. Okamura, M. Hirai, *et al.* Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263(2):840-5.
189. A. H. Schinkel, E. Wagenaar, C. A. Mol and L. van Deemter. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 1996;97(11):2517-24.
190. A. J. Sadeque, C. Wandel, H. He, S. Shah and A. J. Wood. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68(3):231-7.
191. F. Ruschitzka, P. J. Meier, M. Turina, T. F. Luscher and G. Noll. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet* 2000;355(9203):548-9.
192. S. P. Cole, G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992;258(5088):1650-4.
193. G. D. Kruh and M. G. Belinsky. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003;22(47):7537-52.

194. G. D. Kruh, M. G. Belinsky, J. M. Gallo and K. Lee. Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(1):5-14.
195. D. Lautier, Y. Canitrot, R. G. Deeley and S. P. Cole. Multidrug resistance mediated by the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Biochem Pharmacol* 1996;52(7):967-77.
196. J. M. Maher, X. Cheng, A. L. Slitt, M. Z. Dieter and C. D. Klaassen. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 2005;33(7):956-62.
197. P. Borst, C. de Wolf and K. van de Wetering. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch* 2007;453(5):661-73.
198. J. E. Manautou, D. R. de Waart, C. Kunne, *et al.* Altered disposition of acetaminophen in mice with a disruption of the Mrp3 gene. *Hepatology* 2005;42(5):1091-8.
199. F. G. Russel, J. B. Koenderink and R. Masereeuw. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29(4):200-7.
200. J. Wijnholds, C. A. Mol, L. van Deemter, *et al.* Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(13):7476-81.
201. S. K. Konig, M. Herzog, D. Theile, *et al.* Impact of drug transporters on cellular resistance towards saquinavir and darunavir. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(11):2319-28.

202. A. Nannelli, F. Rossignolo, R. Tolando, *et al.* Expression and distribution of CYP3A genes, CYP2B2, and MDR1, MRP1, MRP2, LRP efflux transporters in brain of control and rifampicin-treated pigs. *Mol Cell Biochem* 2010;337(1-2):133-43.
203. M. Nishimura, A. Koeda, H. Morikawa, *et al.* Comparison of inducibility of multidrug resistance (MDR)1, multidrug resistance-associated protein (MRP)1, and MRP2 mRNAs by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and cynomolgus monkey hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 2008;31(11):2068-72.
204. M. Nishimura, A. Koeda, E. Suzuki, *et al.* Regulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21(4):297-307.
205. A. T. Nies and D. Keppler. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 2007;453(5):643-59.
206. D. S. Miller, S. N. Nobmann, H. Gutmann, *et al.* Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol* 2000;58(6):1357-67.
207. E. A. van Vliet, S. Redeker, E. Aronica, P. M. Edelbroek and J. A. Gorter. Expression of multidrug transporters MRP1, MRP2, and BCRP shortly after status epilepticus, during the latent period, and in chronic epileptic rats. *Epilepsia* 2005;46(10):1569-80.
208. M. Horikawa, Y. Kato, C. A. Tyson and Y. Sugiyama. The potential for an interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17(1):23-33.

209. A. T. Nies, H. Koepsell, K. Damme and M. Schwab. Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2011;201(201):105-67.
210. M. Rius, J. Hummel-Eisenbeiss, A. F. Hofmann and D. Keppler. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290(4):G640-9.
211. A. L. Slitt, N. J. Cherrington, J. M. Maher and C. D. Klaassen. Induction of multidrug resistance protein 3 in rat liver is associated with altered vectorial excretion of acetaminophen metabolites. *Drug Metab Dispos* 2003;31(9):1176-86.
212. R. A. van Aubel, P. H. Smeets, J. G. Peters, R. J. Bindels and F. G. Russel. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(3):595-603.
213. P. H. Smeets, R. A. van Aubel, A. C. Wouterse, J. J. van den Heuvel and F. G. Russel. Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2) to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(11):2828-35.
214. M. Leggas, M. Adachi, G. L. Scheffer, *et al.* Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol* 2004;24(17):7612-21.
215. G. Jedlitschky, B. Burchell and D. Keppler. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2000;275(39):30069-74.
216. M. Hu, K. K. To, V. W. Mak and B. Tomlinson. The ABCG2 transporter and its relations with the pharmacokinetics, drug interaction and lipid-lowering effects of statins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7(1):49-62.

