

Université de Montréal

**Effet du sérum urémique humain sur le
cytochrome P450 hépatique**

Par

Pierre Dubé, md, FRCSC, FACS

Programme de sciences biomédicales 2^{ième} et 3^{ième} cycle

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Science (M.Sc.)

En sciences biomédicales

Mars 2005

© Pierre Dubé, 2005



W

4

U58

2005

v. 141

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire, intitulé :

Effet du sérum urémique humain sur le
cytochrome P450 hépatique

Présenté par :

Pierre Dubé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Pierre Villeneuve, président-rapporteur

Vincent Pichette, directeur de recherche

Serge Dubé, membre du jury

RÉSUMÉ

Chez l'humain, l'insuffisance rénale chronique (IRC) est associée à une diminution du métabolisme hépatique des médicaments, particulièrement ceux qui sont sous la dépendance du cytochrome P450. Les mécanismes responsables de ces modifications sont mal connus. Le but de ce travail est d'évaluer les effets du sérum provenant de patients avec IRC sur le cytochrome P450 hépatique.

Des hépatocytes de rats ont été incubés pendant 24 heures dans une solution d'incubation contenant du sérum provenant de sujets humains avec IRC sévère, afin de mesurer: le cytochrome P450 total, l'expression protéique et l'ARN messager codant pour certaines isoformes et l'activité métabolique des isoformes 3A et 1A. D'autres expériences ont été faites avec du sérum provenant de patients IRC sous dialyse et après transplantation rénale.

Dans les hépatocytes incubés pendant 24 heures dans une solution d'incubation contenant du sérum provenant de sujets humains avec IRC, nous avons observé une diminution de plus de 45% du cytochrome P450 total, de l'expression protéique et des niveaux d'ARN messager codant pour différentes isoformes du cytochrome P450. Le niveau de l'isoforme 2E1 n'a pas été modifié. De plus, l'activité métabolique de certaines isoformes a aussi diminué. L'effet inhibiteur du sérum obtenu chez des sujets humains IRC sous dialyse chronique était similaire après 1 et 6 mois de dialyse, mais il était perdu après une transplantation rénale réussie.

Le sérum humain provenant de patients avec IRC sévères contient des médiateurs qui inhibent l'activité et l'expression du cytochrome P450 hépatique par réduction de l'expression génique. Cet effet persiste après l'amorce d'une dialyse chronique, mais il disparaît après une transplantation rénale réussie.

Mots clefs : Insuffisance rénale chronique, dialyse, humain, cytochrome P450, expression génique, métabolisme des médicaments, médiateurs sériques

ABSTRACT

In human, chronic renal failure (CRF) is associated with decreased hepatic drug metabolism, particularly that mediated by the cytochrome P450. The mechanisms remain poorly understood. The present study aimed to investigate the effects of the serum of patients with CRF on liver P450.

Rat hepatocytes were incubated for 24 hours with serum from patients with severe CRF and from controls to measure: P450 level, protein expression and mRNA levels of P450 isoforms, and metabolic activities of CYP3A and CYP1A. Similar experiments were done with the serum of patients once on chronic hemodialysis and after kidney transplantation.

In hepatocytes incubated for 24 hours with serum from patients with CRF, P450 level and protein expression as well as mRNA levels of P450 isoforms were decreased by more than 45%, while the levels CYP2E1 were not modified. Some isoforms activities were decreased. The inhibitory effect of serum obtained from patients before first dialysis was similar after 1 and 6 months on chronic hemodialysis but was lost after successful kidney transplantation.

Human uremic serum contains mediator(s) that decreases hepatic P450 activity and expression secondary to reduced gene expression. The inhibitory effect of serum persists even after initiation of dialysis, but disappears after normalisation of renal function following kidney transplantation.

Key words: Chronic renal failure, dialysis, human, cytochrome P450, gene expression, drug metabolism, hepatocytes, serum mediator(s)

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS	xiv
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE I - INTRODUCTION	1
1.1 Le métabolisme des médicaments.....	1
1.1.1 Introduction.....	1
1.1.2 Elimination	2
1.1.3 Excrétion.....	3
1.1.4 Biotransformation.....	4
1.1.5 Réactions de phase I.....	5
1.1.6 Réactions de phase II.....	5
1.1.7 Relations entre les voies d'élimination.....	6
1.1.8 P-glycoprotéines.....	6
1.2 Le cytochrome P450.....	7
1.2.1 Définition et structure du CYP450.....	7
1.2.2 Rôles du CYP450.....	8

1.2.3	Mécanismes d'action du CYP450.....	9
1.2.4	Induction du CYP450.....	10
1.2.5	Inhibition du CYP450.....	11
1.2.6	Isoformes du CYP450 étudiés.....	15
1.2.6.1	P450 1A.....	15
1.2.6.2	P450 2C.....	15
1.2.6.3	P450 2D.....	16
1.2.6.4	P450 2E.....	16
1.2.6.5	P450 3A.....	16
1.2.6.7	P450 4A.....	17
1.2.7	Corrélation entre les isoformes retrouvés chez l'humain et chez le rat.....	17
1.3	L'insuffisance rénale chronique (IRC).....	17
1.3.1	Le rein.....	17
1.3.2	Définition de l'IRC.....	18
1.3.3	Les toxines urémiques.....	22
1.3.4	Effets systémiques du syndrome urémique.....	23
1.3.5	Effets de l'IRC sur la parathormone.....	23
1.3.6	Hyperparathyroïdie (secondaire et) tertiaire.....	24
1.3.7	Effets de l'IRC sur l'inflammation.....	25
1.4	Effets de l'IRC sur le métabolisme des médicaments.....	25
1.4.1	Introduction.....	25
1.4.2	Études faites chez l'humain.....	26
1.4.3	Études faites chez l'animal.....	26
1.4.3.1	Études <i>in vitro</i>	27
1.4.3.2	Études <i>in vivo</i>	27
1.4.4	Effets de l'IRC sur le CYP450 intestinal.....	28
1.4.5	Facteur(s) circulant(s).....	28
1.5	Hypothèse.....	29
1.5.1	Prémisses.....	29

1.5.2	Postulat.....	30
1.6	Objectifs de l'étude.....	30
1.6.1	Objectif principal.....	30
1.6.2	Objectifs secondaires.....	30
CHAPITRE II - MATÉRIEL & MÉTHODES.....		32
2.1	Protocole expérimental.....	32
2.2	Sujets humains avec IRC sévère.....	33
2.3	Sujets humains sans IRC (Témoins).....	38
2.4	Préparation du sérum provenant des sujets humains avec IRC et sans IRC (Témoins)	38
2.5	Modèle animal expérimental.....	38
2.6	Isolation des hépatocytes de rats.....	38
2.7	Culture cellulaire des hépatocytes.....	39
2.8	Préparation des microsomes provenant des hépatocytes.....	40
2.9	Détermination de l'activité du P450 provenant des microsomes.....	41
2.10	Immunobuvardage de type « Western.....	41
2.11	Isolation de l'ARN messenger et analyse RT-PCR quantitative.....	45
2.12	Activité métabolique <i>in vitro</i> du cytochrome P450 hépatique.....	47
2.13	Biochimie sanguine et urinaire.....	47
2.14	Fractionnement des protéines du sérum.....	48
2.15	Courbes doses-réponses.....	49
2.16	Effets de l'hémodialyse chronique sur les facteurs inhibiteurs.....	49
2.17	Effets de la greffe rénale sur les facteurs inhibiteurs.....	50
2.18	Analyse statistique.....	50

2.19	Drogues et produits chimiques.....	50
CHAPITRE III – RÉSULTATS.....		52
3.1	Dosage du cytochrome P450 total dans des hépatocytes de rats incubés pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)	52
3.2	Expression de différentes isoformes du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins).....	52
3.3	Analyse de l'ARN messenger codant pour certaines isoformes du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins).....	54
3.4	Métabolisme <i>in vitro</i> de l'érythromycin et mesure du métabolisme et de l'activité de la 7-éthosyrésorufin o-dééthylase (EROD) dans des hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)	56
3.5	Influence de la composition biochimique du sérum sur le taux d'expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)	59
3.6	Détermination du poids moléculaire du ou des facteurs influençant l'expression du cytochrome P450 dans des hépatocytes	

	de rats normaux incubés pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins).....	59
3.7	Effets de la concentration du sérum dans le milieu d'incubation sur l'expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés pendant 24 heures dans un milieu d'incubation contenant des concentrations variables de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins).....	63
3.8	Effets de l'hémodialyse chronique sur les facteurs sériques inhibiteurs du cytochrome P450 hépatique provenant du sérum de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins).....	63
3.9	Effets de la transplantation rénale sur les facteurs sériques inhibiteurs du cytochrome P450 hépatique provenant du sérum de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins).....	66
	CHAPITRE IV – DISCUSSION.....	68
	CHAPITRE V – CONCLUSION.....	73
	CHAPITRE V – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	
Propriétés des isoformes des familles 1, 2, 3 et 4 du cytochrome P450 chez l'humain	13
Tableau II	
Principales causes de l'insuffisance rénale chronique.....	20
Tableau III	
Manifestations du syndrome urémique.....	21
Tableau IV	
Caractéristiques des sujets humains avec IRC donneurs de sérum.....	36
Tableau V	
Caractéristiques des sujets humains avec IRC donneurs de sérum et qui ont subi une transplantation rénale.....	37
Tableau VI	
Isoformes du cytochrome P450 étudiées.....	44
Tableau VII	
Séquences des amorces de PCR.....	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1

Expression de différentes isoformes du cytochrome P450, de l'AST et de la GAPDH dans des hépatocytes de rats normaux après incubation dans un milieu constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC comparé à des témoins incubés dans un milieu constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains sans IRC..... 53

Figure 2

Expression de l'ARN messager codant pour les différents isoformes du cytochrome P450 et de la GAPDH dans des hépatocytes normaux de rats après incubation dans du sérum constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC comparés à des témoins incubés dans du sérum constitué de sérum provenant de sujets humains sans IRC..... 55

Figure 3

Activité *in vitro* de la N-déméthylation de l'érythromycine dans des microsomes préparés à partir d'hépatocytes de rats normaux préalablement incubés 24 heures dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC comparés à des témoins incubés dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains sans IRC..... 57

Figure 4

Activité *in vitro* de la dééthylation de la 7-éthosyrésorufin O-dééthylase dans des microsomes préparés à partir d'hépatocytes de rats normaux préalablement incubés 24 heures dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC comparés à des témoins incubés dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains sans IRC..... 58

Figure 5

Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 en fonction
de la créatinine sérique.....61

Figure 6

Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 en fonction
du dosage sérique de la parathormone..... 61

Figure 7

Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 en fonction des différentes
sous-fractions sériques provenant de sujets humains obtenues par HPLC et
dans lesquelles les hépatocytes de rats normaux ont été incubés.....62

Figure 8

Effet de différentes concentrations du sérum provenant de sujets humains avec IRC
dans le milieu d'incubation des hépatocytes de rats normaux sur l'expression
du l'isoforme 3A2 comparés à des témoins incubés dans un milieu de culture
constitué de différentes concentrations équivalentes de sérum provenant de sujets
humains sans IRC.....64

Figure 9

Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats
normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de sujets
humains avec IRC avant la première session de dialyse et après un mois de dialyse
comparés à un groupe témoin.....65

Figure 10

Expression des isoformes 2D et 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de sujets humains avec IRC avant la première session de dialyse et durant le deuxième mois après une transplantation rénale réussie comparés à un groupe témoin.....67

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AST	Aspartate amino S-transférase
°C	Degré celcius
CYP450	Cytochrome P450
CYP1A2 ou 1A2	Isoforme 1A2 du CYP450
CYP2C6 ou 2C6	Isoforme 2C6 du CYP450
CYP2C11 ou 2C11	Isoforme 2C11 du CYP450
CYP2D ou 2D	Isoforme 2D du CYP450
CYP2E1 ou 2E1	Isoforme 2E1 du CYP450
CYP3A2 ou 3A2	Isoforme 3A2 du CYP450
CYP4A ou 4A	Isoforme 4A du CYP450
CYP450	Cytochrome P450
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
EROD	7-éthoxyrésorufin O-dééthylase
g	Force gravitationnelle (m/s ²)
GADPH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GN	Glomérulonéphrite
GSFS	Glomérulosclérose focale segmentaire
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IRC	Insuffisance rénale chronique
j	Jour
kD	Kilodalton
kg	Kilogramme

M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute
mM	Millimolaire
μ M	Micromolaire
MDR	« Multi drug resistance »
nm	Nanomètre
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
p.	Page numéro...
PCR	« Polymerase chain reaction »
P-gp	P-glycoprotéine
PBS	Solution saline tamponée au phosphate
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfone
PN	Pyélonéphrite
PTH	Parathormone
RPK	Rein polykystique
RT-PCR	« Reverse transcriptase polymerase chain reaction »
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SU	Syndrôme urémique
TFG	Taux de filtration glomérulaire
TU	Toxines urémiques

REMERCIEMENTS

À Vincent Pichette pour son support, sa patience et son imagination.

À François Leblond pour son support, sa grande méthodologie et ses judicieux conseils ainsi qu'aux membres du labo 15 qui ont rendu ce travail possible.

À mes collègues cliniciens, Yves Leclerc, Lucas Sidéris et Guy Leblanc, qui ont assurés mes tâches cliniques lors de mes nombreuses absences.

À mes chefs de de Départements hospitalier et universitaire, Serge Dubé et Gilles Beauchamps, pour leurs encouragements à poursuivre cette démarche.

A Jacinthe Lasalle, pour avoir révisé ce manuscrit.

Ce travail a été supporté par les Instituts de Recherche en Santé du Canada. Vincent Pichette est titulaire d'une subvention du Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

CHAPITRE I - INTRODUCTION

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est responsable de nombreuses répercussions chez les individus qui en souffrent. Outre l'accumulation de substances toxiques et des désordres hydroélectrolytiques, les patients souffrants d'IRC sont aux prises avec de nombreuses interactions médicamenteuses et des toxicités graves peuvent apparaître.

Au cœur de la biotransformation de nombreux médicaments administrés chez les patients IRC, il y a le cytochrome P450 (CYP450), une enzyme clef. Le propos de ce travail est d'étudier les modifications observées du CYP450 en présence d'IRC.

Avant d'exposer l'hypothèse, il est pertinent de revoir brièvement :

- Le métabolisme des médicaments, en insistant particulièrement sur la biotransformation de ceux-ci (Section 1.1),
- Le CYP450, car il est au centre des interactions médicamenteuses observées chez les patients IRC (Section 1.2),
- L'IRC (Section 1.3) et,
- L'effet de l'IRC sur le métabolisme des médicaments (Section 1.4).

1.1 *LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS*

1.1.1 Introduction

Pour être actif, un médicament passera à travers différentes étapes que l'on peut regrouper en 3 phases:

- Biopharmaceutique,
- Pharmacocinétique et,
- Pharmacodynamique.

La phase biopharmaceutique est la phase où le principe actif d'un médicament sera mis à la disposition de l'organisme. Lors de l'administration orale d'un médicament, celui-

ci doit se désintégrer puis se dissoudre pour qu'il puisse être ensuite absorbé par l'organisme.

La phase pharmacocinétique va depuis l'absorption d'un médicament dans l'organisme jusqu'à sa distribution puis à son élimination de l'organisme comme principe actif ou inactif. Le médicament se distribuera dans l'organisme en se liant plus ou moins aux protéines plasmatiques et diffusera dans certains tissus, de façon spécifique ou non, en fonction des caractéristiques physico-chimiques de la molécule. L'élimination du médicament se fera, quant à elle, soit en le transformant en un métabolite inactif, soit en l'excrétant inchangé, ou soit les 2 mécanismes à la fois.

La phase pharmacodynamique est la dernière phase. C'est à ce moment qu'un principe actif produit son effet. Cet effet est le produit de la rencontre du principe actif avec un récepteur cellulaire, une enzyme ou une structure cellulaire quelconque.

Pour les besoins de ce travail, nous reverrons sommairement certains événements se produisant durant la phase pharmacocinétique, c'est-à-dire après l'administration d'un médicament. Nous insisterons surtout sur les mécanismes d'élimination des médicaments, et plus particulièrement sur le rôle du CYP450 dans la biotransformation des médicaments. L'absorption ne sera pas étudiée, mais une brève description de la P-glycoprotéine (P-gp) est nécessaire car on ne peut pas traiter le CYP450 indépendamment de la P-gp lorsqu'il s'agit de cinétique des médicaments, les deux étant intimement reliés.

1.1.2 Elimination

Tout médicament administré chez un sujet sain sera éliminé plus ou moins rapidement. Celui-ci sera éliminé sous forme inchangée, ou après biotransformation, ou les 2 à la fois. La demi-vie d'élimination variera en fonction des caractéristiques physico-chimiques du produit administré (liaison aux protéines plasmatiques, liposolubilité, poids moléculaire, etc).

La clairance exprime l'élimination d'une substance en tenant compte de tous les paramètres impliqués dans l'élimination de cette substance. La clairance systémique d'un médicament est donc égale à la somme de la clairance rénale et de la clairance non-rénale². Cette dernière inclut la clairance hépatique mais aussi la clairance d'autres organes tels que l'intestin et le poumon. La clairance englobe le fait qu'un médicament soit éliminé sous forme inchangée ou après biotransformation.

Lors de l'administration chronique d'un médicament, l'état d'équilibre (« steady state ») est atteint lorsque l'administration d'un médicament à un rythme constant, permet de maintenir les niveaux sériques de ce dernier à l'intérieur d'une fenêtre thérapeutique. Si l'équilibre est rompu, si la clairance systémique est altérée, les niveaux sériques risquent de dépasser la fenêtre thérapeutique. Si l'index thérapeutique est faible, c'est-à-dire que la marge de sécurité entre le niveau thérapeutique et le seuil toxique est minimale, des effets secondaires, voire toxiques, risquent d'apparaître rapidement^{3,4}.

1.1.3 Excrétion

L'excrétion d'un médicament peut se faire soit sous forme inchangée ou soit sous forme de métabolites après biotransformation. L'excrétion se fera surtout par les reins mais elle peut également se faire par toutes les voies d'élimination des liquides de l'organisme ou par les poumons. Ces voies d'excrétions doivent être considérées comme un tout².

Au niveau du rein, l'excrétion des petites molécules hydrosolubles se fera en grande partie par filtration glomérulaire¹. De plus, quelques médicaments (ou des métabolites) seront excrétés dans l'urine par sécrétion tubulaire, grâce à des mécanismes de transport actif. Il s'agit d'une voie saturable. Plus loin, dans le tubule distal et dans le tube collecteur, certaines substances, sous leur forme non-ionisée, pourront être réabsorbées.

Au niveau du foie, le principe actif peut être excrété dans la bile pour se retrouver dans la lumière intestinale. De là, il pourra être absorbé dans la circulation portale, retourné

au foie, ré-excrété dans la bile et ainsi de suite. C'est le cycle entéro-hépatique¹. Ce qui échappe à ce cycle se retrouvera dans les selles. Les substances qui n'auront pas été hydrolysées par les enzymes bactériennes échapperont au cycle entérohépatique, car elles ne peuvent pas être réabsorbées par l'intestin. L'excrétion biliaire d'un médicament (inchangé ou biotransformé) se fait par transport actif du sang vers la bile. Les acides gras organiques, les bases organiques et les substances organiques neutres pourront être sécrétés dans la bile via des transporteurs qui sont propres à ces 3 familles de substances. Il s'agit de mécanismes de transport saturables pouvant aussi être inhibés dans différentes conditions¹.

1.1.4 Biotransformation

La biotransformation d'un médicament est une voie d'élimination irréversible. Généralement, la biotransformation permettra de transformer le principe actif d'un médicament en un métabolite inactif, peu ou pas toxique, plus polaire, et donc plus soluble dans l'eau. Ces caractéristiques permettront aux métabolites produits d'être éliminés plus rapidement de l'organisme via les voies d'excrétions¹. Il s'agit de la voie d'élimination de la plupart des médicaments administrés en clinique.

Dans certains cas, la biotransformation permettra d'activer un pro-médicament en un produit actif qui pourra produire son effet. C'est le cas, par exemple, du cyclophosphamide, du sulindac et de certains agents cancérigènes comme les amines hétérocycliques^{1, 5}. Dans d'autres circonstances, la biotransformation permettra de potentialiser l'action d'un produit. C'est le cas de l'acide acétylsalicylique ou de la codéine par exemple¹.