217. R. W. Robey, O. Polgar, J. Deeken, K. K. W. To and S. E. Bates, Breast cancer resistance protein, Hoboken, NJ, 319-358
218. K. W. Scotto. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene* 2003;22(47):7496-511.
219. O. Polgar, R. W. Robey and S. E. Bates. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(1):1-15.
220. P. A. Fetsch, A. Abati, T. Litman, *et al.* Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett* 2006;235(1):84-92.
221. J. W. Jonker, J. W. Smit, R. F. Brinkhuis, *et al.* Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(20):1651-6.
222. A. E. van Herwaarden, J. W. Jonker, E. Wagenaar, *et al.* The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* 2003;63(19):6447-52.
223. S. Cisternino, C. Mercier, F. Bourasset, F. Roux and J. M. Scherrmann. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* 2004;64(9):3296-301.
224. P. Breedveld, D. Pluim, G. Cipriani, *et al.* The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res* 2005;65(7):2577-82.
225. Y. J. Lee, H. Kusuhara, J. W. Jonker, A. H. Schinkel and Y. Sugiyama. Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse

- blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312(1):44-52.
226. J. Konig. Uptake transporters of the human OATP family: molecular characteristics, substrates, their role in drug-drug interactions, and functional consequences of polymorphisms. *Handb Exp Pharmacol* 2011;201(201):1-28.
227. M. A. Hediger, M. F. Romero, J. B. Peng, *et al.* The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch* 2004;447(5):465-8.
228. E. Jacquemin, B. Hagenbuch, B. Stieger, A. W. Wolkoff and P. J. Meier. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(1):133-7.
229. J. R. Kunta and P. J. Sinko. Intestinal drug transporters: in vivo function and clinical importance. *Curr Drug Metab* 2004;5(1):109-24.
230. R. G. Tirona and R. B. Kim, Organic anion-transporting polypeptides, Hoboken, NJ, 75-104
231. M. Yarim and M. Koksai, Organic anion transporting polypeptides (Oatps/OATPs), Weinheim, Germany, 81-112
232. S. Leuthold, B. Hagenbuch, N. Mohebbi, *et al.* Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296(3):C570-82.
233. T. Toyohara, T. Suzuki, R. Morimoto, *et al.* SLCO4C1 transporter eliminates uremic toxins and attenuates hypertension and renal inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(12):2546-55.

234. H. Fukuda, R. Ohashi, N. Ohashi, H. Yabuuchi and I. Tamai. Estimation of transporters involved in the hepatobiliary transport of TA-0201CA using sandwich-cultured rat hepatocytes from normal and multidrug resistance-associated protein 2-deficient rats. *Drug Metab Dispos* 2010;38(9):1505-13.
235. M. G. Ismail, C. Stanca, H. R. Ha, *et al.* Interactions of glycyrrhizin with organic anion transporting polypeptides of rat and human liver. *Hepatol Res* 2003;26(4):343-347.
236. T. Lan, A. Rao, J. Haywood, *et al.* Interaction of macrolide antibiotics with intestinally expressed human and rat organic anion-transporting polypeptides. *Drug Metab Dispos* 2009;37(12):2375-82.
237. S. Masuda, H. Saito and K. I. Inui. Interactions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with rat renal organic anion transporter, OAT-K1. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283(3):1039-42.
238. S. Masuda, K. Ibaramoto, A. Takeuchi, *et al.* Cloning and functional characterization of a new multispecific organic anion transporter, OAT-K2, in rat kidney. *Mol Pharmacol* 1999;55(4):743-52.
239. T. Mikkaichi, T. Suzuki, T. Onogawa, *et al.* Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(10):3569-74.
240. M. Niemi. Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 2007;8(7):787-802.
241. T. Tanino, A. Nawa, M. Nakao, *et al.* Organic anion transporting polypeptide 2-mediated uptake of paclitaxel and 2'-ethylcarbonate-linked paclitaxel in freshly isolated rat hepatocytes. *J Pharm Pharmacol* 2009;61(8):1029-35.

242. H. Yamaguchi, M. Sugie, M. Okada, *et al.* Transport of estrone 3-sulfate mediated by organic anion transporter OATP4C1: estrone 3-sulfate binds to the different recognition site for digoxin in OATP4C1. *Drug Metab Pharmacokinet* 2010;25(3):314-7.
243. A. Kalliokoski and M. Niemi. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 2009;158(3):693-705.
244. G. K. Dresser, D. G. Bailey, B. F. Leake, *et al.* Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71(1):11-20.
245. G. K. Dresser, R. B. Kim and D. G. Bailey. Effect of grapefruit juice volume on the reduction of fexofenadine bioavailability: possible role of organic anion transporting polypeptides. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77(3):170-7.
246. H. Yamazaki, S. Hiroki, T. Urano, K. Inoue and T. Shimada. Effects of roxithromycin, erythromycin and troleandomycin on their N-demethylation by rat and human cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica* 1996;26(11):1143-53.
247. S. G. Simonson, A. Raza, P. D. Martin, *et al.* Rosuvastatin pharmacokinetics in heart transplant recipients administered an antirejection regimen including cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(2):167-77.
248. T. A. Jacobson. Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. *Am J Cardiol* 2004;94(9):1140-6.
249. A. Seithel, S. Eberl, K. Singer, *et al.* The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* 2007;35(5):779-86.

250. W. Lee, H. Glaeser, L. H. Smith, *et al.* Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem* 2005;280(10):9610-7.
251. N. Anzai and H. Endou, Drug transport in the kidney, Hoboken, NJ, 463-493
252. H. Sun, H. Dai, N. Shaik and W. F. Elmquist. Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55(1):83-105.
253. B. Gao, B. Hagenbuch, G. A. Kullak-Ublick, *et al.* Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(1):73-9.
254. B. L. Urquhart and R. B. Kim. Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65(11):1063-70.
255. M. Cvetkovic, B. Leake, M. F. Fromm, G. R. Wilkinson and R. B. Kim. OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab Dispos* 1999;27(8):866-71.
256. B. Noe, B. Hagenbuch, B. Stieger and P. J. Meier. Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(19):10346-50.
257. H. Asaba, K. Hosoya, H. Takanaga, *et al.* Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J Neurochem* 2000;75(5):1907-16.
258. D. Sugiyama, H. Kusuhara, Y. Shitara, *et al.* Characterization of the efflux transport of 17beta-estradiol-D-17beta-glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298(1):316-22.

259. R. Kikuchi, H. Kusuhara, T. Abe, H. Endou and Y. Sugiyama. Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311(3):1147-53.
260. C. Dagenais, J. Ducharme and G. M. Pollack. Uptake and efflux of the peptidic delta-opioid receptor agonist. *Neurosci Lett* 2001;301(3):155-8.
261. F. Bourasset, S. Cisternino, J. Temsamani and J. M. Scherrmann. Evidence for an active transport of morphine-6-beta-d-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2003;86(6):1564-7.
262. H. Koepsell and H. Endou. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch* 2004;447(5):666-76.
263. J. A. Jacobsson, T. Haitina, J. Lindblom and R. Fredriksson. Identification of six putative human transporters with structural similarity to the drug transporter SLC22 family. *Genomics* 2007;90(5):595-609.
264. S. A. Eraly, K. T. Bush, R. V. Sampogna, V. Bhatnagar and S. K. Nigam. The molecular pharmacology of organic anion transporters: from DNA to FDA? *Mol Pharmacol* 2004;65(3):479-87.
265. M. Nagle, D. M. Truong, V. Bhatnagar, *et al.*, Organic anion transporters, Hoboken, NJ, 51-73
266. J. Kindla, M. F. Fromm and J. Konig. In vitro evidence for the role of OATP and OCT uptake transporters in drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009;5(5):489-500.
267. D. H. Sweet. Organic anion transporter (Slc22a) family members as mediators of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204(3):198-215.

268. T. J. Urban and K. M. Giacomini, Organic cation transporters, Hoboken, NJ, 11-33
269. I. A. Qureshi, I. Elimrani, E. Seidman and G. Mitchell, Organic cation/carnitine transporters, Hoboken, NJ, 35-50
270. T. Sekine, N. Watanabe, M. Hosoyamada, Y. Kanai and H. Endou. Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 1997;272(30):18526-9.
271. D. H. Sweet, L. M. Chan, R. Walden, *et al.* Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na⁺ gradient. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284(4):F763-9.
272. D. H. Sweet, N. A. Wolff and J. B. Pritchard. Expression cloning and characterization of ROAT1. The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem* 1997;272(48):30088-95.
273. G. Burckhardt and B. C. Burckhardt. In vitro and in vivo evidence of the importance of organic anion transporters (OATs) in drug therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2011;201(201):29-104.
274. T. Deguchi, K. Isozaki, K. Yousuke, T. Terasaki and M. Otagiri. Involvement of organic anion transporters in the efflux of uremic toxins across the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2006;96(4):1051-9.
275. Y. Kobayashi, N. Ohshiro, R. Sakai, *et al.* Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *J Pharm Pharmacol* 2005;57(5):573-8.
276. S. Ohtsuki, H. Asaba, H. Takanaga, *et al.* Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement

- in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. *J Neurochem* 2002;83(1):57-66.
277. H. Tahara, M. Shono, H. Kusuhara, *et al.* Molecular cloning and functional analyses of OAT1 and OAT3 from cynomolgus monkey kidney. *Pharm Res* 2005;22(4):647-60.
278. Y. Uwai, H. Ida, Y. Tsuji, T. Katsura and K. Inui. Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by SLC22A family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2). *Pharm Res* 2007;24(4):811-5.
279. C. E. Lopez-Nieto, G. You, K. T. Bush, *et al.* Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney. *J Biol Chem* 1997;272(10):6471-8.
280. M. Hosoyamada, T. Sekine, Y. Kanai and H. Endou. Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 1999;276(1 Pt 2):F122-8.
281. G. Reid, N. A. Wolff, F. M. Dautzenberg and G. Burckhardt. Cloning of a human renal p-aminohippurate transporter, hROAT1. *Kidney Blood Press Res* 1998;21(2-4):233-7.
282. S. A. Eraly, V. Vallon, D. A. Vaughn, *et al.* Decreased renal organic anion secretion and plasma accumulation of endogenous organic anions in OAT1 knock-out mice. *J Biol Chem* 2006;281(8):5072-83.
283. A. N. Rizwan and G. Burckhardt. Organic anion transporters of the SLC22 family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm Res* 2007;24(3):450-70.