Les réactions de biotransformations peuvent être divisées en quatre catégories, selon leur nature chimique¹ : Oxydation, réduction, hydrolyse et conjugaison (ou synthèse).

Les trois premières catégories de réactions sont définies comme des réactions de phase I, tandis que les réactions de conjugaison ou de synthèse correspondent à des réactions de phase II^{6, 7}.

Une ou une combinaison de différentes réactions de biotransformation peuvent être responsables de l'élimination d'un médicament. Les produits de la phase I peuvent être conjugués par des réactions de phase II, augmentant ainsi leur solubilité dans l'eau et facilitant leur excrétion. Les réactions de conjugaison sont généralement associées aux réactions de détoxification. Cependant, la bioactivation de certains substrats par la conjugaison peut conduire à des effets toxiques ou carcinogènes⁸⁻¹⁰.

1.1.5 Réactions de phase I

Les réactions de phase I sont principalement l'hydrolyse, la réduction et l'oxydation des médicaments¹. Ces réactions incorporent un groupement polaire fonctionnel tel un amino, un carboxyl ou un groupement sulfhydryl sur le substrat afin d'en augmenter son hydrophilicité. Ainsi hydrophilisé, le substrat pourra être excrété ou engagé dans la phase II du métabolisme^{1, 11}.

Le CYP450 est responsable de l'oxydation métabolique¹², il est donc au centre de la majorité des réactions de la phase I.

1.1.6 Réactions de phase II

Les réactions de conjugaison de la phase II incluent la glucuronidation, la conjugaison au sulfate, la conjugaison au glutathion, l'acétylation et la méthylation. Chez l'humain, la glucuronidation est la voie de conjugaison la plus importante¹³. L'enzyme responsable de la réaction de glucuronidation est la glucuronyltransférase. On la retrouve dans la fraction microsomiale du cytosol. Le cofacteur de la glucuronidation est l'acide uridine diphosphate glucuronique. La conjugaison au sulfate se fait sous l'action d'une transférase cytosolique en présence de 3'-phosphoadénosine et de 5-phosphosulfate. La conjugaison au glutathion se fait aussi sous l'action d'une transférase, en présence de glutathion comme cofacteur. Finalement, l'acétylation se fait sous l'action de la N-acétyltransférase, en présence de l'acétylcoenzyme A¹.

Les enzymes responsables de la conjugaison (phase II) se retrouvent dans le cytosol des cellules du foie, de l'intestin, des reins, des poumons, de la prostate, du cerveau, de la peau et de la rate¹.

1.1.7 Relations entre les voies d'élimination

Les médicaments sont métabolisés et éliminés principalement par le foie, le rein et l'intestin^{14, 15}. La communauté médicale a longtemps pensé que le métabolisme hépatique des médicaments n'était pas modifié par l'IRC¹⁶. Ainsi, pour les substances à élimination hépatique, on ne recommandait pas d'ajustement de doses en présence d'IRC.

Ce concept erroné a conduit à de nombreuses intoxications médicamenteuses¹⁷. D'ailleurs, cette approche clinique n'est supportée par aucune étude clinique¹⁸. En fait, les voies d'éliminations des médicaments ne sont pas isolées. Elles devraient plutôt être considérées comme un tout, intimement reliées¹⁸.

1.1.8 P-glycoprotéines

Les p-glycoprotéines (P-gp) sont une famille de transporteurs membranaires de 170 kD au cœur du transport membranaire des médicaments¹⁹. Elles sont le produit des gènes MDR (« Multidrug resistance »)²⁰. La P-gp agit comme une pompe membranaire énergie-dépendante que l'on retrouve du côté apical des cellules souvent exposées aux xénobiotiques. Elle sert à exporter ces substances à l'extérieur de la cellule²¹.

On retrouve la P-gp en grande quantité dans les entérocytes du grêle et du côlon²², dans les cellules bordant les canalicules biliaires et dans les tubules proximaux du rein²³. Cette distribution luminale des P-gp suggère que ces pompes agissent à titre de « détoxificateurs » de la cellule, en transportant les xénobiotiques depuis la cellule vers la lumière des organes concernés, permettant leur élimination dans les selles, la bile et l'urine²⁴.

Comme le CYP450, la P-gp est vulnérable à l'induction (augmentation de l'expression) et à l'inhibition (diminution de l'expression), la rendant ainsi facilement modulable²⁵. Outre les altérations innées de l'expression de la P-gp, les mécanismes responsables de la modulation de la P-gp sont nombreux. Certains composés peuvent agir directement sur la molécule pour l'activer en se liant au site liant l'ATP, au site liant les stéroïdes ou en se liant au site du substrat. D'autres substances peuvent augmenter l'expression de la P-gp, en activant le récepteur nucléaire pré-gène X, responsable de l'activation du MDR²⁶. Par des mécanismes similaires, certaines substances peuvent, par contre, inhiber l'expression de la P-gp et créer l'effet inverse²⁶. Ces modifications dans l'expression de la P-gp peuvent jouer un rôle important dans la biodisponibilité de certaines substances et modifier substantiellement la cinétique des xénobiotiques²⁷.

De nombreux xénobiotiques peuvent agir sur l'expression et l'activité de la P-gp, en l'induisant ou en l'inhibant. Par exemple, la dexaméthasone, les antracycliques, la cyclosporine et la rifampine peuvent induire la P-gp. Par contre, le vérapamil, l'érythromycine, le kétoconazole et le tamoxifen peuvent inhiber la P-gp^{25,26}.

Dans les maladies aiguës, il est possible que la P-gp soit modulable, mais cette association n'est pas claire. Cependant, dans certaines maladies chroniques, on commence à comprendre que la P-gp puisse être modulée à la hausse ou à la baisse²⁵. C'est le cas de l'IRC qui semble avoir des répercussions sur les niveaux d'expression et d'activité de la P-gp. En effet, l'IRC inhibe l'activité de la P-gp²⁸.

1.2 *LE CYTOCHROME P450*¹²

1.2.1 Définition et structure du CYP450

Le cytochrome P450 est une famille d'isoenzyme. Ces isoenzymes, ou isoformes, ont le même mécanisme d'action catalytique et sont responsables des réactions d'oxydation de la phase I de la biotransformation des xénobiotiques. Cependant, les isoformes diffèrent entre elles, de par la nature de leur substrat et par leur séquence d'acides aminés. Il

s'agit de protéines décrites pour la première fois en 1958²⁹. Depuis, de nombreuses isoformes ont été purifiées chez l'humain et chez les principaux mammifères.

Les différentes isoformes du CYP450 contiennent toutes un groupement hème. Lorsque ce groupement hème est lié au monoxyde de carbone et réduit, ce pigment absorbe la lumière à 450 nm, d'où le nom CYP450^{30, 31}.

Une famille d'isoformes du CYP450 est constituée de protéines ayant au moins 40% ou plus d'homologie dans la séquence protéique. Par conséquent, si 2 molécules ont moins de 40% d'homologie, elles feront partie de 2 familles d'isoformes différentes. Chaque famille d'isoformes est désignée par un chiffre arabe. Chez l'humain, on dénombre 19 familles d'isoformes du CYP450. De celles-ci, seules les familles 1, 2, 3 et 4 sont impliquées activement dans la biotransformation des médicaments³².

Chaque famille d'isoformes est divisée en sous-familles. Ces dernières sont désignées par des lettres alphabétiques et regroupent des protéines ayant un degré d'homologie variant entre 40 et 55%. Finalement, à l'intérieur même de ces sous-familles, une subdivision est encore faite en fonction du degré d'homologie. Si plus de 55% d'homologie existe entre 2 cytochromes, ils seront classés ensemble et un chiffre arabe servira à compléter la nomenclature. Par exemple, un CYP450 de la famille 1 et sous-famille « A » sera nommé CYP1A1 ou CYP1A2 en fonction de ses caractéristiques et ils seront considérés comme 2 protéines différentes.

On retrouve le CYP450 dans plusieurs tissus de tous les mammifères. Dans les cellules, on en retrouve de grandes concentrations dans le réticulum endoplasmique et la membrane interne des mitochondries³³. Le foie et la surrénale sont riches en CYP450, mais on en retrouve aussi en quantité significative dans les entérocytes³⁴.

1.2.2 Rôles du CYP450

Le CYP450 (essentiellement les familles 1 à 4) joue un rôle essentiel dans le métabolisme de nombreux composés endogènes et exogènes (xénobiotiques)^{34, 35}. Le

CYP450 est une enzyme clef dans le métabolisme oxydatif microsomial de nombreuses substances endogènes (ex : stéroïdes) et des xénobiotiques³⁶. Parmi ces xénobiotiques, on retrouve des médicaments, des carcinogènes, des pesticides, des vitamines liposolubles et des éicosanoïdes³². Ce sont les enzymes clef de la phase I du métabolisme des médicaments.

1.2.3 Mécanismes d'action du CYP450

Le cytochrome P450 agira en catalysant la première étape de la biotransformation de substrats lipophiles (phase I) pour en faire des dérivés plus hydrophiles. Le but de cette transformation est donc de faciliter l'excrétion des substrats transformés. Cette excrétion se fera principalement dans la bile. Pour assurer sa fonction, le cytochrome P450 peut incorporer un ou 2 atomes d'oxygène, à partir d'une molécule d'O₂, dans une grande variété de substrats. Ceci entraînera une réduction de l'autre atome d'oxygène par 2 électrons, pour produire de l'eau. Les étapes essentielles du cycle catalytique du CYP450 sont les suivantes¹² :

- 1e. Liaison au substrat,
- 2e. Réduction ferrique laissant le CYP450 à l'état ferreux,
- 3e. Liaison à l'oxygène moléculaire pour donner un complexe ferreux CYP450-dioxygène,
- 4e. Transfert du second électron à ce complexe, pour former un complexe peroxyiron (III),
- 5e. Protonation et clivage du lien O-O avec l'incorporation de l'atome d'oxygène distal dans une molécule d'eau,
- 6e. Formation de l'espèce fer-oxo réactive,
- 7e. Transfert de l'atome d'oxygène depuis ce complexe oxo, au substrat lié et,
- 8e. Dissociation du produit.

La NADPH agit à titre de cofacteur et l'oxygène provient de l'oxygène atmosphérique. L'équation suivante résume cette réaction d'oxydation :



1.2.4 Induction du CYP450

Le niveau d'expression du CYP450 total varie d'un individu à l'autre. On remarque de grandes variations inter-individuelles en ce qui a trait au niveau et à l'expression de différentes isoformes³⁷. Ces variations peuvent s'exprimer autant par un niveau cellulaire différent d'une isoforme en question que par une activité métabolique différente. Ces 2 phénomènes peuvent avoir des répercussions sur l'homéostasie de l'hôte³⁸. Des variations inter-individuelles de 3 fois le niveau d'expression, ou de l'activité, de certaines isoformes sont possibles³⁹. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces variations. Par exemple, la consommation de pamplemousse peut à elle seule faire varier le CYP450 chez un individu.

L'induction du CYP450 a d'abord été reconnue à cause de nombreuses altérations observées dans le métabolisme des médicaments. Ces altérations étaient observées lors de l'administration synchrone de plusieurs médicaments. En effet, il fut observé chez le rat, que l'administration chronique de barbituriques conduisait à une tolérance au médicament. Cette tolérance était secondaire à une induction du CYP450, responsable du métabolisme des barbituriques, illustrant du coup que les substrats sont souvent des inducteurs des CYP450⁴⁰. Ayant observé qu'une induction du CYP450 chez le rat conduisait à une diminution de l'incidence des cancers, certains auteurs ont conclu que l'induction du CYP450 était un mécanisme de protection en permettant à la cellule de détoxifier un environnement potentiellement hostile⁴¹.

Cependant, si une isoforme du CYP450 est impliquée dans le métabolisme de plusieurs substrats, des effets délétères de l'induction du CYP450 peuvent être observés. C'est le cas lors de l'administration concomitante de médicaments, lorsque ces derniers emploient les mêmes voies métaboliques. Il est alors possible de perdre l'efficacité d'un des médicaments administrés, si l'index thérapeutique est faible⁴².

L'induction du CYP450 se fait habituellement par une augmentation de l'expression génique. Cette augmentation se fait de façon similaire à l'induction des hormones stéroïdiennes⁴³.

De nombreux inducteurs des cytochromes P450 sont maintenant identifiés. Certains médicaments ou certains aliments peuvent induire le CYP450^{44, 45}. Le tabagisme et la prise d'alcool sont aussi incriminés. Le tableau I montre les principaux modulateurs des isoformes 1, 2, 3 et 4.

1.2.5 Inhibition du CYP450

Dans certaines circonstances, on pourra observer une réduction de l'expression ou de l'activité de certaines isoformes du CYP450. Ces variations peuvent conduire à la survenue d'effets secondaires toxiques liés à la prise de médicaments⁴⁵. Dans d'autres circonstances, ces variations peuvent, à l'inverse, conduire à l'inefficacité de certains traitements, nécessitant une activation via le CYP450 pour les rendre efficaces⁴⁶.

L'inhibition du CYP450 peut se faire via divers mécanismes⁴⁷. D'abord, par une diminution de l'expression génique. Cette dernière peut être innée ou acquise. Des désordres innés du code génétique, allant de l'instabilité génétique à l'inhibition de certains gènes, en passant par un certain polymorphisme génétique, peuvent inhiber la production de certaines isoformes du CYP450⁴⁸. De plus, l'expression de gènes codants pour différentes isoformes du CYP450 peut être altérée dans certaines circonstances ou en présence de certaines maladies. Par exemple, chez le rat avec IRC, nous avons démontré que l'expression de l'ARN messager codant pour certaines isoformes du CYP450 était diminuée dans le foie et dans l'intestin⁴⁹⁻⁵¹. De plus, en cas d'inflammation, le CYP450 est inhibé par les cytokines pro-inflammatoires et l'oxyde nitrique⁵².

L'inhibition du CYP450 peut aussi se faire par inhibition du cycle catalytique du CYP450. Les 3 étapes étant particulièrement vulnérables à l'inhibition sont : la liaison

au substrat, la liaison à la molécule d'oxygène subséquente au premier transfert d'électron et l'étape catalytique consistant en l'oxydation du substrat⁵³.

Les inhibiteurs du CYP450 peuvent être classés en 3 catégories : les agents inhibiteurs se liant de façon réversible, les agents formant des liens quasi irréversibles avec le hème de l'atome de fer et les agents se liant de façon irréversible soit à la protéine, soit au groupement hème ou en accélérant la dégradation du groupement hème. Les agents qui agissent tôt dans le cycle (avant l'oxydation) sont en général réversibles, sinon, ils sont quasi ou complètement irréversibles⁵³. Certains médicaments et aliments peuvent inhiber le CYP450. Des dérivés de la psoralène ou de la bergaptène, des extraits de végétaux utilisés dans le traitement de certaines affections cutanées, peuvent inhiber le CYP450⁵⁴. La Tableau I montre les principaux inhibiteurs des isoformes 1, 2, 3 et 4.

Tableau I Propriétés des isoformes des familles 1, 2, 3 et 4 du cytochrome P450 chez l'humain

Isoforme	Substrats	Inducteurs	Inhibiteurs
CYP1A	Amitriptyline Caféine Clomipramine Clozapine Cyclobenzaprine Diéthylstilbestrol Estradiol Halopéridole Imipramine Lidocaïne Ondansétron Phénacétine Propranolol Ropivacaine Théophylline Verapamil	Brocoli Choux de Bruxelles Hydrocarbures aromatiques Insuline Modafinile Nafciline Oméprazole Tabagisme Viande cuite sur le charbon	Amiodarone 7,8-Benzoflavone Cimétidine Fluoroquinolones Furafylline Mibefradil
CYP2C	Amitrytiline Anti-inflammatoires non-stéroïdiens Cyclophosphamide Diazépam Hypoglycémiant oraux Indométacine Inhibiteurs de la pompe à proton Paclitaxel Phénytoine Progestérone Propranolol Tamoxifen Tolbutamide	Carbamazépine Dexaméthasone Phénobarbital Rifampicine	Amiodarone Chloramphénicol Cimétidine Glitazone Indométacin Kétoconazole Lanzoprazole Modafinil Oméprazole Probénécide Quercetin Sulfaphénazole Ticlopidine Topiramate Triméthoprim

CYP2D	Amphétamines Antiarythmiques Antidépresseurs Antipsychotiques Débrisoquine Dextrométhorphan Lidocaïne Spartéine Stupéfiants Timolol	Dexaméthasone Rifampicine	Amiodarone Célécoxib Chlorpromazine Chlorphénidramine Cimétidine Clomipramine Cocaïne Doxorubicin Fluoxétine Métoclopramide Méthadone Quinidine Paroxétine Ranitidine
CYP2E	Acétaminophène Benzènes Enflurane Éthanol Halotane Isoflurane Sévoflurane Théophylline	Éthanol Isonidazide	Disulfiram Diéthylthiocarbamate
CYP3A	Antiviraux Benzodiazépines Chlorphénidramide Claritromycine Cyclosporine Diltiazem Énalapril Érythromycine Estradiol Fentanyl Halopéridole Hydrocortisone Imatinib Irinotécan Lidocaïne Nifédipine Progestérone Quinidine Tacrolimus Tamoxifen Verapamil Vincristine	Amiodarone Barbituriques Dexaméthasone Phénobarbital Rifampine	Amiodarone Chloramphénicol Cimétidine Ciprofloxacine Clarithromycine Diltiazème Erythromycine Fluconazole Fluoxétine Fluvoxamine Jus de pamplemousses Kétoconazole Itraconazole Mifépristone Naringénine Néfazodone Norfloxacine Verapamil
CYP4A	Acide laurique	Agents hypolipémisants	

1.2.6 Isoformes du CYP450 étudiées

Dans cette section, nous reverrons les principales caractéristiques des isoformes du CYP450 qui ont été étudiées dans ce travail, c'est-à-dire les isoformes: 1A, 2C, 2D, 2E, 3A et 4A.

1.2.6.1 P450 1A

La famille des isoformes 1A a été étudiée de façon extensive, à cause de son rôle dans l'activation des carcinogènes⁵⁵. Chez l'humain, on connaît les isoformes 1A1 et 1A2.

L'isoforme 1A1 est très peu exprimée dans le foie. C'est surtout une isoforme extra-hépatique. Elle catalyse de nombreuses réactions oxydatives, impliquant des hydrocarbures polycycliques⁵⁶, d'où son implication en cancérogénèse. Elle exerce son action carcinogénique en activant certaines substances contenues dans la fumée du tabac, par son activité aryl-hydrocarbure hydroxylase⁵⁷. De plus, il s'agit aussi d'une enzyme clef dans le métabolisme de certains médicaments (Tableau I).

Bien qu'elle présente 70% d'homologie avec l'isoforme 1A1, la 1A2 de son côté, est très présente dans le foie humain. Elle est cependant à peu près inexistante dans les autres tissus⁵⁸. Cette isoforme peut catalyser la N-hydroxylation de certains carcinogènes, comme par exemples les amines hétérocycliques, que l'on retrouve en grandes quantités dans les viandes cuites sur le charbon de bois⁵⁹. Une fois activées par la 1A2, les amines hétérocycliques peuvent entraîner la formation de cancers coliques⁶⁰. Cette relation n'est cependant pas établie hors de tout doute⁵⁷.

1.2.6.2 P450 2C

La famille des isoformes 2C est parmi les premières à avoir été purifiée à partir de foie humain⁶¹. Il s'agit de la famille d'isoformes la plus complexe chez l'humain. Toutes les isoformes de cette famille ont plus de 80% d'homologie entre elles⁶². Elles sont impliquées dans le métabolisme oxydatif de médicaments importants (Tableau I). L'isoforme 2C9 est l'isoforme de cette sous-famille la plus abondante chez l'humain. On la retrouve en grande quantité dans le foie⁶³. Elle est aussi associée à la genèse des cancers

coliques via l'activation d'amines aromatiques hétérocycliques et d'hydrocarbones polycycliques aromatiques⁵⁷.

1.2.6.3 P450 2D

La seule isoforme de la famille 2D connu chez l'humain est la 2D6. Des différences interraciales importantes existent dans les niveaux de 2D6 et chez les caucasiens, sept pourcent de pléiomorphisme génétique est rapporté⁴⁸. Cette isoforme est impliquée dans le métabolisme de nombreux médicaments tel que montré au Tableau I.