284. G. R. Brown. Cephalosporin-probenecid drug interactions. *Clin Pharmacokinet* 1993;24(4):289-300.
285. K. C. Cundy, B. G. Petty, J. Flaherty, *et al.* Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1247-52.
286. K. C. Cundy, Z. H. Li and W. A. Lee. Effect of probenecid on the distribution, metabolism, and excretion of cidofovir in rabbits. *Drug Metab Dispos* 1996;24(3):315-21.
287. M. L. Doan, G. B. Mallory, S. L. Kaplan, *et al.* Treatment of adenovirus pneumonia with cidofovir in pediatric lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(9):883-9.
288. S. A. Lacy, M. J. Hitchcock, W. A. Lee, P. Tellier and K. C. Cundy. Effect of oral probenecid coadministration on the chronic toxicity and pharmacokinetics of intravenous cidofovir in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 1998;44(2):97-106.
289. J. P. Lalezari, W. L. Drew, E. Glutzer, *et al.* (S)-1-[3-hydroxy-2-(phosphonylmethoxy)propyl]cytosine (cidofovir): results of a phase I/II study of a novel antiviral nucleotide analogue. *J Infect Dis* 1995;171(4):788-96.
290. G. D. Simonson, A. C. Vincent, K. J. Roberg, Y. Huang and V. Iwanij. Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein. *J Cell Sci* 1994;107 (Pt 4)(Pt 4):1065-72.
291. T. Sekine, S. H. Cha, M. Tsuda, *et al.* Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed predominantly in the liver. *FEBS Lett* 1998;429(2):179-82.

292. W. Sun, R. R. Wu, P. D. van Poelje and M. D. Erion. Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283(2):417-22.
293. A. Enomoto, M. Takeda, M. Shimoda, *et al.* Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301(3):797-802.
294. R. Kojima, T. Sekine, M. Kawachi, *et al.* Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(4):848-57.
295. M. Ljubojevic, D. Balen, D. Breljak, *et al.* Renal expression of organic anion transporter OAT2 in rats and mice is regulated by sex hormones. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(1):F361-72.
296. K. P. Brady, H. Dushkin, D. Fornzler, *et al.* A novel putative transporter maps to the osteosclerosis (oc) mutation and is not expressed in the oc mutant mouse. *Genomics* 1999;56(3):254-61.
297. S. H. Cha, T. Sekine, J. I. Fukushima, *et al.* Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 2001;59(5):1277-86.
298. H. Kusuhara, T. Sekine, N. Utsunomiya-Tate, *et al.* Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem* 1999;274(19):13675-80.
299. J. E. Race, S. M. Grassl, W. J. Williams and E. J. Holtzman. Molecular cloning and characterization of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255(2):508-14.

300. D. H. Sweet, D. S. Miller, J. B. Pritchard, *et al.* Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice. *J Biol Chem* 2002;277(30):26934-43.
301. V. Vallon, T. Rieg, S. Y. Ahn, *et al.* Overlapping in vitro and in vivo specificities of the organic anion transporters OAT1 and OAT3 for loop and thiazide diuretics. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(4):F867-73.
302. A. L. Vanwert, R. M. Bailey and D. H. Sweet. Organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) knockout mice exhibit altered clearance and distribution of penicillin G. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(4):F1332-41.
303. A. L. VanWert and D. H. Sweet. Impaired clearance of methotrexate in organic anion transporter 3 (Slc22a8) knockout mice: a gender specific impact of reduced folates. *Pharm Res* 2008;25(2):453-62.
304. A. L. Vanwert, C. Srimaroeng and D. H. Sweet. Organic anion transporter 3 (oat3/slc22a8) interacts with carboxyfluoroquinolones, and deletion increases systemic exposure to ciprofloxacin. *Mol Pharmacol* 2008;74(1):122-31.
305. K. H. Beyer, H. F. Russo, E. K. Tillson, *et al.* 'Benemid,' p-(di-n-propylsulfamyl)-benzoic acid; its renal affinity and its elimination. *Am J Physiol* 1951;166(3):625-40.
306. D. Overbosch, C. Van Gulpen, J. Hermans and H. Mattie. The effect of probenecid on the renal tubular excretion of benzylpenicillin. *Br J Clin Pharmacol* 1988;25(1):51-8.
307. G. W. Aherne, E. Piall, V. Marks, G. Mould and W. F. White. Prolongation and enhancement of serum methotrexate concentrations by probenecid. *Br Med J* 1978;1(6120):1097-9.
308. M. L. Frenia and K. S. Long. Methotrexate and nonsteroidal antiinflammatory drug interactions. *Ann Pharmacother* 1992;26(2):234-7.