1.2.6.4 P450 2E

La seule isoforme connue de la famille 2E est la 2E1⁶⁴. Il s'agit d'une isoforme d'intérêt, pouvant être impliquée dans de nombreuses maladies (ex : diabète) et dans la carcinogénèse chimique. Cette isoforme est exprimée dans le foie et dans un certain nombre d'autres tissus. Elle pourrait d'ailleurs être associée au cancer du poumon lié au tabagisme, à certains cancers gastro-intestinaux comme l'œsophage et aux cancers ORL⁶⁵.

1.2.6.5 P450 3A

La famille des isoformes 3A joue un rôle crucial dans le métabolisme des xénobiotiques⁶⁶. L'isoforme 3A4 est l'isoforme du CYP450 la plus abondante chez l'humain⁶⁷. Cette dernière est particulièrement abondante dans l'intestin et le foie. Elle a de nombreux substrats médicamenteux⁶⁸ (Tableau I). La 3A4 est aussi exprimée dans le sein et la prostate. Elle est impliquée dans le métabolisme de 60% des médicaments couramment utilisés en clinique et elle est, par le fait même, au centre de nombreuses interactions médicamenteuses. Sa localisation intestinale en fait une enzyme particulièrement importante dans le métabolisme des médicaments administrés oralement.

L'isoforme 3A4 est inductible via une augmentation de l'expression génique. Les inducteurs connus de la 3A4 sont : les antibiotiques macrolides, la dexaméthasone, le phénobarbital, le clotrimazole, le paclitaxel, le mifépristone, etc. D'autres phénomènes peuvent par contre conduire à l'inhibition de la 3A4. C'est le cas, par exemple, de

l'inflammation qui, via l'interleukine 6, pourrait inhiber l'expression de certaines isoformes du CYP450⁶⁹.

1.2.6.7 P450 4A

L'isoforme 4A11 a été purifié à partir de rein humain⁷⁰. Il semble de plus que cette isoforme soit impliquée dans le métabolisme des prostaglandines et des leukotriènes, ce qui lui confère un rôle dans l'hypertension⁷¹. Peu d'études sont faites sur cette isoforme à l'heure actuelle.

1.2.7 Corrélation entre les isoformes retrouvées chez l'humain et chez le rat

Lorsque l'on compare le métabolisme et les substrats des isoformes 1A, 2D et 2E de l'humain à ceux du rat, les similitudes en font des isoformes équivalentes. En ce qui concerne la 3A2 du rat, elle est l'équivalente du 3A4 chez l'humain, c'est pourquoi cette isoforme est au centre de la plupart des expériences décrites plus loin⁵³. Chez le rat, la 2C est la famille la plus importante mais son rôle dans le métabolisme des médicaments reste à préciser.

1.3 L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE (IRC)

1.3.1 Le rein

Le rein est un organe intra-abdominal essentiel au maintien de l'homéostasie chez l'humain. Ses fonctions sont multiples⁷²:

- Excrétion des produits métaboliques et des xénobiotiques,
- Régulation de la balance hydro-électrolytique,
- Régulation de l'osmolalité des liquides,
- Régulation de la concentration des électrolytes,
- Régulation de l'équilibre acido-basique,
- Régulation de la pression artérielle,
- Synthèse de la vitamine D, de l'érythropoïétine et de la rénine,
- Métabolisme et régulation de nombreuses autres hormones et,

- Gluconéogénèse.

Le rein est la principale voie d'élimination de nombreux produits métaboliques devenus inutiles pour l'organisme. Ces substances doivent être libérées de l'organisme, au fur et à mesure de leur production. Elles incluent l'urée provenant du métabolisme des acides aminés, la créatinine provenant des muscles, l'acide urique provenant des acides nucléiques, les produits de dégradation de l'hémoglobine, les métabolites de nombreuses hormones et les métabolites de nombreux xénobiotiques (médicaments, pesticides et divers produits provenant de l'alimentation)⁷².

Pour remplir ses fonctions, le rein est constitué d'unités fonctionnelles appelées néphrons. Chaque néphron est constitué d'un réseau complexe de capillaires et de tubules structurés pour filtrer, sécréter, réabsorber et excréter l'urine, en plus d'assurer la fonction endocrine du rein. Chaque rein contient environ 1 million de néphrons, tous capables de produire de l'urine⁷².

1.3.2 Définition de l'IRC

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une affection caractérisée par une perte irréversible de néphrons en nombre et en qualité. Comme les néphrons ne se régénèrent pas, cette perte entraîne une diminution des fonctions du rein⁷³⁻⁷⁵.

Les causes d'IRC sont nombreuses (Tableau II). Elles peuvent être divisées en causes congénitales ou acquises. Chez l'adulte, en 2005, on retient surtout le diabète et l'hypertension comme principales causes de l'IRC. De première cause d'IRC il y a 20 ans, les glomérulonéphrites sont maintenant la troisième. Ces changements dans l'étiologie de l'IRC sont secondaires à une meilleure prévention des glomérulonéphrites (antibiothérapie) et à une augmentation de l'incidence du diabète.

Peu importe la grande variété des mécanismes et pathologies pouvant conduire ou contribuer à l'IRC sévère, le résultat final est essentiellement le même. Il est caractérisé par une altération progressive et irréversible de la fonction rénale. À partir du moment

où plus de 70% de la masse rénale est compromise, on voit apparaître le syndrome urémique (SU). Dès lors, de multiples répercussions peuvent être observées sur l'homéostasie de l'hôte⁷⁶ (Tableau II).

L'équilibre hydro-électrolytique est rompu et l'excrétion de toxines endogènes et exogènes, compromise⁷⁷. Le surplus liquidien et les toxines n'étant plus éliminés, ils s'accumuleront dans le plasma⁷⁸. Ces toxines, nocives, sont appelées les toxines urémiques (TU).

Mis à part l'altération de sa capacité de filtration et d'élimination des TU, le rein est également touché dans sa participation au métabolisme endocrinien de nombreuses substances, contribuant ainsi au déséquilibre cellulaire et tissulaire observé chez les patients souffrant du SU⁷⁹.

Tableau II Principales causes de l'insuffisance rénale chronique⁷³

Causes	Incidence (%)
Maladies métaboliques	
(<u>Diabète</u> , amyloïdose)	40 à 50%
Maladies réovasculaires	
(<u>Hypertension</u> , athérosclérose)	30 à 40%
Maladies immunologiques	
(Glomérulonéphrites, polyartérite noueuse, lupus érythémateux)	10 à 20%
Maladies congénitales	
(Reins polykystiques, hypoplasie rénale)	5%
Infections et autres	
(Pyélonéphrites, calculs urinaires et autres causes d'obstruction urinaire, agents néphrotoxiques,)	15%

Tableau III Manifestations du syndrome urémique

Désordres	Manifestations
Hydro-électrolytique	Hyper/hypovolémie, hyper/hyponatrémie, hyper/hypokaliémie, hyperphosphatémie, hypocalcémie, acidose métabolique
Endocrinien	Hyperparathyroïdie secondaire, ostéomalacie, hyperuricémie, altération de la croissance, infertilité
Neuro-musculaire	Fatigue, désordres du sommeil, léthargie, astérixis, céphalée, encéphalopathie, myoclonies, neuropathie périphérique, convulsions, coma, myopathie, ostéoporose,
Cardiaque	Hypertrophie ventriculaire gauche, hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, péricardite, cardiomyopathie, athérosclérose accélérée, hypotension, arythmies, calcifications vasculaires
Pulmonaire	Augmentation de la perméabilité des capillaires pulmonaires (ad œdème), fibrose, pneumopathie restrictive
Dermatologique	Pâleur, hyperpigmentation, prurit, ecchymose
Gastrointestinal	Anorexie, nausée, vomissement, haleine urémique, gastroentérite, ulcères peptiques, hémorragie digestive, ascite, péritonite, malabsorption, malnutrition, ulcères des muqueuses, hémorragie et nécroses intestinales, constipation, iléus, diverticulose/ite,
Hématologique	Anémie, leucopénie, diathèse hémorragique, susceptibilité accrue aux infections, hypersplénisme
Immunité	Susceptibilité accrue aux infections,

1.3.3 Les toxines urémiques (TU)

Les TU sont responsables du syndrome urémique (SU). Elles constituent un ensemble de molécules aux caractéristiques aussi nombreuses que les produits qui les composent.

Brièvement, on peut les subdiviser en 3 catégories :

- Les petits composés hydrosolubles,
- Les petites protéines et,
- Les molécules de poids moléculaire moyen.

La plupart des petites molécules ne sont pas toxiques et peuvent de toute façon être éliminées même si la fonction rénale est très altérée ou par dialyse, lorsqu'indiqué⁸⁰.

De l'autre côté, les composés toxiques sont habituellement des molécules plus volumineuses. Elles sont, pour la plupart, le produit catabolique des protéines ingérées et/ou produites par l'hôte, dont l'organisme n'arrive pas à se départir à cause de la dysfonction rénale⁷³. D'ailleurs, même à jeûn, une personne normale dégrade obligatoirement de 20 à 30 g de protéines à chaque jour. Les protéines sont d'abord dégradées en acides aminés, puis désaminées et finalement, oxydées. Ce sont ces produits protéiques oxydés qui sont nocifs pour l'hôte⁸¹. Les TU peuvent aussi être le produit de xénobiotiques ingérés, volontairement ou non, par l'hôte. Toutes ces molécules, plus grosses, ne sont pas toujours dialysables, ce qui amplifie le problème. Finalement, ce groupe de TU semble présenter une cinétique complètement différente de l'urée⁷⁸.

L'accumulation dans le sang des TU entraîne de nombreuses manifestations cliniques, biochimiques et hématologiques distinctives qui caractérisent le SU^{76, 82, 83} (Tableau III). Outre les manifestations cliniques et paracliniques du SU, les TU agissent probablement en plus, à titre de médiateurs dans de nombreuses réactions et phénomènes observés chez l'hôte et dont on commence à peine à comprendre les implications⁷⁸. Les nombreux médiateurs de l'inflammation présents dans le sérum des patients IRC en sont des exemples. Chez le rat, l'interleukine 6, un médiateur de nombreuses réactions inflammatoires, peut inhiber l'activité du CYP450 hépatique⁸⁴. Il

en va de même de l'interleukine 1 : des études faites chez le rat démontrent que celle-ci peut inhiber l'expression et l'activité du CYP450 hépatique⁶⁹.

1.3.4 Effets systémiques du SU

Bien que les effets profonds du SU sévère soient rarement vus en clinique aujourd'hui, à cause des traitements disponibles pour les patients atteints d'IRC, le SU peut toucher tous les organes majeurs (Tableau III). Une diminution de moins de 30% du taux de filtration glomérulaire (TFG) (le marqueur de l'insuffisance rénale) ne cause pas de symptôme clinique mais modifie les paramètres biochimiques du sang (élévation de l'urée et de la créatinine). Une diminution supérieure à 30% du TGF, est caractérisée par l'apparition de signes et symptômes propres au SU.

Au-delà de 90% de réduction du TGF, si aucun traitement n'est entrepris, la survie est compromise^{85, 86}.

1.3.5 Effets de l'IRC sur la parathormone

La régulation de la calcémie sérique est un phénomène précis où les variations sont de faibles amplitudes⁸⁷. Ce contrôle précis de la calcémie est essentiel, car le calcium est au centre de nombreux processus physiologiques tels que : la contraction musculaire, la transmission nerveuse et la coagulation⁸⁸.

Le calcium existe sous 3 formes : combiné aux protéines, combiné à des substances anioniques (citrates et phosphates) et libre (ionisé). C'est cette dernière fraction qui est la plus importante, car c'est elle qui est impliquée dans les multiples fonctions du calcium^{87, 88}.

Environ 1000 mg de calcium sont ingérés à chaque jour et 350 mg seront absorbés par le tube digestif dans le sang, contre 250 mg qui seront sécrétés du sang vers la lumière du tube digestif, pour une balance d'ingestas journalière d'environ 100 mg. La vitamine D et la parathormone sont essentielles à l'absorption intestinale du calcium⁸⁹⁻⁹². Ce calcium servira au métabolisme osseux et permettra diverses fonctions cellulaires. Le

rein éliminera le calcium excédentaire après filtration et réabsorption. La régulation de ces phénomènes se fera sous le contrôle étroit de la parathormone, une des hormones clés dans le métabolisme du calcium⁷⁹.

L'IRC a un impact important sur le métabolisme de la vitamine D. En situation normale et sous l'action de la parathormone, le rein permet la conversion de la 25-hydroxyvitamine D₃ (produite par le foie) en son métabolite actif, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃. Cette conversion se produit dans les tubules proximaux. En cas d'IRC, la perte de la masse rénale (et des tubules proximaux) entraîne une diminution de la conversion de la vitamine D. Dès lors, les taux sériques s'en trouvent fortement diminués. Le résultat final de ces phénomènes est une baisse de l'absorption intestinale du calcium^{89, 93-96}.

L'hypocalcémie qui en résulte stimule la production de la parathormone par les parathyroïdes, contribuant au développement d'une hyperparathyroïdie secondaire et tertiaire. Chroniquement augmentée, la parathormone entraînera une déminéralisation du squelette et des complications osseuses pourront survenir (ex : fractures).

1.3.6 Hyperparathyroïdie (secondaire et) tertiaire

En contraste avec la boucle d'inhibition intrinsèque observée en cas d'hyperparathyroïdie tertiaire, l'hyperparathyroïdie secondaire est causée par une surstimulation des glandes parathyroïdes, par ailleurs normales, par la parathormone retrouvée en circulation à des concentrations supra-physiologiques. Le but de cette réaction est de mobiliser le calcium entreposé dans l'os afin de le rendre disponible sous sa forme ionisée. C'est une situation presque exclusivement rencontrée en cas d'IRC⁹⁴.

L'hypocalcémie observée entraîne en plus une hyperphosphatémie secondaire par diminution de l'excrétion urinaire des phosphates. Ces phosphates vont, de plus, lier le calcium ionisé, aggravant l'hypocalcémie et les complications en découlant en plus de stimuler d'avantage la sécrétion de parathormones et contribuer à la stimulation⁹⁷.

En cas d'hyperparathormonémie au long cours, les mécanismes de rétroaction deviennent insensibles aux modulations du calcium et les parathyroïdes deviennent autonomes. Ce phénomène constitue l'hyperparathyroïdie tertiaire. Cette hyperparathyroïdie persiste même lorsque la condition sous-jacente est corrigée, comme par exemple après une transplantation rénale réussie⁹⁷.

1.3.7 Effets de l'IRC sur l'inflammation

L'accumulation de diverses substances dans le plasma des patients avec IRC, les perturbations du système endocrinien et l'état d'ischémie chronique de certaines sections des reins des patients avec IRC entraînent la libération de nombreuses cytokines, responsables d'un état « inflammatoire » observé chez les patients avec IRC sévère. Cet état inflammatoire contribue à la physiopathologie de nombreux phénomènes observés chez ces derniers^{98,99}.

Chez les patients avec IRC, on reconnaît un déficit marqué d'antioxydants, entraînant la présence dans le plasma de produits de l'oxydation des protéines. Ces produits, responsables du stress oxydatif, font parties des TU et sont reconnus comme des médiateurs de l'inflammation. Ils pourraient contribuer à l'athérosclérose accélérée que l'on observe chez ces patients, de même qu'à l'aggravation de la malnutrition et de l'hypoalbuminémie^{99,100}.

1.4 EFFETS DE L'IRC SUR LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS

1.4.1 Introduction

En dépit d'ajustement de doses en fonction de la fonction rénale, les patients souffrants d'IRC sont souvent aux prises avec de nombreuses réactions indésirables, liées à la prise de médicaments^{101, 102}. Ceci est dû au fait que l'IRC n'affecte pas seulement le taux de filtration glomérulaire (et l'élimination rénale des médicaments), mais aussi de nombreux systèmes enzymatiques essentiels au métabolisme de nombreux

médicaments^{3, 4, 103}. Les systèmes enzymatiques qui nous intéressent ici sont principalement ceux du tube digestif (entérocytes) et du foie (hépatocytes)¹⁰⁴.

1.4.2 Études faites chez l'humain

Plusieurs études ont démontré une diminution de la clairance de nombreux médicaments chez les patients avec IRC^{3, 4, 46, 101, 102}. Un grand nombre de ces médicaments sont métabolisés au foie, suggérant ainsi que l'IRC altère la biotransformation hépatique des médicaments. Parmi les médicaments métabolisés par le foie et dont le métabolisme est affecté par l'IRC, on retrouve par exemple : l'acyclovir, le captopril, la cimétidine, la ciprofloxacine, la codéine, le fluconazole, l'imipénem, le métoprolol, la minoxidile, la nicardipine et le vérapamil³. Ces substances servent de substrats aux isoformes CYP3A4, CYP2D6 et CYP2C19, suggérant une altération du CYP450 en cas d'IRC. Des études faites *in vivo* chez l'humain ont permis de démontrer une diminution de l'activité CYP2D6¹⁰⁵ lors de l'administration de dextrométhorphan.

Par ailleurs, les réactions de phase II ont été moins étudiées, mais la sulfatation semble normale en IRC, alors que l'acétylation et la glucuronydation semblent réduites^{106, 107}.

Bien que toutes ces études suggèrent une réduction du métabolisme des médicaments en cas d'IRC, il est encore difficile de prévoir comment l'IRC peut influencer le métabolisme hépatique. Les études chez l'humain sont difficiles car les patients IRC sont souvent aux prises avec de nombreux problèmes médicaux synchrones, ils sont souvent polymédiqués ou âgés, et bon nombre sont fumeurs. Tous des facteurs qui peuvent moduler à la hausse comme à la baisse le CYP450.

1.4.3 Études faites chez l'animal

Chez le rat, les isoformes du CYP450 qui participent au métabolisme des médicaments sont les CYP1A2, CYP2C11, CYP2D, CYP2E1 et CYP3A1/3A2. Il est primordial de connaître quelles isoformes sont réduites en IRC. Uchida *et al.* rapportent une inhibition

du CYP2C6, CYP2C11 et CYP3A2 et une induction du CYP1A2 dans des hépatocytes de rats avec IRC¹⁰⁸. Dans notre laboratoire, nous avons observé une inhibition du CYP2C11, CYP3A1 et CYP3A2 et aucune induction⁵⁰. L'absence d'induction dans notre étude s'explique par des conditions expérimentales différentes : IRC plus sévère et expérimentation étalée sur une plus longue période. Les isoformes CYP3A1 et CYP3A2 chez le rat sont l'équivalent du CYP3A4 chez l'humain. Comme le 3A4 est responsable du métabolisme de la majorité des médicaments utilisés en clinique, cette donnée nous apparaît comme des plus intéressantes.

1.4.3.1 Études *in vitro*

Comme le CYP450 est un des systèmes enzymatiques parmi les plus importants dans le métabolisme des médicaments, de nombreuses études ont été faites sur le sujet. Des études faites en IRC nous ont montré une diminution du CYP450 total variant entre 19 et 47%¹⁰⁸⁻¹¹¹. Des réductions significatives de réactions enzymatiques CYP450 dépendantes ont été aussi observées *in vitro*. La N-déméthylation de l'érythromycine, de l'aminopyrine et de l'éthylmorphine, la O-déméthylation de la codéine et l'hydroxylation de l'aniline étaient toutes réduites¹⁰⁸⁻¹¹¹. De plus, tel que démontré chez l'humain, il y a une corrélation entre la diminution d'activité du CYP450 et la sévérité de l'IRC chez le rat^{50, 108, 111}.

1.4.3.2 Études *in vivo*

Bien que les études *in vitro* suggèrent que l'IRC réduit la capacité de métaboliser des médicaments, les répercussions de l'IRC sur le métabolisme hépatique des médicaments demeurent controversées. Peu de données sont disponibles sur le métabolisme *in vivo* des médicaments en IRC. Uchida *et al* rapportent une diminution de 25 % de la N-déméthylation de la triméthadione¹⁰⁸. Parce que cette réaction est catalysée par plusieurs isoformes du CYP450, il est impossible de savoir quelles isoformes sont diminuées.

Par ailleurs, il est possible d'évaluer l'activité catalytique de certains isoformes du CYP450 en utilisant des épreuves respiratoires (« breath test »). A cet effet, un « breath test » à l'aminopyrine a été utilisé pour mesurer l'activité du CYP2C11, un « breath test » à la caféine a été utilisé pour mesurer l'activité du CYP1A2 et un « breath test » à

l'érythromycine a été utilisé pour mesurer l'activité du CYP3A2. En collaboration, nous avons rapporté une diminution de 35% des « breath test » à l'aminopyrine et à l'érythromycine chez des rats IRC¹¹². Nous avons aussi noté une corrélation entre la diminution de la clairance de la créatinine et la diminution du métabolisme des médicaments. Ces résultats démontraient que chez le rat, la diminution du métabolisme des médicaments, *in vivo*, était secondaire à une diminution des isoformes hépatiques CYP2C11 et CYP3A1/3A2.