309. A. Thyss, G. Milano, J. Kubar, M. Namer and M. Schneider. Clinical and pharmacokinetic evidence of a life-threatening interaction between methotrexate and ketoprofen. *Lancet* 1986;1(8475):256-8.
310. A. Enomoto and H. Endou. Roles of organic anion transporters (OATs) and a urate transporter (URAT1) in the pathophysiology of human disease. *Clin Exp Nephrol* 2005;9(3):195-205.
311. K. Mori, Y. Ogawa, K. Ebihara, *et al.* Kidney-specific expression of a novel mouse organic cation transporter-like protein. *FEBS Lett* 1997;417(3):371-4.
312. A. Enomoto, H. Kimura, A. Chairoungdua, *et al.* Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002;417(6887):447-52.
313. M. Hosoyamada, K. Ichida, A. Enomoto, T. Hosoya and H. Endou. Function and localization of urate transporter 1 in mouse kidney. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(2):261-8.
314. K. Ichida. What lies behind serum urate concentration? Insights from genetic and genomic studies. *Genome Med* 2009;1(12):118.
315. T. Iwanaga, M. Sato, T. Maeda, T. Ogihara and I. Tamai. Concentration-dependent mode of interaction of angiotensin II receptor blockers with uric acid transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(1):211-7.
316. J. Biber, M. Custer, A. Werner, B. Kaissling and H. Murer. Localization of NaPi-1, a Na/Pi cotransporter, in rabbit kidney proximal tubules. II. Localization by immunohistochemistry. *Pflugers Arch* 1993;424(3-4):210-5.

317. A. Werner, M. L. Moore, N. Mantei, *et al.* Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(21):9608-12.
318. S. S. Chong, K. Kristjansson, H. Y. Zoghbi and M. R. Hughes. Molecular cloning of the cDNA encoding a human renal sodium phosphate transport protein and its assignment to chromosome 6p21.3-p23. *Genomics* 1993;18(2):355-9.
319. K. Miyamoto, S. Tatsumi, T. Sonoda, *et al.* Cloning and functional expression of a Na(+)-dependent phosphate co-transporter from human kidney: cDNA cloning and functional expression. *Biochem J* 1995;305 (Pt 1)(Pt 1):81-5.
320. A. E. Busch, A. Schuster, S. Waldegger, *et al.* Expression of a renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi-1) induces a conductance in *Xenopus* oocytes permeable for organic and inorganic anions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(11):5347-51.
321. H. Uchino, I. Tamai, K. Yamashita, *et al.* p-aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic phosphate transporter NPT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(1):254-9.
322. M. Iharada, T. Miyaji, T. Fujimoto, *et al.* Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J Biol Chem* 2010;285(34):26107-13.
323. H. Yabuuchi, I. Tamai, K. Morita, *et al.* Hepatic sinusoidal membrane transport of anionic drugs mediated by anion transporter Npt1. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286(3):1391-6.
324. T. Deguchi, S. Ohtsuki, M. Otagiri, *et al.* Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int* 2002;61(5):1760-8.

325. S. Masuda, H. Saito, H. Nonoguchi, K. Tomita and K. Inui. mRNA distribution and membrane localization of the OAT-K1 organic anion transporter in rat renal tubules. *FEBS Lett* 1997;407(2):127-31.
326. E. C. Chow, H. Sun, A. A. Khan, G. M. Groothuis and K. S. Pang. Effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on transporters and enzymes of the rat intestine and kidney in vivo. *Biopharm Drug Dispos* 2010;31(1):91-108.
327. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
328. J. Naud, L. P. Laurin, J. Michaud, *et al.* Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats. *Drug Metab Dispos* 2012;40(1):39-46.
329. J. Naud, J. Michaud, S. Beauchemin, *et al.* Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome p450 in rats. *Drug Metab Dispos* 2011;39(8):1363-9.
330. J. Naud, J. Michaud, F. A. Leblond, *et al.* Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug Metab Dispos* 2008;36(1):124-8.
331. K. J. Livak and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
332. R. Yumoto, T. Murakami, Y. Nakamoto, *et al.* Transport of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, across rat intestine and Caco-2 cell monolayers in the presence of cytochrome P-450 3A-related compounds. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289(1):149-55.

333. A. S. Windass, S. Lowes, Y. Wang and C. D. Brown. The contribution of organic anion transporters OAT1 and OAT3 to the renal uptake of rosuvastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322(3):1221-7.
334. L. M. Chan, S. Lowes and B. H. Hirst. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 2004;21(1):25-51.
335. M. A. Touchette and R. L. Slaughter. The effect of renal failure on hepatic drug clearance. *DICP* 1991;25(11):1214-24.
336. K. I. Hirsch-Ernst, C. Ziemann, H. Foth, *et al.* Induction of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* 1998;176(3):506-15.
337. A. M. Belliard, B. Lacour, R. Farinotti and C. Leroy. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells. *J Pharm Sci* 2004;93(6):1524-36.
338. Y. M. Lee, I. S. Song, S. G. Kim, *et al.* The suppressed expression and functional activity of hepatic P-glycoprotein in rats with protein-calorie malnutrition. *J Pharm Sci* 2003;92(7):1323-30.
339. C. G. Dietrich, I. V. Martin, A. C. Porn, *et al.* Fasting induces basolateral uptake transporters of the SLC family in the liver via HNF4alpha and PGC1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293(3):G585-90.
340. C. Chen, X. Cheng, M. Z. Dieter, Y. Tanaka and C. D. Klaassen. Activation of cAMP-dependent signaling pathway induces mouse organic anion transporting polypeptide 2 expression. *Mol Pharmacol* 2007;71(4):1159-64.