1.4.4 Effets de l'IRC sur le CYP450 intestinal

L'intestin fournit la principale source initiale de la biotransformation des médicaments⁶⁶. Il est donc activement impliqué dans l'effet de premier passage des médicaments administrés par voie orale^{113, 114}. Une étude que nous avons publié en 2002⁵¹ nous a permis de démontrer qu'en présence d'IRC, le niveau du CYP450 intestinal total était diminué, de même que les isoformes 1A1 et 3A2. Cette inhibition était due à une baisse de l'ARN messenger codant pour ces protéines, témoignant d'une baisse de l'expression génique.

1.4.5 Facteur(s) circulant(s)

Le métabolisme des médicaments est altéré par l'IRC. La biotransformation des médicaments n'est pas seulement diminuée aux reins. Elle l'est aussi dans les sites extra-rénaux que sont les intestins (entérocytes) et le foie (hépatocytes). Cette diminution dans la clairance extra-rénale des médicaments, en présence d'IRC, apparaît surtout médiée par une réduction du CYP450, secondaire à une diminution de l'expression des gènes responsables de la synthèse des isoformes concernés.

La possibilité de la présence d'un ou de plusieurs facteurs circulants chez les patients urémiques est soulevée par plusieurs. Ce ou ces facteurs auraient la capacité de moduler la clairance des médicaments¹¹⁵. Ni chez l'animal, ni chez l'humain, un tel facteur n'a été caractérisé.

On note l'accumulation de nombreuses protéines lorsque l'on compare le sérum de patients avec IRC à des sérums normaux. Outre l'urée et les nombreuses TU, la PTH fait partie des molécules que l'on retrouve en grande quantité dans le sérum des patients avec IRC¹¹⁶. D'ailleurs, en plus d'être présente en quantité supraphysiologique, la PTH, et ses nombreux fragments, entraînent une augmentation du calcium intra-cellulaire dans les hépatocytes¹¹⁷. La parathormone est une protéine de 12 kD¹¹⁸. En cas de diminution de la calcémie, la parathormone stimulera la résorption du calcium et des phosphates présents dans l'os. Elle stimulera l'activité ostéoclastique (et la production de nouveaux ostéoclastes), elle diminuera l'excrétion rénale de calcium et stimulera l'absorption intestinale de calcium et de phosphate¹¹⁹. C'est donc l'hypocalcémie qui stimulera la production de parathormone¹²⁰. En cas d'IRC, la diminution de production de la vitamine D entraîne une hypocalcémie, qui aura comme conséquence d'augmenter chroniquement la parathormone sérique.

Il y a également toutes les substances propres à l'inflammation, et que l'on retrouve en grande quantité dans le sérum des patients avec IRC. La protéine C réactive et l'interleukine-6 en sont des exemples. Elles sont toutes deux augmentées en cas d'IRC¹²¹. Les répercussions de ces phénomènes sont mal connues.

1.5 HYPOTHÈSE

1.5.1 Prémisses

En guise de prémisses, on peut affirmer que l'IRC est associée à une altération du métabolisme des médicaments. En fait, même les médicaments d'élimination hépatique voient leur métabolisme modifié par l'IRC.

Il apparait donc clairement que les voies d'élimination et de biotransformation des médicaments ne peuvent pas être étudiées individuellement. Elles doivent plutôt être considérées comme un tout, chacune des voies ayant la capacité d'interagir sur les autres pour produire un résultat final.

Chez le rat, l'impact de l'IRC sur les réactions de phase I commence à être connu. Ces réactions sont responsables de la biotransformation hépatique de la majorité des médicaments administrés en clinique. La plupart de ces réactions sont médiées par le CYP450. Mais toujours chez le rat, nous ne connaissons pas bien les voies de communications existant entre les différents systèmes de biotransformation, lorsque ces systèmes sont soumis à l'IRC.

Chez l'humain, l'impact de l'IRC sur les réactions de phase I, responsables de la biotransformation hépatique de la majorité des médicaments, a été peu étudié. Encore moins les mécanismes sous-jacents à l'inhibition du CYP450. C'est sur ces sujets que porte le présent travail.

1.5.2 Postulats

À la lumière de ces prémisses, nous postulons donc que, comme chez le rat, l'altération du métabolisme hépatique responsable de l'élimination et de la biotransformation de nombreux médicaments observée chez des sujets humains souffrant d'IRC sévère est secondaire à une modulation de certaines isoformes du CYP450 hépatique. Secondairement, nous croyons que cette modulation du CYP450 hépatique est médiée par un ou des facteurs sériques propres aux patients IRC.

1.6 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

1.6.1 Objectif principal

- Mesurer l'effet du sérum provenant de sujets humains souffrants d'IRC sévère sur la modulation du CYP450 hépatique.

1.6.2 Objectifs secondaires

- Mesurer l'impact de sérum provenant de sujets humains souffrant d'IRC sévère, sur la modulation des isoformes 1A2, 2C6, 2C11, 2D, 2E1, 3A2 et 4A du CYP450 hépatique .

- Évaluer l'activité métabolique des isoformes du CYP450 hépatique modulés par l'IRC.
- Évaluer la relation entre certains paramètres biochimiques sur la modulation du CYP450 hépatique.
- Évaluer si les concentrations des facteurs sériques responsables de la modulation ont un effet dose-réponse sur la modulation du CYP450 hépatique.
- Évaluer le poids moléculaire du ou des facteurs sériques responsables de la modulation du CYP450 hépatique.
- Évaluer l'impact de la dialyse et de la transplantation sur la modulation du CYP450 hépatique.

CHAPITRE II – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Protocole expérimental

Pour parvenir aux objectifs de l'étude, nous avons incubé des hépatocytes de rats normaux dans un milieu de culture constitué en partie de sérum provenant de sujets humains atteints d'IRC sévère que nous avons comparés à des témoins. Différentes conditions expérimentales ont été reproduites (Sections 2.1 à 2.4) :

⇒ Après incubation d'hépatocytes de rats normaux dans différents milieux de culture nous avons mesuré dans les microsomes des hépatocytes (Sections 2.5 à 2.8):

- Le niveau de CYP450 total (Méthode à la section 2.9, résultats à la section 3.1),
- L'expression protéique de différentes isoformes du CYP450 impliquées dans le métabolisme des médicaments (Méthode à la section 2.10, résultats à la section 3.2),
- L'ARN messenger codant pour ces isoformes spécifiques (Méthode à la section 2.11, résultats à la section 3.3),
- L'activité métabolique de certaines isoformes du cytochrome P450 (Méthode à la section 2.12, résultats à la section 3.4) et,
- L'influence de la composition biochimique du sérum sur le taux d'expression de certaines isoformes du CYP450 (Méthode à la section 2.13, résultats à la section 3.5).

⇒ De plus, à partir des sérums provenant de sujets humains avec IRC que nous avons fractionnés par chromatographie, nous avons évalué le poids moléculaire des facteurs impliqués (protéines) dans la régulation du CYP450. (Méthode à la section 2.14, résultats à la section 3.6).

- ⇒ Nous avons aussi utilisé différentes concentrations de sérum provenant de sujets humains avec IRC pour évaluer l'impact de la concentration de sérum IRC sur l'expression du CYP450 hépatique total et certaines de ses isoformes dans des hépatocytes de rats normaux incubés pendant 24 heures (Méthode à la section 2.15, résultats à la section 3.7).
- ⇒ Finalement, des expériences similaires ont été faites sur des hépatocytes de rats normaux incubés pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant du sérum provenant de sujets humains avec IRC ayant amorcé la dialyse chronique depuis plus d'un mois et une fois après une transplantation rénale réussie (Méthodes aux sections 2.16 et 2.17, résultats aux sections 3.8 et 3.9).

2.2 Sujets humains avec IRC sévère

Afin d'étudier l'effet du sérum provenant de sujets humains avec IRC sur le cytochrome P450 des hépatocytes de rats et établir des courbes doses-réponses, nous avons recruté des patients souffrants d'IRC sévère.

Après consentement éclairé, des patients consécutifs de plus de 18 ans, souffrant d'IRC sévère ont été inclus dans l'étude, dans le but de leur prélever du sérum. Pour être inclus dans l'étude, les sujets devaient être atteints d'IRC progressant depuis plus d'une année, et chez qui une dialyse était prévue à court terme. Cette stratégie nous a permis d'obtenir des sérums contenant un maximum de TU.

Les patients souffrants d'une IRC rapidement progressive ont été exclus de l'étude de même que ceux chez qui on a pu identifier des facteurs modulateurs du CYP450 : présence d'une infection aiguë, processus inflammatoire chronique, alcoolisme, tabagisme, prise d'antiépileptiques et de corticostéroïdes. En ce qui concerne la prise de corticostéroïdes, ce dernier critère d'exclusion ne s'applique pas aux patients 21, 23 et 25 à 30 après leur transplantation. Ces derniers recevaient tous de la prednisone à basse dose ($0,22 \pm 0,05$ mg kg⁻¹ par jour) et n'ayant pas d'impact sur la modulation du CYP450.

Les caractéristiques des sujets humains avec IRC retenus pour cette étude sont montrées aux Tableaux IV et V:

- Les sérums des patients 1 à 10 (n=10) (Tableau IV) ont servi à déterminer les effets du sérum IRC sur le CYP450 hépatique total (Section 2.9) et sur certains isoformes du CYP450 hépatique (expression protéique (Section 2.10) et l'ARN messenger (Section 2.11)). Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus avec le sérum de 10 sujets humains sans IRC (Témoins).
- Les sérums des patients 3, 5, 6, 7 et 8 (n=5) (Tableau IV) ont servi à faire l'évaluation *in vitro* de l'activité métabolique du CYP450 hépatique (Section 2.12). Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus avec 5 sujets humains sans IRC (Témoins).
- Les sérums des patients 1 à 14 (n=14) (Tableau IV) ont servi à déterminer l'influence de la composition biochimique du sérum sur le taux d'expression de certaines isoformes du CYP450 hépatique (Section 2.13).
- Les sérums des patients 1, 2, 4, 9 et 10 (n=5) (Tableau IV) ont servi à caractériser (poids moléculaire) les facteurs sériques (protéines) responsables de la modulation du CYP450 hépatique (Section 2.14). Les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus avec 5 sujets humains témoins sans IRC.
- Les sérums des patients 11 à 16 (n=6) (Tableau IV) ont servi à faire des courbes doses-réponses (Section 2.15).
- Les sérums des patients 17 à 24 (n=8) (Tableau IV) ont servi à évaluer l'effet de l'hémodialyse chronique sur les facteurs inhibiteurs du CYP450 hépatique (Section 2.16).
- Les sérums des patients 21, 23 et 25 à 30 (n=8) (Tableau V) ont servi à évaluer l'effet de la transplantation rénale sur les facteurs inhibiteurs du CYP450 hépatique

(Section 2.17). Nous considérons une greffe rénale réussie si un patient présentait une créatinine normale.

Tableau IV Caractéristiques des sujets humains avec IRC¹ donneurs de sérum

Patient #	Cause de l'IRC	Age	Genre	TFG ²	Sérum post-dialyse
1	Diabète	65	Homme	11,7	Non
2	Ischémique	66	Homme	8,6	Non
3 ³	Ischémique	75	Homme	7,6	Non
4	Obstructive	74	Homme	9,5	Non
5 ³	Glomérulonéphrite	68	Homme	7,7	Non
6	Ischémique	30	Femme	1,6	Non
7	Diabète	73	Femme	6,9	Non
8	GSFS ⁴	35	Femme	4,8	Non
9	Hypertension	75	Femme	6,6	Non
10	Diabète	70	Femme	3,9	Non
11	Diabète	64	Homme	8,8	Non
12	Hypertension	59	Homme	5,0	Non
13	Diabète	49	Homme	5,4	Non
14	Glomérulonéphrite	58	Femme	5,2	Non
15	Diabète	58	Femme	11,5	Non
16	Diabète	39	Femme	9,0	Non
17	Diabète	49	Homme	6,1	Oui ⁵
18	Diabète	70	Homme	6,6	Oui ⁵
19	Diabète	63	Homme	9,1	Oui ⁵
20	Diabète	69	Homme	10,9	Oui ⁵
21 ⁶	Alport	27	Homme	5,7	Oui ⁵
22	Diabète	66	Femme	7,3	Oui ⁵
23 ⁶	Pyélonéphrite	52	Femme	6,6	Oui ⁵
24	Diabète	58	Femme	10,7	Oui ⁵

Légende et explications - Tableau IV:

- ¹ Insuffisance rénale chronique
- ² Taux de filtration glomérulaire en $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1,73\text{m}^2^{-1}$. Les mesures ont toutes été faites avant la première dialyse
- ³ Tous les patients sont éventuellement hémodialysés, sauf les patients # 3 et 5 qui sont sous dialyse péritonéale
- ⁴ Glomérulosclérose focale segmentaire
- ⁵ Pour les patients 17 à 24, les mesures de TGF ont été faites avant la première dialyse, après 1 mois de dialyse et après 6 mois de dialyse
- ⁶ Patients avec IRC qui subiront éventuellement une greffe rénale (Voir Tableau V)

Tableau V **Caractéristiques des sujets humains avec IRC¹ donneurs de sérum et qui ont subi une transplantation rénale**

Patient #	Cause de l'IRC	TFG² avant la dialyse (ml • min ⁻¹ • 1,73m ²⁻¹)	Durée sous dialyse avant la transplantation (mois)	TFG après la transplantation (ml • min ⁻¹ • 1,73m ²⁻¹)
21	Alport	5,7	4	37,5 au jour 32 ⁸
23	PN ⁴	6,6	10	33,1 au jour 63
25 ³	GN ⁵	10,2	26	109,6 au jour 59
26	RPK ⁶	5,5	10	53,9 au jour 34
27	Diabète	8,4	5	69,4 au jour 62
28 ³	GSFS ⁷	5,6	27	59,9 au jour 31
29	IgA	6,2	18	28,6 au jour 47
30	Diabète	7,9	15	71,3 au jour 38

Légende et explications - Tableau V:

- 1 Insuffisance rénale chronique
- 2 Taux de filtration glomérulaire en ml • min⁻¹ • 1,73m²⁻¹. Les mesures ont toutes été faites avant la première dialyse, sauf si spécifié
- 3 Tous les patients sont hémodialysés, sauf les patients # 25 et 28 qui sont sous dialyse péritonéale avant d'être transplantés
- 4 Pyélonéphrite
- 5 Glomérulonéphrite
- 6 Reins polykystiques
- 7 Glomérulosclérose focale segmentaire
- 8 Après la transplantation

2.3 Sujets humains sans IRC (Témoins)

Les sujets humains sans IRC (n=30) ont été retenus pour cette étude selon les mêmes critères que les sujets humains avec IRC (Section 2.2) sauf pour la créatinine sérique qui devait être normale (<120 µM). Il s'agissait de sujets sains, exempts de pathologies ayant un impact significatif en clinique. Ils ont aussi signé un consentement éclairé.

2.4 Préparation du sérum provenant des sujets humains avec IRC et sans IRC (Témoins)

Dix ml de sang total était prélevé par ponction veineuse chez les sujets humains avec IRC et sans IRC (Témoins). Après coagulation du sérum pendant 30 minutes à la température de la pièce, le sérum était récupéré après centrifugation à 600g pendant 10 minutes. Le sérum était ensuite aliquoté et entreposé à -80°C. Les échantillons n'ont été décongelés qu'une seule fois par la suite.

2.5 Modèle animal expérimental

Des rats mâles Sprague-Dawley (Charles River, Pointe Saint-Charles, PQ) pesant entre 200 et 300 g ont été hébergés à l'animalerie du centre de recherche. Ils ont été nourris avec de la moulée Purina pour rats et de l'eau *ad libitum*. Une période d'acclimatation d'au moins 3 jours était allouée aux rats avant de procéder au travail expérimental. Toutes les procédures ont été faites en accord avec les règles du Conseil Canadien de Protection des Animaux et sous la supervision du comité local de protection des animaux.

2.6 Isolation des hépatocytes de rats

Pour toutes les expériences décrites plus loin, les hépatocytes de rats ont été isolés selon la méthode de perfusion hépatique en deux étapes de Seglen¹²². Une laparotomie médiane était faite sur des rats normaux anesthésiés au Somnotol™ afin de canuler la veine porte et la veine cave inférieure. Le foie était ensuite perfusé *in situ* avec une solution de Hank : 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1% de glucose, 0,4 mM de

KH_2PO_4 , 0,2 mM de Na_2HPO_4 , 25 mM de NaHCO_3 à un pH de 7,4. La solution de Hank était saturée en oxygène et maintenue à 37°C tout au long de la procédure. Durant la première étape, le foie était perfusé avec la solution de Hank additionnée de 0,1 U • ml^{-1} d'héparine et 0,5 mM de EDTA pour enlever le sang. Ensuite, une solution de Hank contenant 1,2 mM de MgSO_4 , 1,8 mM de CaCl_2 , 7,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'inhibiteur de trypsine et 5 mg • ml^{-1} de collagénase D était perfusée pour digérer les tissus hépatiques. Après la perfusion *in situ* du foie, celui-ci était retiré de la cavité abdominale et placé sur de la glace dans une solution de Willams E. La capsule de Glisson était ensuite pelée de la surface hépatique sur un côté et les hépatocytes étaient détachés du foie par brossage à l'aide d'un peigne de plastique, puis filtrés à travers un filtre de nylon de 80 μm . Les cellules vivantes étaient ensuite purifiées sur un gradient de Percoll à 40%.

Telle que démontrée par une exclusion au bleu de trypan¹²³, la viabilité des hépatocytes prélevés était supérieure à 90%. Une fois les hépatocytes purifiés, la concentration de la suspension cellulaire était ajustée à 0,5 X 10⁶ hépatocytes • ml^{-1} dans du milieu de William E contenant 10% de sérum de veau foetal et 1 mM d'insuline¹²⁴.

2.7 Culture cellulaire des hépatocytes

Les hépatocytes purifiés étaient distribués dans des plaques de culture de 6 puits dont le fond était recouvert de collagène de type 1, extrait de queue de rats (Collaborative Biomedicals). Dans chaque puit, on a déposé un volume de 3 ml de la suspension cellulaire pour un total de 1,5 X 10⁶ hépatocytes par puit. Cette concentration a été établie comme optimale pour obtenir une densité cellulaire maximale à la surface du puit.

Une pré-incubation de 2 heures a été faite à 37°C dans un atmosphère à 95% d'oxygène et 5% de dioxyde de carbone.

Après la pré-incubation, la solution d'incubation était changée pour 2 ml de milieu William E contenant 10% de sérum entier (ou fractionné – Section 2.14) provenant de

sujets humains soit avec IRC, soit sans IRC (Témoins) en fonction des groupes constitués. Pour les courbes doses-réponses, des concentrations variables de sérum (de 1 à 20%) provenant de sujets humains ont été utilisées. Le sérum d'un patient était utilisé pour une seule expérience.

Finalement, les hépatocytes étaient incubés durant 24 heures supplémentaires avant d'être prélevés par grattage dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS: NaCl 0,9%, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,4).

Pour l'analyse de l'ARN messager, les hépatocytes étaient prélevés dans une solution tampon RLT (Qiagen).

Les échantillons contenant les hépatocytes étaient ensuite congelés et conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

2.8 Préparation des microsomes provenant des hépatocytes

Il s'agit d'une technique standard, modifiée selon les détails suivants. Les microsomes ont été isolés à partir des hépatocytes récoltés par centrifugation différentielle. Le culot hépatocytaire, obtenu par centrifugation, était homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur de tissu de type Potter-Elvehjem (Wheaton) dans un tampon d'homogénéisation contenant : 10 mM de Tris-HCL à pH 7,4, 0,153 M de KCl, 0,2 mM de EDTA, 0,1 mM de DTT, 20% de glycérol et 0,1 mM de PMSF.

L'homogénat cellulaire obtenu était ensuite soniqué pendant 10 secondes sur glace puis centrifugé à 12 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant était ensuite récupéré et re-centrifugé à 100 000 g pendant 60 minutes à 4°C.

Le culot contenant les microsomes était suspendu dans du NaCl 0,9% contenant 0,1 mM de PMSF et entreposé à -80°C jusqu'à l'analyse¹²⁵.