341. S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997;25(17):3389-402.
342. B. Gao, M. V. St Pierre, B. Stieger and P. J. Meier. Differential expression of bile salt and organic anion transporters in developing rat liver. *J Hepatol* 2004;41(2):201-8.
343. V. Keitel, J. Kartenbeck, A. T. Nies, *et al.* Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 2000;32(6):1317-28.
344. S. Kikuchi, M. Hata, K. Fukumoto, *et al.* Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet* 2002;31(3):320-5.
345. A. Bretscher, D. Chambers, R. Nguyen and D. Reczek. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:113-43.
346. P. Mangeat, C. Roy and M. Martin. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 1999;9(5):187-92.
347. S. Tsukita and S. Yonemura. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem* 1999;274(49):34507-10.
348. J. Saeki, S. Sekine and T. Horie. LPS-induced dissociation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and radixin is associated with Mrp2 selective internalization in rats. *Biochem Pharmacol* 2011;81(1):178-84.
349. T. K. Lee, A. S. Koh, Z. Cui, R. H. Pierce and N. Ballatori. N-glycosylation controls functional activity of Oatp1, an organic anion transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285(2):G371-81.

350. E. Hanggi, A. F. Grundschober, S. Leuthold, P. J. Meier and M. V. St-Pierre. Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Mol Pharmacol* 2006;70(3):806-17.
351. G. L. Guo and C. D. Klaassen. Protein kinase C suppresses rat organic anion transporting polypeptide 1- and 2-mediated uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299(2):551-7.
352. Y. Xiao, E. Nieves, R. H. Angeletti, G. A. Orr and A. W. Wolkoff. Rat organic anion transporting protein 1A1 (Oatp1a1): purification and phosphopeptide assignment. *Biochemistry* 2006;45(10):3357-69.
353. K. Kock, A. Koenen, B. Giese, *et al.* Rapid modulation of the organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1, SLCO2B1) function by protein kinase C-mediated internalization. *J Biol Chem* 2010;285(15):11336-47.
354. P. P. Annaert, R. Z. Turncliff, C. L. Booth, D. R. Thakker and K. L. Brouwer. P-glycoprotein-mediated in vitro biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2001;29(10):1277-83.
355. M. Kuniyama, J. Nagai, T. Murakami and M. Takano. Renal excretion of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats with glycerol-induced acute renal failure. *J Pharm Pharmacol* 1998;50(10):1161-5.
356. M. Tsujimoto, Y. Kinoshita, S. Hirata, *et al.* Effects of uremic serum and uremic toxins on hepatic uptake of digoxin. *Ther Drug Monit* 2008;30(5):576-82.
357. S. A. Terlouw, R. Masereeuw and F. G. Russel. Modulatory effects of hormones, drugs, and toxic events on renal organic anion transport. *Biochem Pharmacol* 2003;65(9):1393-405.

358. T. Deguchi, Y. Kouno, T. Terasaki, A. Takadate and M. Otagiri. Differential contributions of rOat1 (Slc22a6) and rOat3 (Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats. *Pharm Res* 2005;22(4):619-27.
359. T. Deguchi, H. Kusuhara, A. Takadate, *et al.* Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. *Kidney Int* 2004;65(1):162-74.
360. A. Enomoto and T. Niwa. Roles of organic anion transporters in the progression of chronic renal failure. *Ther Apher Dial* 2007;11(Suppl 1):S27-31.
361. I. Leier, J. Hummel-Eisenbeiss, Y. Cui and D. Keppler. ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney Int* 2000;57(4):1636-42.
362. Y. Tsutsumi, T. Deguchi, M. Takano, *et al.* Renal disposition of a furan dicarboxylic acid and other uremic toxins in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303(2):880-7.
363. T. Niwa and M. Ise. Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* 1994;124(1):96-104.
364. T. Niwa, M. Ise and T. Miyazaki. Progression of glomerular sclerosis in experimental uremic rats by administration of indole, a precursor of indoxyl sulfate. *Am J Nephrol* 1994;14(3):207-12.
365. T. Niwa, S. Tsukushi, M. Ise, *et al.* Indoxyl sulfate and progression of renal failure: effects of a low-protein diet and oral sorbent on indoxyl sulfate production in uremic rats and undialyzed uremic patients. *Miner Electrolyte Metab* 1997;23(3-6):179-84.
366. R. A. Fishman. Blood-brain and CSF barriers to penicillin and related organic acids. *Arch Neurol* 1966;15(2):113-24.
367. R. A. Fishman and N. H. Raskin. Experimental uremic encephalopathy. Permeability and electrolyte metabolism of brain and other tissues. *Arch Neurol* 1967;17(1):10-21.