2.9 Détermination du contenu en cytochrome P450 provenant des hépatocytes

Le contenu en protéines des hépatocytes fut déterminé en utilisant le « Micro BCA Protein Assay » (Pierce, Rockford, IL) en utilisant de l'albumine sérique bovine comme standard protéique.

Le contenu en CYP450 total fut mesuré par spectrophotométrie grâce au spectre de différence lorsque comparé à la protéine réduite^{126, 127}.

2.10 Immunobuvardage de type « Western »

Les isoformes du CYP450 énumérées au Tableau VI ont été analysées par la technique d'immunobuvardage de type « Western ». Quarante µg de protéines microsomiales ont été séparées par électrophorèse en conditions réductrices, dans un gel de polyacrylamide à 7,5% contenant 0,1% de SDS. Les protéines ainsi séparées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose par électro-transfert^{128, 129}.

La qualité du transfert a été vérifiée par coloration des membranes dans une solution de Rouge de Ponceau (0,2% dans de l'acide acétique 3%) suivie d'un rinçage à l'eau. Les immuno-buvards ont ensuite été saturés durant 60 minutes à la température de la pièce dans une solution constituée de 5% de lait écrémé en poudre dans du PBS. Par la suite, l'anticorps spécifique pour l'isoforme étudiée (Tableau VI) a été dilué suivant une dilution préalablement optimisée dans le laboratoire dans une solution à 0,5% de lait écrémé en poudre dans du PBS. L'incubation des buvards en présence des anticorps primaires a été effectuée durant au moins 16 heures à 4°C, sous agitation légère. Les buvards ont ensuite été lavés durant 3 fois 15 minutes à la température de la pièce, avec une solution de lavage constituée de 0.1% de Tween 20 dans du PBS.

Comme pour l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire, spécifique à l'isotype et à l'espèce de l'anticorps primaire, a été dilué dans une solution 0,5% lait dans du PBS. Ces anticorps secondaires ont tous été couplés à la molécule de peroxydase afin de

permettre leur localisation. L'incubation a été effectuée à la température de la pièce durant une heure. Après un cycle de lavage (3 fois 15 minutes), les buvards ont été trempés dans une solution révélatrice contenant un dérivé de Luminol (Lumilight, Roche, Laval) qui, par chemiluminescence, permet la localisation et la quantification des complexes immuns sur le buvard. Ce dernier a donc été mis en présence d'un film autoradiographique (Biomax MR, Kodak) durant quelques secondes afin d'enregistrer la quantité de photons émis par la réaction de la peroxydase avec son substrat. L'analyse du signal obtenu grâce à une caméra numérique (Alpha Imager, Alpha Innotech), combinée à un programme d'intégration, a permis de quantifier le signal obtenu.

Si des conditions strictes d'exposition sont respectées, il est ainsi possible d'obtenir une quantification assez précise de l'isoforme à doser dans l'échantillon. La comparaison s'effectue toujours entre les échantillons d'un même gel. Chaque détermination a été reprise sur trois gels différents. Les résultats présentés sont une moyenne des trois répliqués.

La deuxième colonne du Tableau VI dresse une liste des anticorps utilisés pour mettre en évidence les différentes isoformes choisies. Nous avons choisi les isoformes du Tableau IV pour les raisons suivantes :

- Elles sont impliquées dans le métabolisme des médicaments,
- Ce sont les isoformes les plus abondantes dans les hépatocytes,
- Elles peuvent être spécifiquement quantifiées en utilisant des anticorps commercialement disponibles et
- Les courbes de calibration et les tests de spécificités ont été faits dans notre laboratoire.

Par souci de clarté et compte tenu de la similitude des résultats obtenus, les données présentées pour plusieurs sections ne portent que sur la 3A2 bien que des mesures aient été effectuées sur la majorité des isoformes. Nous avons choisi de présenter les résultats

de la 3A2 en raison de son rôle central dans le métabolisme des médicaments et de son abondance qui facilite sa détection et sa mesure.

La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la β -actine et l'aspartate amino S-transférase (AST) sont trois protéines exprimées de façon constitutive par les hépatocytes. Nous avons donc considéré qu'elles n'étaient pas modulées par les conditions de culture étudiées. Leurs concentrations respectives dans les échantillons ont été mesurées par immunobuvardage à l'aide d'anticorps polyclonaux : 1) anticorps de lapins anti-GAPDH humaine; 2) anticorps de souris anti- β -actine de rat; et anticorps de moutons anti-AST porcine. Les anticorps anti-GAPDH et anti-AST montrent une excellente réactivité sur les protéines homologues de rat tel que rapporté par les fabricants et vérifié dans le laboratoire (résultats non-montrés).

L'AST et la β -actine ont été utilisées au cours de l'étude comme marqueurs cellulaires afin de comparer les résultats des différentes isoformes du CYP450 avec ceux de protéines qui ne sont pas impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. La GAPDH a, quant à elle, été utilisée comme standard interne permettant de corriger pour les variations de dosages et de mesure des volumes dans la réalisation des immunobuvardages. Des études préliminaires ont en effet permis d'établir que la GAPDH n'est pas modulée par la présence de sérum IRC dans les cultures cellulaires (résultats non montrés). Ainsi, pour toutes les expériences d'immunobuvardage, nous avons déterminé la quantité de GAPDH présente dans l'échantillon. Pour ce faire, le buvard ayant servi à la détermination de l'une ou l'autre isoforme a été rincé dans du tampon de lavage avant d'être incubé pour 16 heures avec l'anticorps anti-GAPDH dilué dans le PBS-lait 0,5% à 4°C. Le même protocole de lavage et de révélation a été utilisé pour la détermination de la GAPDH.

Les résultats obtenus pour la quantification d'un antigène dans un échantillon ont ensuite été corrigés en divisant par le résultat obtenu pour la GAPDH. C'est ce que nous appelons la valeur normalisée. Lorsque cette valeur est rapportée en pourcentage par rapport à la moyenne des échantillons témoin, elle devient la valeur normalisée par

rapport au témoin et s'exprime en % (la moyenne des valeurs des témoins étant considérée comme 100%).

Tableau VI Isoformes du cytochrome P450 étudiées

Isoformes ¹	Ac ² utilisés pour la technique d'immunobavardage de type « Western » ³
CYP1A2	Ac polyclonal de chèvres anti-rat 1A1/1A2
CYP2C6	Ac polyclonal de chèvres anti-rat 2C6
CYP2C11	Ac polyclonal de chèvres anti-rat 2C11
CYP2D	Ac polyclonal de lapins anti-humain 2D6
CYP2E1	Ac polyclonal de chèvres anti-rat 2E1
CYP3A2	Ac polyclonal de chèvres anti-rat 3A2
CYP4A	Ac polyclonal de chèvres anti-rat 4A

Légende et explications - Tableau VI:

- 1 Du cytochrome P450
- 2 Anticorps
- 3 Les complexes immuns constitués ont ensuite été révélés par des anticorps secondaires IgG anti-chèvre et anti-lapin couplés à une peroxydase et au Luminol dérivé du substrat "Lumi-Light Western blotting substrate". L'intensité de la réaction immune était ensuite révélée par densitométrie sur films Biomax MR exposés

2.11 Isolation de l'ARN messager et analyse RT-PCR quantitative

L'ARN messager codant pour plusieurs isoformes du CYP450 de même que celui de la GAPDH ont été mesurés par polymérase dans la replication en cascade d'un ADN (« RT-PCR : Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction ») sur les hépatocytes préalablement cultivés en présence de sérum de sujets avec IRC.

L'extraction de l'ARN total fut réalisée à partir des échantillons d'hépatocytes congelés après incubation dans différents milieux avec l'ensemble « mini RNeasy » (Qiagen). La concentration en ARN dans les échantillons était ensuite déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm.

Un microgramme d'ARN total était utilisé pour préparer l'ADNc par transcription « reverse » en utilisant l'ensemble « Omniscript RT » (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) et un mélange d'oligohexamères d'Invitrogen (Burlington, ON, Canada).

Le PCR quantitatif a été fait en utilisant une Taq ADN polymérase (Qiagen) et l'ensemble QuantumRNA Classic 18S (Ambion, Ausitn, TX). Ceci a permis la comparaison des échantillons témoins et IRC par normalisation des résultats avec le contenu en ARN ribosomal 18S.

Les réactions de PCR ont été faites sur un système GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer) avec une dénaturation de 15-s à 94°C, une hybridation de 15-s à 55°C et une élongation de 30-s à 72°C. Les produits de la PCR ont été fractionnés sur un gel d'agarose à 1,5% et visualisés par une coloration au bromure d'éthidium.

Des amorces spécifiques pour chaque isoforme ont été choisies en respectant les séquences de la « GeneBank » (Tableau VII, p. 54). Chacune de ces amorces a été testée par séquençage du produit de PCR obtenu sur un analyseur « ABI Prism 3100 » (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

L'ARN messager de la GAPDH fut mesurée selon la technique décrite par Robitaille¹³⁰.

Tableau VII Séquences des amorces de PCR

Isoformes du CYP450	Séquence de l'amorce (5'-3')	Taille prédite du produit (bp)
1A2 S	CATCTTTGGAGCTGGATTTG	255
1A2 AS	GGACACCTCACTGAATGG	
2C6 S	AGAACATGAAGATTTTGAGCAG	275
2C6 AS	CAAATCAGTCACAGTGATTGAT	
2C11 S	TCATTCCCAAGGGTACCAATG	664
2C11 AS	GGAACAGATGACTCTGAATTCT	
2D S	ACCAATGCTGTCATCCATGAGG	237
2D AS	CATGAAGGCCTCATGCTTCAC	
2E1 S	AGCACA ACTCTGAGATATGG	366
2E1 AS	ATAGTCACTGTACTTGA ACT	
3A2 S	ATCCAGAAAGGTTTAGCAAGG	589
3A2 AS	GGACGAGGACATGGTTACTATC	
4A S	AAAGGCCAATGGCGTCTACAGATTG	334
4A AS	ATTCAAGTTCCCAATGGCCTGGAT	
GADPH S	CTGCTTCACCACCTTCTTGAT	399
GADPH AS	CTGCTTCACCACCTTCTTGAT	

2.12 **Activité métabolique *in vitro* du cytochrome P450 hépatique**

Pour évaluer l'activité métabolique des isoformes 3A2 et 1A du CYP450 dans les microsomes des hépatocytes incubés dans différentes conditions (Section 2.8), nous avons utilisé la N-déméthylation de l'érythromycine pour le 3A2⁵¹ et l'activité de la 7-éthosyrésorufin O-dééthylase (EROD) pour le 1A¹³¹.

Pour la mesure de l'activité métabolique de l'isoforme 3A2, 1,5 mg de protéines microsomiales provenant d'hépatocytes, préalablement cultivés durant 24 heures en présence de sérum humain (Section 2.8), ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes en présence d'érythromycine et d'un système générateur de NADPH constitué de : 10 mM de glucose 6-phosphate, 1 mM de NADP et 0,35 unités de glucose 6-phosphate déshydrogénase dans un volume total de 0,5 ml. À la fin de l'incubation, 0,05 ml de ZnSO₄ (0,87 M) et 0,05 ml de Ba(OH)₂ (0,3 N) sont ajoutés pour interrompre la réaction. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 14 000 g pendant 10 minutes, puis 0,35 ml du surnageant était transféré dans un tube contenant 0,15 ml de réactif de Nash¹³². Le mélange a ensuite été incubé à 56°C pendant 30 minutes. Après ce délai, les échantillons étaient analysés par spectrophotométrie (absorbance de 405 nm) pour mesurer la formation de formaldéhyde.

Pour la mesure de l'activité métabolique de l'isoforme 1A, 25 µM de 7-éthoxyrésorufin étaient incubés avec 0,5 mg de protéines microsomiales d'hépatocytes pré-cultivés en présence de 7-éthoxyrésorufin et d'un système générateur de NADPH consistant en 25 mM de NADP, de 0,25 M de glucose 6-phosphate et de 25 U ml⁻¹ de glucose 6-phosphate deshydrogénase⁵¹. La fluorescence de la résorufine était ensuite mesurée par spectrofluométrie (Ex : 530 nm, Em : 585 nm).

2.13 **Biochimie sanguine et urinaire**

L'urémie, la créatininémie et la créatinurie ont été déterminées avec un auto-analyseur « Advia 1650 » (Bayer Diagnostic, Toronto, ON, Canada).

Les niveaux sériques de parathormone ont été déterminés par immuno-chemiluminescence sur un immunoanalyseur « Advia Centaur » (Bayer Diagnostic, Toronto, ON, Canada).

La clairance de la créatinine a été calculée selon la technique décrite par Levey¹³³, en utilisant l'équation qui tient compte de l'âge, du sexe, de la créatinine sérique, de l'albuminémie et de la race.

2.14 Fractionnement des protéines du sérum

Afin de caractériser les protéines contenues dans le sérum provenant de sujets humains IRC qui sont responsables de l'inhibition du CYP450, nous avons étudié différentes fractions des sérums (en fonction du poids des protéines sériques) des sujets avec IRC 1 à 6 du Tableau IV que nous avons comparé aux sérums de sujets témoins sans IRC aussi fractionnés en fonction du poids des protéines sériques. L'impact de chacune des fractions sériques obtenues en fonction du poids des protéines qu'elles renferment, sur l'expression de la protéine CYP3A2, a été étudié.

Une courbe de calibration a été préparée en injectant un mélange de 6 protéines de poids moléculaire connu. Il a ainsi été possible d'établir un volume d'élution pour chacune des 6 fractions de poids moléculaire que nous souhaitons étudier. Les tubes récoltés durant la chromatographie ont donc été regroupés en 6 fractions (<5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30 kD). Chacune de ces fractions a ensuite été concentrée par ultrafiltration sur une cartouche munie d'une membrane ayant une perméabilité inférieure à 3 kD (Centricon YM-3, Millipore, Bedford, MA). Le volume final pour chaque fraction a été ramené à 250µl de façon à garder la même concentration protéique.

La première étape a consisté à séparer les protéines par ultra-filtration sur cartouche « Concentrator Apollo 30K » (Continental Lab Products, San Diego, CA) afin d'obtenir une fraction protéique inférieure à 30 kD. Les conditions d'utilisation décrites par le fabricant ont été respectées et le temps de centrifugation ajusté afin de maintenir le

volume de filtrat inférieur ou égal à 40% de l'échantillon initial. Des tests préliminaires réalisés avec des protéines témoins ont permis de montrer que dans ces conditions, 99% des protéines de 30 kD et plus sont retenues par la membrane. Le filtrat 30K contenant les protéines de moins de 30 kD a ensuite été séparé par tamisage moléculaire sur un chromatographe liquide à haute performance (HPLC; Systeme Gold, Beckman Coulter, Mississauga, Ont, Canada) équipé d'une colonne « Superose 12HR 10/300 GL » (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). La pression des colonnes fut maintenue sous 2.0 MPa, le débit était de 0,4 ml/min et l'absorbance était mesurée à 280 nm avec un « System Gold » (Beckman Coulter, Missauga, ON, Canada). La phase mobile contenait 115 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de KH₂PO₃, 1 mM de HEPES, 25 mM de EGTA et 5,5 mM de glucose ajusté à pH 7,4 et filtré sur une membrane de 0,22 µm. L'HPLC fut branchée à un collecteur de fractions et 0,5 ml furent recueillis par fraction. Des fractions de 250µl de l'ultrafiltrat de 30K furent injectées.

2.15 Courbes doses-réponses

Afin de savoir si la baisse du CYP450 observée dans les hépatocytes de rats cultivés en présence de sérum provenant de sujets humains avec IRC était dose-dépendante, des courbes doses-réponses ont été faites avec des milieux de culture contenant des concentrations variables (de 1 à 20%) de sérum provenant de sujets humains avec IRC et sans IRC (Témoins). Le sérum d'un sujet humain a servi à faire une seule expérience. Pour des raisons expliquées à la section 2.10, nous avons suivi l'expression du CYP3A2.

2.16 Effets de l'hémodialyse chronique sur les facteurs inhibiteurs

La conception de cette étude a été faite de telle sorte que l'on puisse évaluer si le fait de débiter l'hémodialyse chronique, et ainsi retirer les ou certains facteurs urémiques inhibiteurs potentiels, pouvait renverser la chute du CYP450 hépatique médiée par le sérum provenant de sujets humains avec IRC. Le sérum des 8 patients étudiés (patients 13 à 20 du Tableau IV) a été obtenu au jour zéro avant la dialyse puis à 1 mois et 6

mois après le début de la dialyse chronique. Le sérum des sujets humains avec IRC était toujours prélevé avant la session de dialyse.

Les paramètres de la dialyse étaient les suivants : membrane de polysulfone « high flux », sessions de 4 heures de dialyse, trois fois par semaine et débit de l'accès veineux variant entre 350 à 450 ml min⁻¹ (en fonction du type d'accès).

2.17 Effets de la greffe rénale sur les facteurs inhibiteurs

Pour évaluer si la correction de la fonction rénale par une transplantation rénale était associée à une perte de l'effet inhibiteur sur le CYP450 des hépatocytes de rats, nous avons étudié l'effet du sérum prélevé chez 8 patients transplantés (Tableau V). Chez ces sujets, du sérum a été obtenu avant l'amorce de la dialyse et durant le deuxième mois après une transplantation rénale réussie.

Après la transplantation, tous les sujets recevaient de la prednisone à faible dose ($0,22 \pm 0,05$ mg kg⁻¹ par jour) et du mycophénolate de mofétille. Cinq patients recevaient du tacrolimus et 3 de la cyclosporine A. Trois patients ont présenté un rejet aigu dans les 3 semaines suivant la transplantation et ils ont été traités avec du solumédrol.

2.18 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'erreur standard. La signification de la différence entre les groupes a été évaluée en utilisant un test de Student « t » pairé ou non-pairé, ou un test d'ANOVA. Un test d'ANOVA significatif était complété par une procédure de comparaison « Fisher LSD ». Le seuil de signification statistique était atteint en présence d'un $p < 0,05$.

2.19 Drogues et produits chimiques

L'héparine, le glucose, l'EGTA, l'inhibiteur de trypsine, la solution de William E, le gradient de Percoll, l'insuline, l'érythromycine, la 7-éthoxyresorufin, les amorces utilisées pour le PCR quantitatif, les anticorps IgG de chèvres anti-souris et les

anticorps IgG d'ânes anti-mouton proviennent de Sigma Chemicals (St-Louis, MO). La collagénase D et le substrat de la peroxydase Lumilight proviennent de Roche Canada (Laval, QC, Canada). Le sérum de veau foetal provient de Biosources International (Camarillo, CA, USA). Les plaques de culture cellulaire recouvertes de collagène type I de queues de rats proviennent de BD Biosciences Discovery Labware (Oakville, ON, Canada). Le tampon RLT provient de Qiagen (Mississauga, ON, Canada). Les anticorps polyclonaux de chèvres anti-rat (1A1/1A2, 2C6, 2C11, 2E1, 3A2 et 4A), les anticorps de lapins anti-humain 2D6 proviennent de Gentest Corporation (Woburn, MA, USA). Les anticorps polyclonaux de lapins anti-humain GADPH proviennent de Abcam Ltd (Cambridge, UK). Les anticorps de souris anti-rat β -actine proviennent de NeoMarker (Fremont, CA). Les anticorps polyclonaux de moutons anti-rat AST proviennent de Rockland (Gilbertsville, PA). Les anticorps secondaires IgG de porcs anti-chèvre et chèvre anti-lapin proviennent de Biosources International (Camarillo, CA, USA).

CHAPITRE III - RÉSULTATS

3.1 Dosage du cytochrome P450 total dans des hépatocytes de rats incubés pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

Le dosage du cytochrome P450 total dans les hépatocytes de rats normaux incubés 24 heures dans un milieu d'incubation contenant 10% de sérum de sujets humains sans IRC (témoins) fut de $0,20 \pm 0,11 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines.

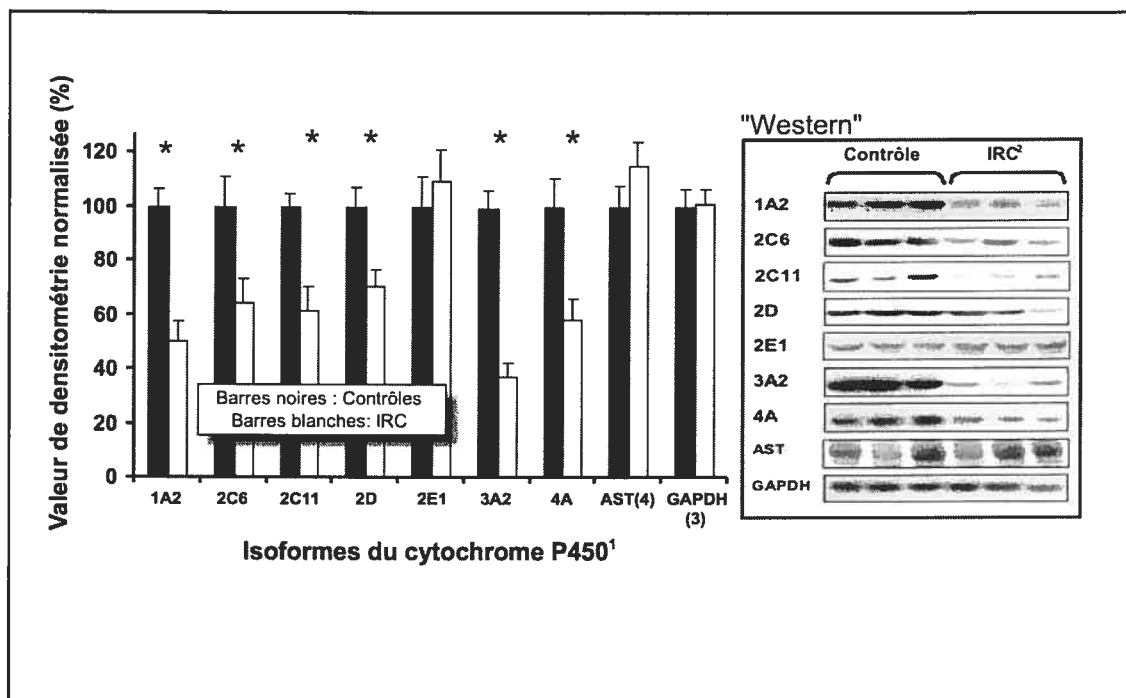
Après 24 heures d'incubation des hépatocytes de rats normaux dans un milieu d'incubation contenant 10% de sérum de sujets humains avec IRC, nous avons observé une baisse de 33% du CYP450 total dans les hépatocytes ($p < 0,01$).

Les expériences ont été répétées huit fois dans chaque groupe afin d'obtenir les moyennes que nous avons comparées.

3.2 Expression de différentes isoformes du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

Après 24 heures d'incubation des hépatocytes de rats normaux dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de patients avec IRC, l'expression de plusieurs isoformes du cytochrome P450 avait diminué lorsqu'on les a comparées au groupe témoin provenant de sujets humains sans IRC (Figure 1). Les niveaux des CYP1A2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D, CYP3A2 et CYP 4A étaient réduits de 50% ($p < 0,001$), 35% ($p < 0,01$), 39% ($p < 0,01$), 29% ($p < 0,01$), 63% ($p < 0,001$) et 42% ($p < 0,01$) respectivement. L'expression de l'isoforme CYP2E1 ne fut pas modifiée par le sérum provenant de sujets avec IRC. Par ailleurs, le niveau des protéines témoins GAPDH, β -actine et AST était similaire dans les 2 groupes.

Figure 1 Expression de différentes isoformes du cytochrome P450, de l'AST et de la GAPDH dans des hépatocytes de rats normaux après incubation dans un milieu constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC² comparé à des témoins incubés dans un milieu constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains sans IRC



Légende et explications - Figure 1:

L'unité de densitométrie des témoins a été arbitrairement définie comme étant 100%

Les données sont égales à la moyenne +/- l'erreur standard de 10 expériences dans chaque groupe

Les immunobuvardages de type « Western » sont représentés à droite. Il s'agit d'un exemple représentatif

* Signifie une différence statistiquement significative ($p < 0,01$) en comparant les sérums provenant de sujets humains avec IRC aux sujets humains sans IRC (Témoins)

- 1 Cytochrome P450
- 2 Insuffisance rénale chronique
- 3 Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
- 4 Aspartate amino S-transférase

3.3 Analyse de l'ARN messenger codant pour certaines isoformes du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

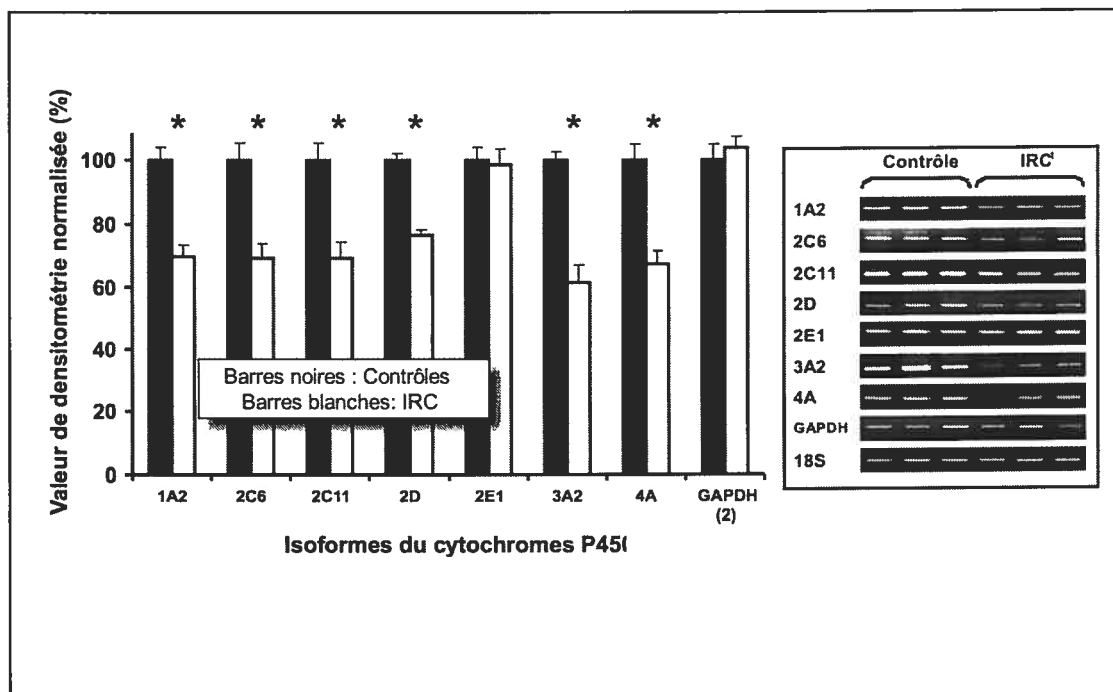
Afin de déterminer si la baisse de l'expression des isoformes du P450 des hépatocytes de rats était due à une baisse dans leur synthèse cellulaire, l'ARN messenger codant pour les isoformes CYP1A2, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D, CYP2E1, CYP3A2 et CYP4A fut mesurée par RT-PCR quantitatif. Après 24 heures d'incubation des hépatocytes de rats normaux dans un milieu contenant 10% de sérum de patients avec IRC, une diminution significative de l'ARN messenger fut notée dans les isoformes suivantes, lorsque comparées aux témoins (Figure 2) :

- CYP1A2 (baisse de 31%, $p < 0,001$),
- CYP2C6 (baisse de 31%, $p < 0,001$),
- CYP2C11 (baisse de 31%, $p < 0,001$),
- CYP2D (baisse de 23%, $p < 0,001$),
- CYP3A2 (baisse de 39%, $p < 0,001$) et,
- CYP4A (baisse de 33%, $p < 0,001$).

L'expression de l'ARN messenger codant pour le CYP2E1 était similaire au témoin.

Ce résultat, combiné à celui de la GAPDH, démontre qu'il ne s'agit pas d'un effet global sur le métabolisme de la cellule mais plutôt d'un effet ciblant certains isoformes du CYP450. Ces résultats confirment que la diminution d'expression observée pour plusieurs isoformes du CYP450 est conséquente à une diminution dans le taux de transcription des gènes en ARN messenger.

Figure 2 Expression de l'ARN messager codant pour les différentes isoformes du cytochrome P450 et de la GAPDH dans des hépatocytes normaux de rats après incubation dans du sérum constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC¹ comparé à des témoins incubés dans du sérum constitué de sérum provenant de sujets humains sans IRC



Légende et explications – Figure 2:

L'unité de densitométrie des rats témoins a été arbitrairement définie comme étant 100%

Les données sont la moyenne +/- l'erreur standard de 10 expériences dans chaque groupe

A droite dans la figure, ce sont les produits de PCR séparés sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium, un agent intercalant qui rend l'ADN fluorescent. Il s'agit d'un exemple représentatif

* Signifie une différence statistiquement significative ($p < 0,01$) en comparant les sérums provenant de sujets humains avec IRC aux sujets humains témoins

1 Insuffisance rénale chronique

2 Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

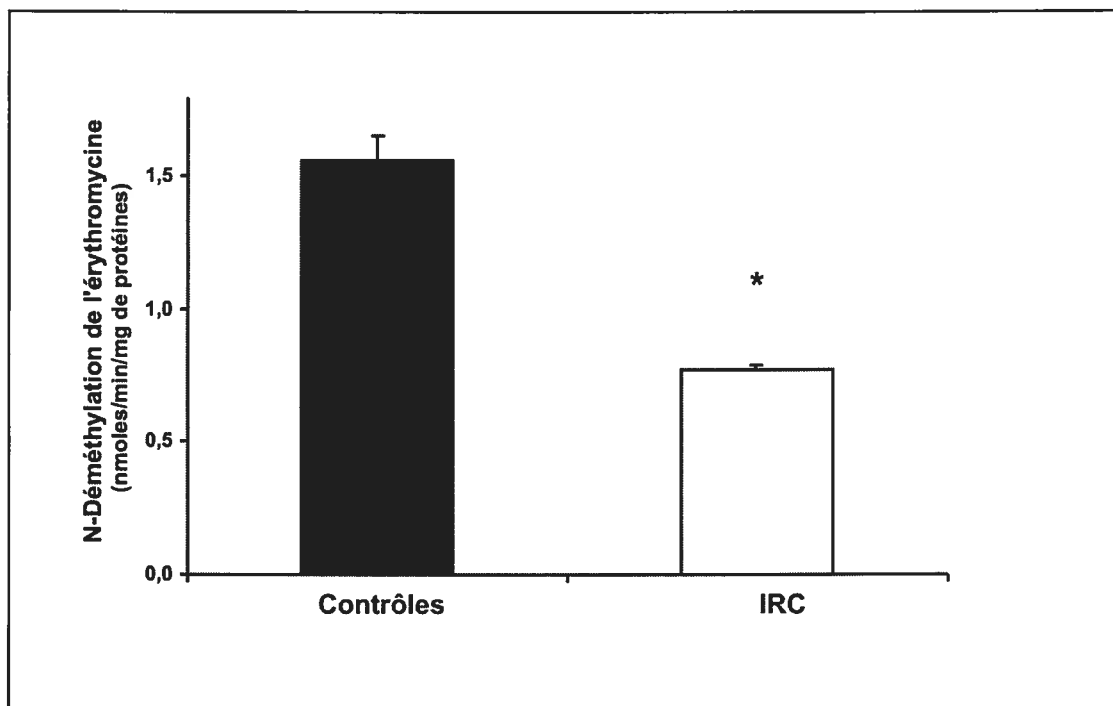
3.4 Métabolisme *in vitro* de l'érythromycine et mesure du métabolisme et de l'activité de la 7-éthoxyrésorufin O-dééthylase (EROD) dans les hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

Dans les sections précédentes, nous avons montré que l'expression du CYP450 est significativement diminuée dans des hépatocytes cultivés en présence de sérum de patients avec IRC. Il est néanmoins important de vérifier si ces diminutions ont des répercussions mesurables sur l'activité des isoformes. Nous avons donc mesuré l'activité métabolique du CYP450 sur deux substrats spécifiques soit l'érythromycine et la 7-éthoxyrésorufine. À partir d'hépatocytes cultivés en présence de sérum de patients avec IRC, nous avons préparé des fractions enrichies de microsomes. Ces préparations ont permis de concentrer le CYP450 et de mesurer plus facilement l'activité de ses différentes isoformes.

L'érythromycine est métabolisée majoritairement par l'isoforme 3A2 du CYP450 qui, par N-déméthylation, va provoquer la formation d'une molécule de formaldéhyde qui sera ensuite dosée par la réaction de Nash. Pour l'éthoxyrésorufine, le métabolisme dépend essentiellement des isoformes 1A1 et 1A2 du CYP450. La réaction catalysée par ces enzymes est une O-dééthylation qui produit de la résorufin qui est un produit fluorescent, donc facilement quantifiable.

Nos résultats montrent que l'activité N-déméthylase (CYP3A2) était diminuée de 51% ($p < 0.001$) dans les hépatocytes cultivés en présence de sérum de patients avec IRC (Figure 3). De son côté, l'activité O-dééthylase (CYP1A) était diminuée de 59% ($p < 0.001$) par rapport au témoin (Figure 4). La culture d'hépatocytes normaux, en présence de sérum de patients avec IRC, influence donc significativement non-seulement l'expression mais aussi l'activité du CYP450.

Figure 3 Activité *in vitro* de la N-déméthylation de l'érythromycine dans des microsomes préparés à partir d'hépatocytes de rats normaux préalablement incubés 24 heures dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC¹ comparé à des témoins incubés dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains sans IRC



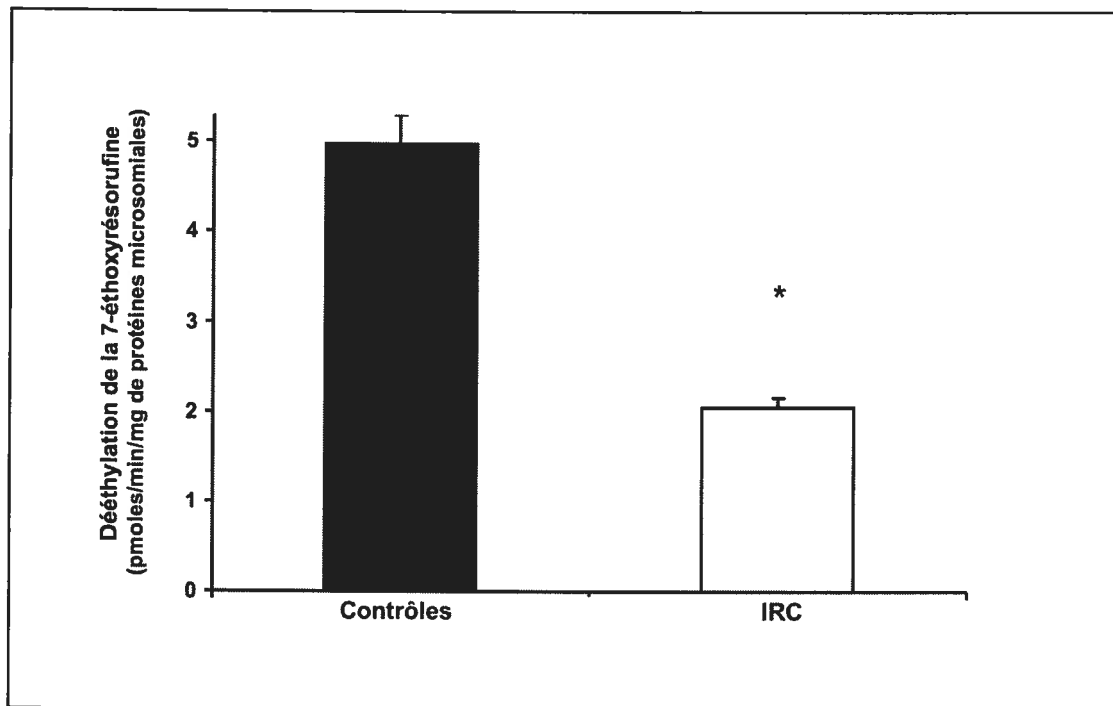
Légende et explications – Figure 3 :

Les données sont la moyenne \pm l'erreur standard de 5 expériences dans chaque groupe

* Signifie une différence statistiquement significative de $p < 0,001$

1 Insuffisance rénale chronique

Figure 4 Activité *in vitro* de la dééthylation de la 7-éthoxyrésorufin o-dééthylase dans des microsomes préparés à partir d'hépatocytes de rats normaux préalablement incubés 24 heures dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC¹ comparé à des témoins incubés dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de sujets humains sans IRC



Légende et explications – Figure 4 :

Les données sont la moyenne +/- l'erreur standard de 5 expériences dans chaque groupe

* Signifie une différence statistiquement significative de $p < 0,001$

1 Insuffisance rénale chronique

3.5 Influence de la composition biochimique du sérum sur le taux d'expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

Tous les sérums testés provenant de sujets avec IRC ont produit une diminution significative de l'expression des différentes isoformes du CYP450 testées (Figure 1). Nous avons observé une variation dans l'amplitude de l'expression des différentes isoformes du CYP450. Nous avons constaté que cette dernière n'était pas due à l'étiologie de l'IRC. De plus, nous avons observé une corrélation négative significative entre la chute de l'expression du CYP450 3A2 mesuré par immunobavardage de type Western et la créatininémie pré-dialyse et le niveau sérique de la PTH ($p < 0,001$). Inversement, nous avons observé une corrélation positive significative entre le taux d'expression de l'isoforme 3A2 du CYP450 avec le taux de filtration glomérulaire ($p < 0,001$). La Figure 5 nous montre la corrélation que nous avons observée entre le taux d'expression de l'isoforme 3A2 du CYP450 et la créatinine sérique. La Figure 6 nous montre la corrélation que nous avons observée entre le taux d'expression de l'isoforme 3A2 du CYP450 et le niveau sérique de la parathormone.

3.6 Détermination du poids moléculaire du ou des facteurs influençant l'expression du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats incubés pendant 24 heures dans un milieu de culture contenant 10% de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

Par ultrafiltration, les sérums provenant des sujets humains ont été séparés en 2 fractions en fonction de la taille des constituants. Dans cette première étape, nous avons observé que l'activité inhibitrice du sérum avait un poids moléculaire situé entre 0 et 30 kD. De cette fraction, nous avons obtenu des sous-fractions par HPLC. Parmi les différentes sous-fractions de l'HPLC, le ou les facteurs ayant la capacité de diminuer l'expression ainsi que les niveaux d'ARN messager du CYP3A2 étaient présents dans la

fraction contenant des protéines de poids moléculaire variant de 10 à 15kD (Figure 7). Les autres fractions et sous-fractions n'avaient aucun effet sur l'expression de l'isoforme 3A2 du CYP450 hépatique.