368. W. G. Mayhan. Effect of lipopolysaccharide on the permeability and reactivity of the cerebral microcirculation: role of inducible nitric oxide synthase. *Brain Res* 1998;792(2):353-7.
369. W. G. Mayhan. Cellular mechanisms by which tumor necrosis factor-alpha produces disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2002;927(2):144-52.
370. T. Nishioku, S. Dohgu, F. Takata, *et al.* Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29(3):309-16.
371. H. E. de Vries, M. C. Blom-Rosemalen, A. G. de Boer, *et al.* Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277(3):1418-23.
372. H. E. de Vries, M. C. Blom-Rosemalen, M. van Oosten, *et al.* The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 1996;64(1):37-43.
373. P. Lu, C. Gonzales, Y. Chen, *et al.* CNS penetration of small molecules following local inflammation, widespread systemic inflammation or direct injury to the nervous system. *Life Sci* 2009;85(11-12):450-6.
374. M. T. Mohammadi, S. M. Shid Moosavi and G. A. Dehghani. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) activity in blood-brain barrier disruption and edema after acute ischemia/reperfusion in aortic coarctation-induced hypertensive rats. *Iran Biomed J* 2011;15(1-2):22-30.
375. A. M. Youssef, A. Hamidian Jahromi, C. G. Vijay, D. N. Granger and J. S. Alexander. Intra-abdominal hypertension causes reversible blood-brain barrier disruption. *J Trauma Acute Care Surg* 2012;72(1):183-8.

376. R. Vanholder, U. Baurmeister, P. Brunet, *et al.* A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(5):863-70.
377. R. Vanholder, R. De Smet, G. Glorieux, *et al.* Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63(5):1934-43.
378. V. V. Sarnatskaya, W. E. Lindup, T. Niwa, *et al.* Effect of protein-bound uraemic toxins on the thermodynamic characteristics of human albumin. *Biochem Pharmacol* 2002;63(7):1287-96.
379. N. Takamura, T. Maruyama and M. Otagiri. Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clin Chem* 1997;43(12):2274-80.
380. R. Levi and J. Silver. Pathogenesis of parathyroid dysfunction in end-stage kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2005;20(3):342-5.
381. X. Decleves, A. Jacob, S. Yousif, *et al.* Interplay of Drug Metabolizing CYP450 Enzymes and ABC Transporters in the Blood-Brain Barrier. *Curr Drug Metab* 2011.
382. J. Fan, S. Liu, Y. Du, *et al.* Up-regulation of transporters and enzymes by the vitamin D receptor ligands, 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D analogs, in the Caco-2 cell monolayer. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;330(2):389-402.
383. B. L. Urquhart, R. G. Tirona and R. B. Kim. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol* 2007;47(5):566-78.
384. J. Nagai, I. Yano, Y. Hashimoto, M. Takano and K. Inui. Inhibition of PAH transport by parathyroid hormone in OK cells: involvement of protein kinase C pathway. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 2):F674-9.

385. N. A. Wolff, K. Thies, N. Kuhnke, *et al.* Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1-mediated transport through carrier internalization. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(8):1959-68.
386. M. Reyes and L. Z. Benet. Effects of uremic toxins on transport and metabolism of different biopharmaceutics drug disposition classification system xenobiotics. *J Pharm Sci* 2011;26(10):22640.
387. J. J. Carrero, M. I. Yilmaz, B. Lindholm and P. Stenvinkel. Cytokine dysregulation in chronic kidney disease: how can we treat it? *Blood Purif* 2008;26(3):291-9.
388. H. Ando, Y. Nishio, K. Ito, *et al.* Effect of endotoxin on P-glycoprotein-mediated biliary and renal excretion of rhodamine-123 in rats. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(12):3462-7.
389. J. Kalitsky-Szirtes, A. Shayeganpour, D. R. Brocks and M. Piquette-Miller. Suppression of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters in the intestine of endotoxin-treated rats. *Drug Metab Dispos* 2004;32(1):20-7.
390. M. Piquette-Miller, A. Pak, H. Kim, R. Anari and A. Shahzamani. Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation. *Pharm Res* 1998;15(5):706-11.
391. N. J. Cherrington, A. L. Slitt, N. Li and C. D. Klaassen. Lipopolysaccharide-mediated regulation of hepatic transporter mRNA levels in rats. *Drug Metab Dispos* 2004;32(7):734-41.
392. W. Tang, C. Yi, J. Kalitsky and M. Piquette-Miller. Endotoxin downregulates hepatic expression of P-glycoprotein and MRP2 in 2-acetylaminofluorene-treated rats. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;4(2):90-7.