Figure 5 Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 en fonction de la créatinine sérique (n=14)

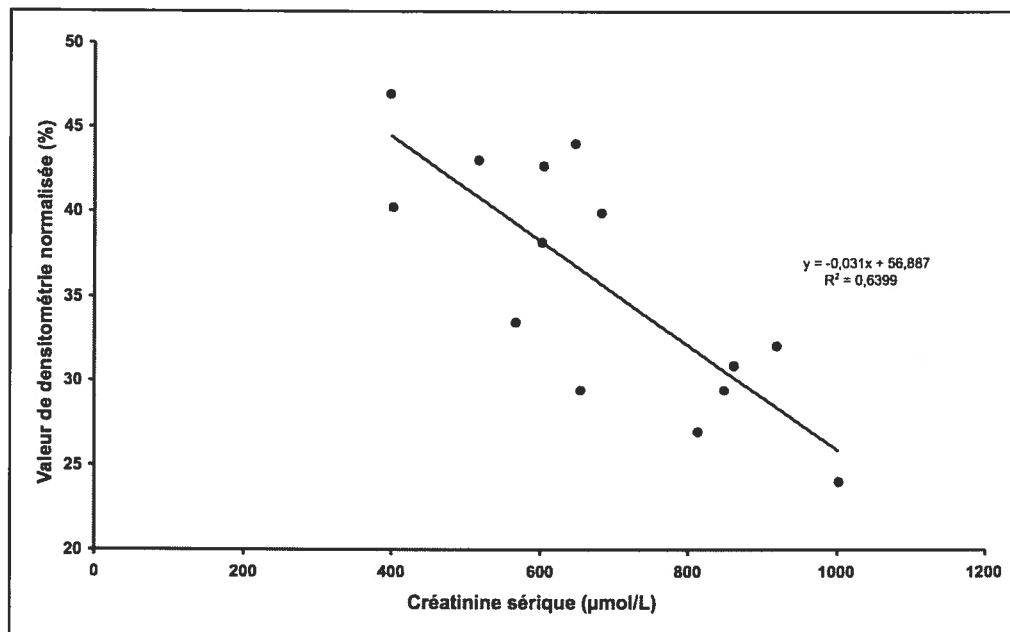


Figure 6 Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 en fonction du dosage sérique de la parathormone (n=14)

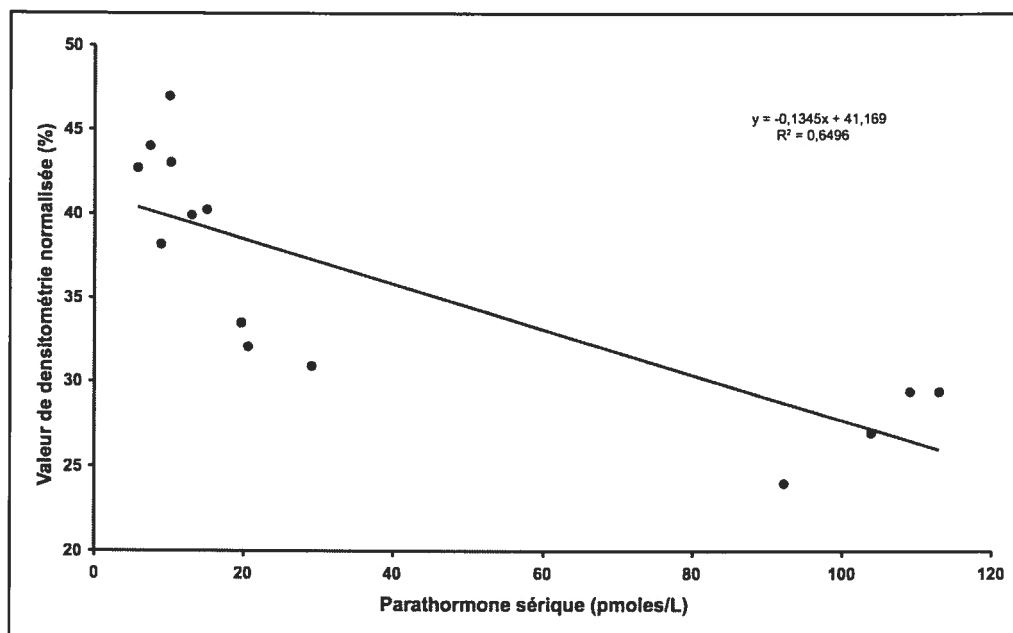
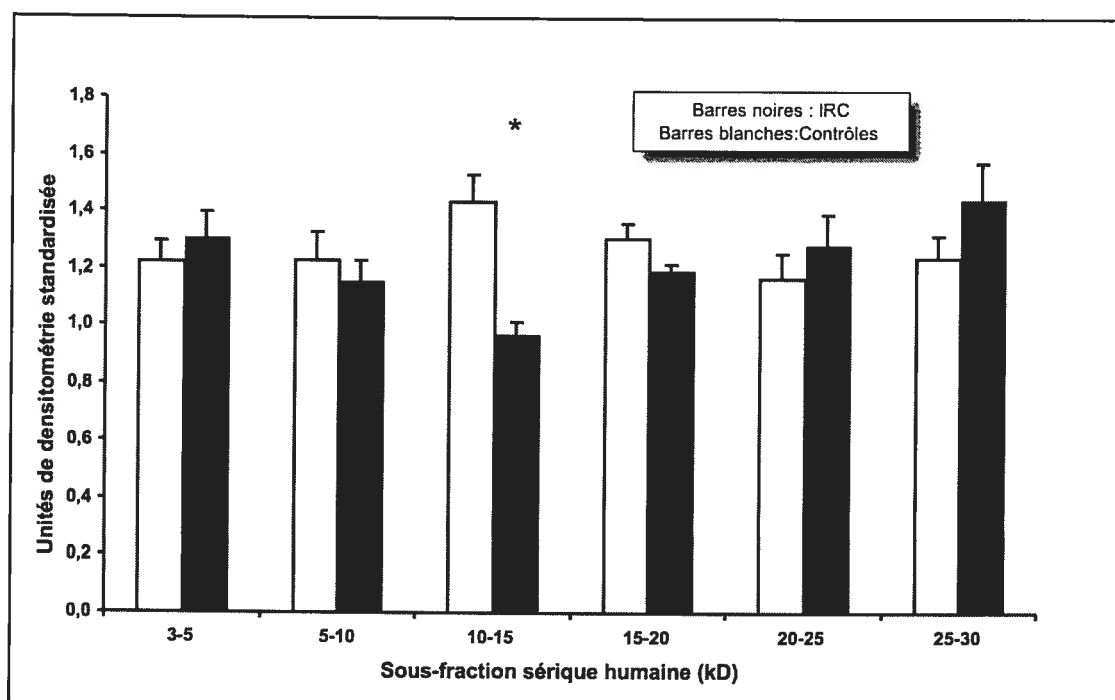


Figure 7 Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 en fonction des différentes sous-fractions sériques provenant de sujets humains obtenues par HPLC et dans lesquelles les hépatocytes de rats normaux ont été incubés



Légende et explications – Figure 7 :

Les résultats sont exprimés en unité de densitométrie

Les données proviennent de la moyenne \pm l'erreur standard de 6 expériences

* Signifie une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) en comparant les sérums provenant de sujets humains IRC aux sujets humains témoins

1 Insuffisance rénale chronique

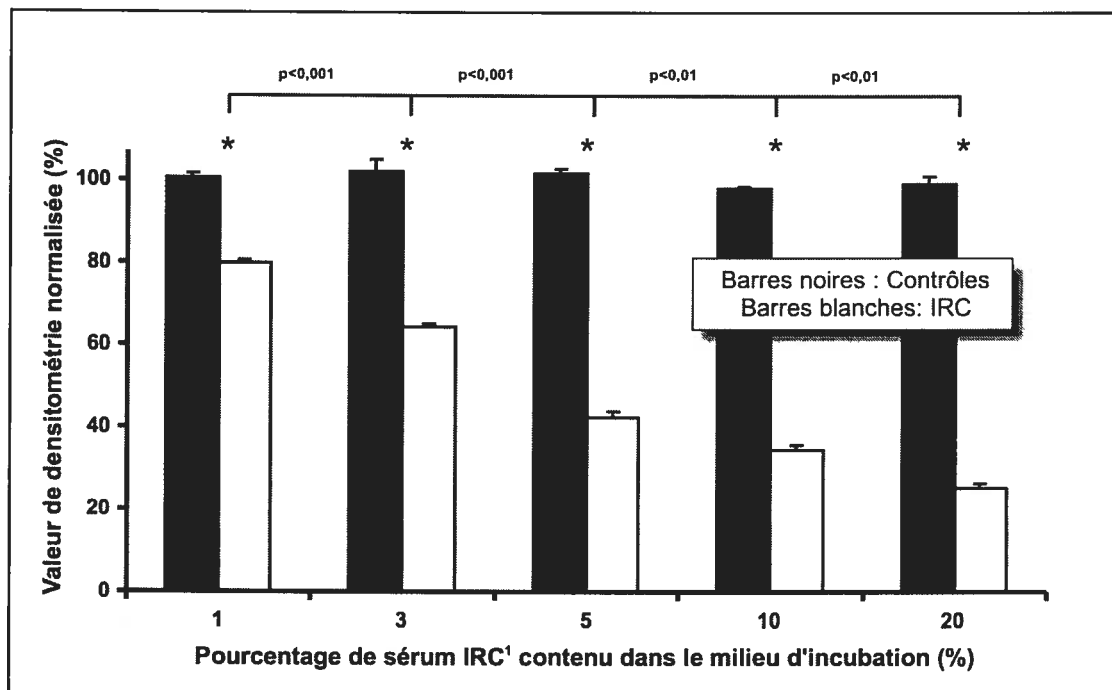
3.7 Effet de la concentration du sérum dans le milieu d'incubation sur l'expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés pendant 24 heures dans un milieu d'incubation contenant des concentrations variables de sérum provenant de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

L'inhibition du cytochrome P450 induite par le sérum provenant de sujets humains avec IRC était reliée à la concentration de sérum (et des TU) provenant de sujets humains IRC dans le milieu d'incubation. Comparé aux témoins, nous avons observé une diminution progressive de l'expression de l'isoforme 3A2 dans les hépatocytes de rats normaux lorsque ces derniers étaient cultivés dans du milieu de culture constitué de doses croissantes de sérums provenant de sujets humains avec IRC (Figure 8). Par ailleurs, nous n'avons observé aucune différence dans l'expression de la GAPDH entre les 2 groupes (non-montré).

3.8 Effet de l'hémodialyse chronique sur les facteurs inhibiteurs du cytochrome P450 hépatique provenant du sérum de sujets humains avec IRC vs sans IRC (témoins)

Cette expérience a été conçue pour savoir si le fait de débiter l'hémodialyse chez un patient avec IRC, et ainsi retirer du sérum les facteurs urémiques potentiellement responsables de l'inhibition du CYP450 hépatique, avait un impact sur l'expression du CYP450 hépatique. A la Figure 9, nous voyons que le fait de dialyser des patients avec IRC pendant au moins un mois n'a pas modifié le profil d'expression du CYP450 3A2 dans les hépatocytes de rats normaux. Nous avons remarqué que la baisse de profil d'expression, notée avant l'amorce de la dialyse chez ces sujets, s'est maintenue malgré la dialyse. Les mêmes résultats ont été obtenus après 6 mois de dialyse. Nous n'avons pas observé de modification dans le profil d'expression de la GAPDH entre ces groupes.

Figure 8 Effet de différentes concentrations du sérum provenant de sujets humains avec IRC¹ dans le milieu d'incubation des hépatocytes de rats normaux sur l'expression du CYP3A2 comparé à des témoins incubés dans un milieu d'incubation constitué de différentes concentrations équivalentes de sérum provenant de sujets humains sans IRC



Légende et explications – Figure 8 :

Les résultats sont exprimées en unité de densitométrie (%)

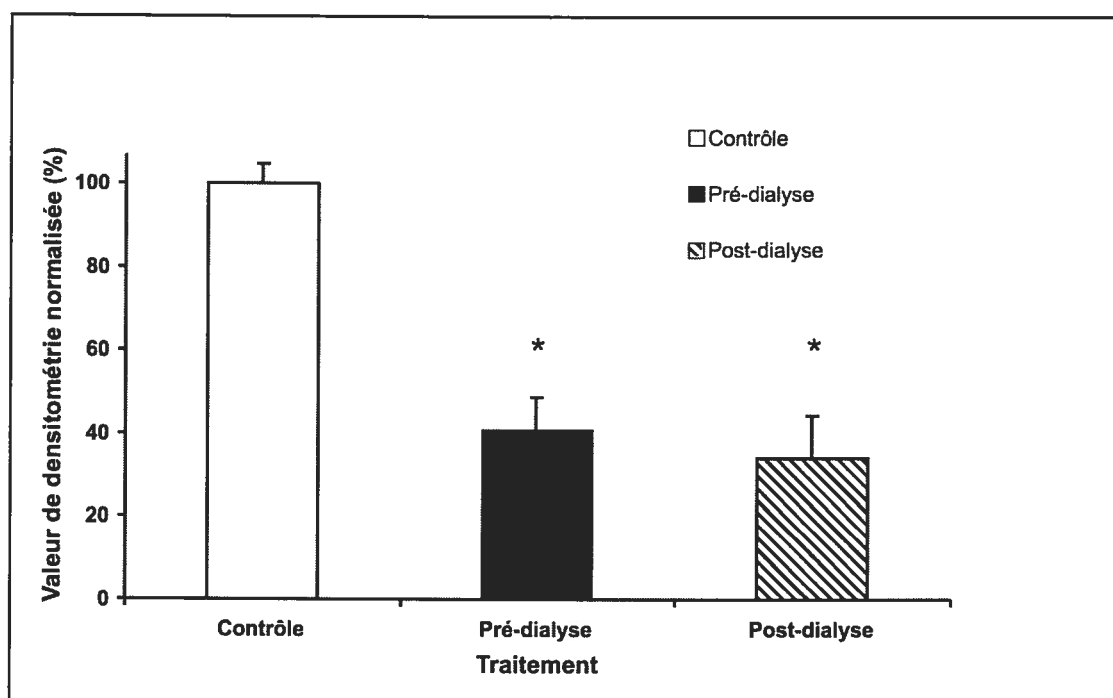
Les témoins ont été arbitrairement définis comme étant 100% de la valeur témoin normalisée

Les données proviennent de la moyenne \pm l'erreur standard de 6 expériences

* Signifie une différence statistiquement significative ($p < 0,001$) en comparant les sérums provenant de sujets humains IRC aux sujets humains témoins

1 Insuffisance rénale chronique

Figure 9 Expression de l'isoforme 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de sujets humains avec IRC¹ avant la première session de dialyse et après un mois de dialyse comparé à un groupe témoin



Légende et explications – Figure 9 :

Les brésultats sont exprimées en unité de densitométrie (%)

Les témoins ont été arbitrairement définis comme étant 100% de la valeur témoin normalisée

Les données proviennent de la moyenne \pm l'erreur standard de 8 expériences

* Signifie une différence statistiquement significative ($p < 0,01$) en comparant les sérums provenant de sujets humains IRC aux sujets humains témoins

1 Insuffisance rénale chronique

3.9 Effets de la transplantation rénale sur les facteurs inhibiteurs du cytochrome P450 hépatique provenant du sérum de sujets humains avec IRC

Cette expérience a été conçue pour savoir si le fait d'effectuer une transplantation rénale chez un patient avec IRC avait un impact sur l'expression du CYP450 hépatique.

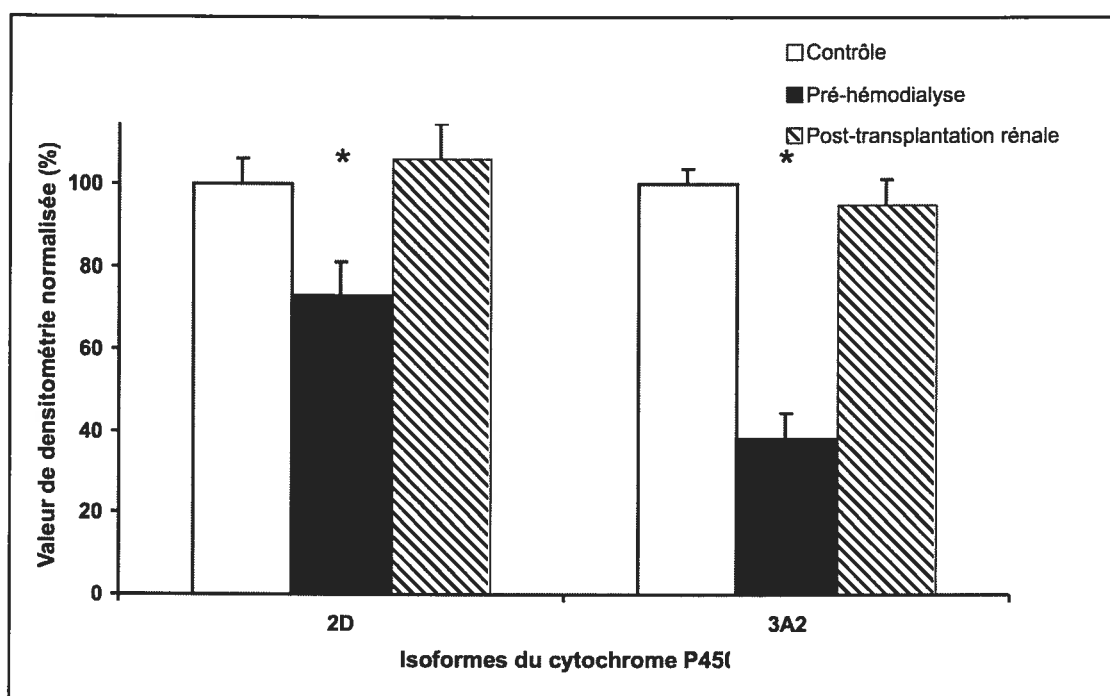
La Figure 10 montre une diminution dans l'expression des isoformes 2D et 3A2 du CYP450 hépatique lorsque l'on compare l'expression de ces 2 isoformes dans des hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu d'incubation constitué à 10% de sérum provenant de patients avec IRC sous dialyse, à du sérum provenant des mêmes patients après une transplantation rénale.

Nous avons choisi d'étudier l'isoforme 2D, en plus du 3A2, car elle n'est pas induite par la présence de stéroïdes.

Tel que montré dans la Tableau V, les taux de filtration glomérulaire de ces patients après la transplantation rénale étaient à peu près normaux.

Nous n'avons pas observé de modification dans le profil d'expression de la GADPH entre ces groupes.

Figure 10 Expression des isoformes 2D et 3A2 du cytochrome P450 dans des hépatocytes de rats normaux incubés dans un milieu de culture contenant 10% de sérum de sujets humains avec IRC¹ avant la première session de dialyse et durant le deuxième mois après une greffe rénale réussie comparé à un groupe témoin



Légende et explications – Figure 10 :

Les résultats sont exprimées en unité de densitométrie (%)

Les témoins ont été arbitrairement définis comme étant 100% de la valeur témoin normalisée

Les données proviennent de la moyenne \pm l'erreur standard de 8 expériences

* Signifie une différence statistiquement significative ($p < 0,01$) en comparant les sérums provenant de sujets humains IRC aux sujets humains témoins

1 Insuffisance rénale chronique

CHAPITRE IV – DISCUSSION

Cette étude démontre que chez l'humain, le sérum de patients souffrants d'IRC contient des médiateurs capables d'induire une baisse marquée du CYP450 hépatique total. Cette baisse est secondaire à une réduction de l'expression protéique de plusieurs isoformes du CYP450. De plus, une fois sous hémodialyse, cet effet inhibiteur persiste sur le CYP450. Cependant, cet effet est renversé après une transplantation rénale. Il apparaît donc que les mécanismes responsables de cette régulation à la baisse de l'expression des isoformes du CYP450 passent par une réduction de l'ARN messager codant pour ces protéines. De plus, les répercussions qu'entraînent ces modifications sur le métabolisme des médicaments sont importantes, car nous démontrons dans cette étude une diminution dans la biotransformation de l'érythromycine et dans l'activité de la 7-éthosyrésorufin O-dééthylase, médiée respectivement par les isoformes 3A2 et 1A du CYP450 hépatique.

Plusieurs études ont démontré que les patients atteints d'IRC présentent une diminution du métabolisme des médicaments^{102, 134, 135}. Ces études nous montrent que chez les patients avec IRC, il y a une baisse de la clairance métabolique de nombreux médicaments. Cette baisse varie de 19 à 80%^{3, 4, 18, 102}. La vaste majorité de ces médicaments sont métabolisés par le CYP450 hépatique, suggérant ainsi une diminution de ce dernier. De fait, certains auteurs ont démontré une diminution de la clairance métabolique de la spartéine en présence d'IRC, ce qui témoigne d'une diminution de l'activité de l'isoforme 2D6^{105, 136}. D'autres ont démontré une baisse de l'activité des isoformes 2C9 et 3A, toujours chez des patients atteints d'IRC^{62, 105, 136, 137}. De nombreuses études faites chez l'animal corroborent ces données observées chez l'humain^{50, 108-111, 138}. Finalement, dans une étude antérieure, nous avons déjà démontré une diminution de l'ARN messager codant pour le CYP450 hépatique chez le rat avec IRC, suggérant une baisse de l'expression génique du CYP450 hépatique chez ceux-ci⁵⁰.

Malgré toutes ces données, les mécanismes sous-jacents à cette baisse du CYP450 hépatique en présence d'IRC demeurent mal compris. Terao *et al*¹³⁹ ont démontré en 1985 que lorsque l'on perfuse des foies de rats en santé avec du sérum de rats avec IRC, il y a une diminution de l'extraction de 1-propanolol. Cette étude nous donnait les premières évidences de la présence d'un facteur inhibiteur circulant dans le sang des sujets avec IRC, facteur qui pouvait modifier le profil de biotransformation de certains médicaments. De notre côté, nous avons récemment démontré que le sérum de rats avec IRC contient des médiateurs capables de régulariser à la baisse le CYP450 hépatique⁴⁹.

Il y a aussi d'autres données qui supportent la présence de facteurs inhibiteurs du CYP450 hépatique dans le sérum de sujets avec IRC. A cet effet, Taburet a démontré que le sérum de patients avec IRC pouvait régulariser à la baisse le métabolisme du midazolam et de la tolbutamide, 2 produits transformés grâce au CYP450, principalement les isoformes 3A4 et 2C9¹¹⁴. Dans la présente étude, nous montrons clairement que le sérum provenant de patients avec IRC contient des médiateurs capables d'inhiber le CYP450 hépatique. Ainsi, nous observons une diminution de 33% du CYP450 hépatique total en plus d'une diminution marquée de l'expression protéique de plusieurs isoformes de ce dernier : 1A2, 2C6, 2D, 3A2 et 4A. Ces résultats correspondent de près à ce qui a déjà été publié *in vivo* chez le rat avec IRC et chez l'humain avec IRC^{50, 51, 62, 137}.