393. G. Hartmann, H. Kim and M. Piquette-Miller. Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. *Int Immunopharmacol* 2001;1(2):189-99.
394. J. H. Wang, D. A. Scollard, S. Teng, R. M. Reilly and M. Piquette-Miller. Detection of P-glycoprotein activity in endotoxemic rats by ^{99m}Tc-sestamibi imaging. *J Nucl Med* 2005;46(9):1537-45.
395. M. von Wedel-Parlow, P. Wolte and H. J. Galla. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 2009;111(1):111-8.
396. G. Hartmann, A. K. Cheung and M. Piquette-Miller. Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303(1):273-81.
397. M. Miyoshi, M. Nadai, A. Nitta, *et al.* Role of tumor necrosis factor- α in down-regulation of hepatic cytochrome P450 and P-glycoprotein by endotoxin. *Eur J Pharmacol* 2005;507(1-3):229-37.
398. E. Siewert, C. G. Dietrich, F. Lammert, *et al.* Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322(1):232-8.
399. B. Poller, J. Drewe, S. Krahenbuhl, J. Huwyler and H. Gutmann. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30(1):63-70.
400. P. T. Ronaldson and R. Bendayan. HIV-1 viral envelope glycoprotein gp120 triggers an inflammatory response in cultured rat astrocytes and regulates the functional expression of P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2006;70(3):1087-98.

401. L. A. Frassetto, H. Sun, Y. Huang and L. Z. Benet. Uremic toxins decrease hepatic clearance but not oral bioavailability of erythromycin in patients with end stage renal disease [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:929A.
402. D. K. Robbins, M. A. Castles, D. J. Pack, V. O. Bhargava and S. J. Weir. Dose proportionality and comparison of single and multiple dose pharmacokinetics of fexofenadine (MDL 16455) and its enantiomers in healthy male volunteers. *Biopharm Drug Dispos* 1998;19(7):455-63.
403. Allegra (fexofenadine hydrochloride). *Physicians Desk Reference* 2003.
404. H. Glaeser, D. G. Bailey, G. K. Dresser, *et al.* Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(3):362-70.
405. J. I. Lee, D. Chaves-Gnecco, J. A. Amico, *et al.* Application of semisimultaneous midazolam administration for hepatic and intestinal cytochrome P450 3A phenotyping. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72(6):718-28.
406. Y. S. Lin, A. L. Dowling, S. D. Quigley, *et al.* Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002;62(1):162-72.
407. T. D. Nolin, K. Appiah, S. A. Kendrick, *et al.* Hemodialysis acutely improves hepatic CYP3A4 metabolic activity. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(9):2363-7.
408. P. B. Watkins. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* 1994;4(4):171-84.
409. L. A. Frassetto, S. Poon, C. Tsourounis, C. Valera and L. Z. Benet. Effects of uptake and efflux transporter inhibition on erythromycin breath test results. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(6):828-32.

410. D. Kurnik, A. J. Wood and G. R. Wilkinson. The erythromycin breath test reflects P-glycoprotein function independently of cytochrome P450 3A activity. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80(3):228-34.
411. A. M. Taburet, I. Vincent, L. Perello, *et al.* Impairment of drug biotransformation in renal disease an in vitro model. *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1996;59(2):136.
412. S. Matsushima, K. Maeda, N. Ishiguro, T. Igarashi and Y. Sugiyama. Investigation of the inhibitory effects of various drugs on the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug Metab Dispos* 2008;36(4):663-9.
413. C. Tannergren, N. Petri, L. Knutson, *et al.* Multiple transport mechanisms involved in the intestinal absorption and first-pass extraction of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74(5):423-36.
414. H. Tahara, H. Kusuhara, E. Fuse and Y. Sugiyama. P-glycoprotein plays a major role in the efflux of fexofenadine in the small intestine and blood-brain barrier, but only a limited role in its biliary excretion. *Drug Metab Dispos* 2005;33(7):963-8.
415. H. Sun, L. A. Frassetto, Y. Huang and L. Z. Benet. Hepatic clearance, but not gut availability, of erythromycin is altered in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87(4):465-72.
416. S. Y. Yi, K. S. Hong, H. S. Lim, *et al.* A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(5):418-27.
417. M. Niemi, K. T. Kivisto, U. Hofmann, *et al.* Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SLCO1B1 gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol* 2005;59(5):602-4.

418. M. D. Floyd, G. Gervasini, A. L. Masica, *et al.* Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 2003;13(10):595-606.
419. E. D. Kharasch, A. Walker, N. Isoherranen, *et al.* Influence of CYP3A5 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the cytochrome P4503A probes alfentanil and midazolam. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82(4):410-26.
420. C. Wandel, J. S. Witte, J. M. Hall, *et al.* CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68(1):82-91.