L'isoforme humaine 3A4 correspond à l'isoforme 3A1/3A2 chez le rat et nos résultats démontrent une diminution marquée de cette isoforme. Qui plus est, nous montrons dans cette étude faite avec des hépatocytes de rats, que le métabolisme *in vitro* de l'érythromycine (un substrat spécifique à l'isoforme 3A) est réduit de façon significative. La même chose est rapportée chez l'humain avec le métabolisme *in vitro* de l'érythromycine¹¹⁵. La connaissance de quelles isoformes sont réduites en IRC est essentielle afin de prédire quels médicaments sont à risque d'accumulation lorsqu'utilisés chez un patient souffrant d'IRC. Ainsi, étant donné que l'isoforme 3A4 est responsable du métabolisme de plusieurs médicaments utilisés chez les patients avec

IRC, ces derniers sont à risque d'accumulation de ces médicaments dans leur sang si aucune précaution n'est prise.

Il semble y avoir une corrélation entre la diminution du métabolisme de certains médicaments et la sévérité de l'IRC chez l'humain¹⁴⁰. En lien avec cette information, nous montrons dans notre étude une forte corrélation entre la fonction rénale résiduelle au moment de débiter la dialyse et la baisse d'expression du CYP450 induite par l'urémie en plus de montrer une corrélation entre la « dose » de médiateurs (concentration des sérums) et l'inhibition du CYP450. Ces résultats suggèrent qu'à mesure que l'IRC progresse chez un patient, le risque d'accumulation des médicaments administrés à ce dernier progresse, entraînant un risque accru de toxicité et d'effets secondaires.

La présente étude démontre une association entre la diminution de l'expression protéique de certaines isoformes du CYP450 et les niveaux d'ARN messenger dans les hépatocytes de rats normaux, soumis à un milieu d'incubation contenant du sérum provenant de patients avec IRC. Cela suggère que l'expression génique est réduite par des médiateurs présents dans le sérum des patients urémiques. D'ailleurs, un certain nombre d'études montrent une altération de la synthèse protéique par diminution de l'expression génique chez l'animal, que se soit dans le foie, le muscle squelettique ou le muscle cardiaque¹⁴¹⁻¹⁴³. Nous avons montré dans cette étude que toutes les protéines ne sont pas inhibées par les facteurs urémiques. La diminution de synthèse protéique du foie n'est pas complète puisque certaines isoformes du cytochrome P450 restent inchangées. Par exemple, les niveaux de la 2E1 ne sont pas affectés par l'IRC et c'est vraisemblablement parce que les voies de signalisation de cette isoforme sont différentes et ne sont pas sensibles aux mêmes agents modulateurs. Cette question fait d'ailleurs partie de la suite de nos recherches portant sur les voies de signalisations intracellulaires impliquées dans la régulation du cytochrome P450.

Nos résultats démontrent que la dialyse chronique, même après 6 mois d'utilisation, ne parvient pas à modifier l'effet inhibiteur du sérum urémique, suggérant que les

médiateurs responsables des changements observés sont encore présents même chez le patient dialysé. Des études pharmacocinétiques faites chez l'humain confirment ces données en démontrant une diminution de la clairance métabolique de plusieurs médicaments même chez des patients avec IRC sous dialyse^{3, 18, 62}. Cependant, les répercussions de la dialyse sur le CYP450 ont été peu étudiées.

Des données provenant d'études animales suggèrent que l'exposition aux plastiques durant l'hémodialyse (par relâches de substances contenues dans la tubulure) pourrait être associée à une induction du CYP450. En effet, le di-(2-éthylhexyl)-phtalate, une substance contenue dans la tubulure, pourrait induire le CYP450 hépatique total en plus d'augmenter la clairance de l'antipyrine¹⁴⁴. Cependant, cet effet n'a pas été observé avec le sérum de nos patients avec IRC. D'autre part, des données récentes obtenues chez des patients avec IRC traités par hémodialyse ont montré que l'activité des isoformes 2C9 et 3A était significativement réduite^{3, 62}. Nos résultats suggèrent que ce phénomène est secondaire à la présence de facteurs circulants.

La normalisation de la fonction rénale par transplantation rénale renverse complètement l'effet inhibiteur de sérum provenant des patients IRC sur le CYP450, lorsque l'on compare le sérum obtenu des mêmes patients avant transplantation (sous hémodialyse) et après transplantation. Bien qu'aucune étude n'ait été faite sur le CYP450 dans un contexte de transplantation rénale, certains auteurs ont rapporté une augmentation de la clairance métabolique de certains médicaments après une transplantation rénale réussie, comparée aux mêmes patients avant qu'il ne soient transplantés^{106, 145}. La clairance non-rénale de l'isonazide et du métoprolol augmente significativement après une transplantation rénale réussie, comparée à la clairance observée pendant l'hémodialyse.

Nous constatons que le sérum des patients avec IRC inhibe le CYP450 hépatique. Un ou des facteurs, présents dans le sérum des patients avec IRC, peuvent moduler cette inhibition. Quels sont ces facteurs? Ils sont certes mal connus pour l'instant. Des cytokines pourraient agir à titre de médiateurs. En effet, celles-ci semblent capables

d'inhiber le CYP450^{69, 146, 147}. Bien qu'attrayante, nous privilégions une autre piste, celle de la parathormone.

Nous croyons que la parathormone pourrait être le facteur circulant responsable des répercussions observées. Cette hormone, présente en quantité supraphysiologique chez les patients avec IRC, est responsable de nombreuses complications chez les patients urémiques. Plus spécifiquement, on sait que la PTH inhibe l'ARN messenger de plusieurs protéines telles que les lipases hépatiques, les récepteurs de la vasopressine et l'angiotensine II^{116, 117, 142, 148}. Récemment, il a été démontré que la résistance à l'IGF-1 présente chez les sujets avec IRC était réversible si on soumettait les sujets à une parathyroïdectomie¹⁴³, suggérant un rôle de la PTH dans cette résistance. Cette action semble médiée par une augmentation de l'AMP cyclique et/ou du calcium intracellulaire¹⁴⁹. D'ailleurs, l'élévation du calcium intracellulaire, présente chez les sujets avec IRC, semble un facteur important pour expliquer la dysfonction cellulaire rencontrée. De plus, le poids moléculaire de la parathormone est d'environ 12 kD et nous avons trouvé que la fraction sérique inhibitrice était celle dont le contenu protéique variait de 10 à 15 kD. Enfin, si on incube des hépatocytes ou des entérocytes de rats en présence de parathormone, nous observons une inhibition de l'expression des protéines et de l'ARN messenger des isoformes CYP2C11 et CYP3A1.

CHAPITRE V – CONCLUSION

Le métabolisme des médicaments est complexe et de nombreuses interactions existent entre les voies d'élimination rénale et hépatique. Aucun de ces systèmes ne peut être considéré seul, mais plutôt comme faisant partie d'un tout, comme étant des constituants importants d'un seul système où l'on commence à comprendre les nombreuses interactions qui existent entre ces voies d'élimination et de métabolisme des médicaments.

En conclusion, le sérum des patients avec IRC contient des médiateurs qui peuvent régulariser à la baisse le CYP450 d'hépatocytes normaux. Ces médiateurs diminuent l'expression protéique de plusieurs isoformes du CYP450 hépatique: 1A2, 2C6, 2D, 3A2 et 4A. Cette diminution d'expression est liée à une diminution des niveaux d'ARN messager qui code pour ces protéines.

Le métabolisme des médicaments, évalué par la N-déméthylation de l'érythromycine et de la 7-éthosyrésorufin O-dééthylase a été réduit par les médiateurs sériques contenu dans le sérum des patients avec IRC. Ces résultats suggèrent que le(s) médiateur(s) urémique(s) pourrai(en)t être responsable(s) de l'inhibition *in vivo* du métabolisme des médicaments observés chez les patients avec IRC.

Les médiateurs de cette inhibition pourraient être des cytokines pro-inflammatoires mais nous avons de bonnes raisons de croire que la parthormone pourrait être une piste intéressante.

Finalement, le fait de normaliser la fonction rénale par une transplantation rénale renverse cet effet inhibiteur du sérum des patients avec IRC sur le CYP450 hépatique.

CHAPITRE VI – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Leblanc P, Aiache J, Besner J, et al. Traité de biopharmacie et de pharmacocinétique. Troisième ed. Montréal, 1997.
2. Rowland RR, Tokuda S. Dual immunomodulation by met-enkephalin. *Brain Behav Immun* 1989; 3(2):171-4.
3. Pichette V, Leblond F. Metabolism of drugs in chronic renal failure. *Recent Res Devel Drug Metabol Disposition* 2002; 1:43-56.
4. Pichette V, Leblond FA. Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* 2003; 4(2):91-103.
5. Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, et al. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1992; 13(10):1789-94.
6. Brosen K. Recent developments in hepatic drug oxidation. Implications for clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1990; 18(3):220-39.
7. Kumar GN, Surapaneni S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med Res Rev* 2001; 21(5):397-411.
8. Dekant W. Chemical-induced nephrotoxicity mediated by glutathione S-conjugate formation. *Toxicol Lett* 2001; 124(1-3):21-36.
9. Glatt H, Boeing H, Engelke CE, et al. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutat Res* 2001; 482(1-2):27-40.
10. Ritter JK. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact* 2000; 129(1-2):171-93.
11. Krishna DR, Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 1994; 26(2):144-60.

12. Ortiz de Montellano PR, Augusto O, Viola F, Kunze KL. Carbon radicals in the metabolism of alkyl hydrazines. *J Biol Chem* 1983; 258(14):8623-9.
13. Liston HL, Markowitz JS, DeVane CL. Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21(5):500-15.
14. Balant LP, Dayer P, Fabre J. Consequences of renal insufficiency on the hepatic clearance of some drugs. *Int J Clin Pharmacol Res* 1983; 3(6):459-74.
15. Pichette V, du Souich P. Role of the kidneys in the metabolism of furosemide: its inhibition by probenecid. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(2):345-9.
16. Lohr JW, Willsky GR, Acara MA. Renal drug metabolism. *Pharmacol Rev* 1998; 50(1):107-41.
17. Lam YW, Banerji S, Hatfield C, Talbert RL. Principles of drug administration in renal insufficiency. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32(1):30-57.
18. Dreisbach AW, Lertora JJ. The effect of chronic renal failure on hepatic drug metabolism and drug disposition. *Semin Dial* 2003; 16(1):45-50.
19. Kim RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev* 2002; 34(1-2):47-54.
20. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:361-98.
21. Tanigawara Y. Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Ther Drug Monit* 2000; 22(1):137-40.
22. Li M, Hurren R, Zastawny RL, et al. Regulation and expression of multidrug resistance (MDR) transcripts in the intestinal epithelium. *Br J Cancer* 1999; 80(8):1123-31.
23. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, 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.

24. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, et al. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 1999; 62(1-2):25-31.
25. Murakami T, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Factors affecting the expression and function of P-glycoprotein in rats: drug treatments and diseased states. *Pharmazie* 2002; 57(2):102-7.
26. Zhou S, Lim LY, Chowbay B. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 2004; 36(1):57-104.
27. Goto M, Masuda S, Saito H, Inui K. Decreased expression of P-glycoprotein during differentiation in the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(1):163-70.
28. Veau C, Leroy C, Banide H, et al. Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16(8):1607-14.
29. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958; 75(2):376-86.
30. Bernhardt R. Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1996; 127:137-221.
31. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6(1):1-42.
32. Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes. *In* Montellano Od, ed. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. New York: Plenum Press, 1995. pp. 473-536.
33. Mimura M, Baba T, Yamazaki H, et al. Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1993; 21(6):1048-56.

34. Watkins PB. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21(3):511-26.
35. Gonzalez F. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 1989; 40:243-88.
36. Mansuy D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1998; 121(1-3):5-14.
37. Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice-drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46(2):101-10.
38. Buck ML. The cytochrome P450 enzyme system and its effect on drug metabolism. *Pediatric Pharmacotherapy* 1997; 3(5).
39. Morgan ET, Sewer MB, Iber H, et al. Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 1998; 26(12):1232-40.
40. Remmer H, Merker HJ. Drug-Induced Changes in the Liver Endoplasmic Reticulum: Association with Drug-Metabolizing Enzymes. *Science* 1963; 142:1657-8.
41. Conney AH, Miller EC, Miller JA. The metabolism of methylated aminoazo dyes. V. Evidence for induction of enzyme synthesis in the rat by 3-methylcholanthrene. *Cancer Res* 1956; 16(5):450-9.
42. Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2003; 55(4):649-73.
43. Gonzalez FJ, Tukey RH, Nebert DW. Structural gene products of the Ah locus. Transcriptional regulation of cytochrome P1-450 and P3-450 mRNA levels by 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 1984; 26(1):117-21.
44. Ameer B, Weintraub RA. Drug interactions with grapefruit juice. *Clin Pharmacokinet* 1997; 33(2):103-21.

45. El-Kadi AO, Maurice H, Ong H, du Souich P. Down-regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of mediators in human and animal serum and in the liver. *Br J Pharmacol* 1997; 121(6):1164-70.
46. Talbert RL. Drug dosing in renal insufficiency. *J Clin Pharmacol* 1994; 34(2):99-110.
47. Jansson I, Curti M, Epstein PM, et al. Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction. *Arch Biochem Biophys* 1990; 283(2):285-92.
48. Nakamura K, Goto F, Ray WA, et al. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 1985; 38(4):402-8.
49. Guevin C, Michaud J, Naud J, et al. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* 2002; 137(7):1039-46.
50. Leblond F, Guevin C, Demers C, et al. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(2):326-32.
51. Leblond FA, Petrucci M, Dube P, et al. Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(6):1579-85.
52. Renton KW. Cytochrome p450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab* 2004; 5(3):235-43.
53. Otritz de Montellano PR. Cytochrome P450, structure, mechanism, and biochemistry. Second ed. New York and London: Plenum Press, 1995.
54. Tinel M, Belghiti J, Descatoire V, et al. Inactivation of human liver cytochrome P-450 by the drug methoxsalen and other psoralen derivatives. *Biochem Pharmacol* 1987; 36(6):951-5.

55. Guengerich FP, Shimada T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 1998; 400(1-2):201-13.
56. Roberts-Thomson SJ, McManus ME, Tukey RH, et al. The catalytic activity of four expressed human cytochrome P450s towards benzo[a]pyrene and the isomers of its proximate carcinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192(3):1373-9.
57. Agundez JA. Cytochrome p450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab* 2004; 5(3):211-24.
58. Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwartz D, et al. Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res* 1989; 49(22):6304-12.
59. McManus ME, Burgess WM, Veronese ME, et al. Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450. *Cancer Res* 1990; 50(11):3367-76.
60. Lang NP, Butler MA, Massengill J, et al. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(8):675-82.
61. Wang RI, Bain JA. Cytochrome enzymes in the brain and liver of the chronically morphinized rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1953; 108(3):349-53.
62. Dreisbach AW, Japa S, Gebrekal AB, et al. Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73(5):475-7.
63. Romkes M, Faletto MB, Blaisdell JA, et al. Cloning and expression of complementary DNAs for multiple members of the human cytochrome P450IIC subfamily. *Biochemistry* 1991; 30(13):3247-55.

64. Ding XX, Pernecky SJ, Coon MJ. Purification and characterization of cytochrome P450 2E2 from hepatic microsomes of neonatal rabbits. *Arch Biochem Biophys* 1991; 291(2):270-6.
65. Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M, et al. Human cytochrome P450IIE1 gene: DraI polymorphism and susceptibility to cancer. *Tohoku J Exp Med* 1992; 168(2):113-7.
66. Kaminsky LS, Fasco MJ. Small intestinal cytochromes P450. *Crit Rev Toxicol* 1991; 21(6):407-22.
67. Wang PP, Beaune P, Kaminsky LS, et al. Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes. *Biochemistry* 1983; 22(23):5375-83.
68. Debrì K, Boobis AR, Davies DS, Edwards RJ. Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(12):2047-56.
69. Abdel-Razzak Z, Corcos L, Fautrel A, Guillouzo A. Interleukin-1 beta antagonizes phenobarbital induction of several major cytochromes P450 in adult rat hepatocytes in primary culture. *FEBS Lett* 1995; 366(2-3):159-64.
70. Kawashima H, Kusunose E, Kubota I, et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequences of human and rat kidney fatty acid omega-hydroxylases. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1123(2):156-62.
71. Sarkis A, Roman RJ. Role of cytochrome p450 metabolites of arachidonic acid in hypertension. *Curr Drug Metab* 2004; 5(3):245-56.
72. Guyton AC, Hall JE. Urine formation by the kidney. *In* Company WBS, ed. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, 2000. pp. 279-94.
73. Guyton AC, Hall JE. Micturition, diuretics, and kidney disease. *In* Company WBS, ed. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, 2000. pp. 364-79.

74. Kaysen GA, Rathore V. Derangements of protein metabolism in chronic renal failure. *Blood Purif* 1996; 14(5):373-81.
75. Pecoits-Filho R, Goncalves S, Barberato SH, et al. Impact of residual renal function on volume status in chronic renal failure. *Blood Purif* 2004; 22(3):285-92.
76. Costa J, Crausman RS, Weinberg MS. Acute and chronic renal failure. *J Am Podiatr Med Assoc* 2004; 94(2):168-76.
77. May RC MW. Pathophysiology of Uremia. *In* Brenner BM, ed. *The Kidney*. Philadelphia: WB Sanders Comapny, 1996. pp. 2148-69.
78. Vanholder R. [Uremic toxins]. *Nephrologie* 2003; 24(7):373-6.
79. Cases A. Recent advances in nephrology. *Drug News Perspect* 2003; 16(7):471-7.
80. Jablonski A. The illness trajectory of end-stage renal disease dialysis patients. *Res Theory Nurs Pract* 2004; 18(1):51-72.
81. Guyton AC, Hall JE. Protein metabolism. *In* Company WBS, ed. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, 2000. pp. 791-6.
82. Cairns HS. Management of mild to moderate chronic renal failure. *Clin Med* 2003; 3(6):499-503.
83. Czekalski S, Oko A, Pawlaczyk K, Idasiak-Piechocka I. [Chronic renal insufficiency (part I)--diagnosis]. *Pol Arch Med Wewn* 2004; 111(1):91-6.
84. Chen YL, Florentin I, Batt AM, et al. Effects of interleukin-6 on cytochrome P450-dependent mixed-function oxidases in the rat. *Biochem Pharmacol* 1992; 44(1):137-48.
85. Benfield MR. Current status of kidney transplant: update 2003. *Pediatr Clin North Am* 2003; 50(6):1301-34.

86. Iseki K, Osawa A, Fukiyama K. Evidence for increased cancer deaths in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1993; 22(2):308-13.
87. Houillier P, Nicolet-Barousse L, Maruani G, Paillard M. What keeps serum calcium levels stable? *Joint Bone Spine* 2003; 70(6):407-13.
88. Riccardi D, Gamba G. The many roles of the calcium-sensing receptor in health and disease. *Arch Med Res* 1999; 30(6):436-48.
89. Slatopolsky E, Finch J, Brown A. New vitamin D analogs. *Kidney Int Suppl* 2003(85):S83-7.
90. Ainsworth MA, Hogan DL, Rapier RC, et al. Acid/base transporters in human duodenal enterocytes. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33(10):1039-46.
91. Lewin E, Garfia B, Almaden Y, et al. Autoregulation in the parathyroid glands by PTH/PTHrP receptor ligands in normal and uremic rats. *Kidney Int* 2003; 64(1):63-70.
92. Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Brown EM. G protein-coupled extracellular Ca²⁺ (Ca²⁺_o)-sensing receptor (CaR): roles in cell signaling and control of diverse cellular functions. *Adv Pharmacol* 2000; 47:209-53.
93. Fisher JM, Wrighton SA, Watkins PB, et al. First-pass midazolam metabolism catalyzed by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃-modified Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289(2):1134-42.
94. Guyton AC, Hall JE. Parathyroid hormone, calcitonin, calcium and phosphate metabolism. *In* Company WBS, ed. *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, 2000. pp. 899-915.
95. Koyama H, Inaba M, Nishizawa Y, et al. Potentiated 1,25(OH)₂D₃-induced 24-hydroxylase gene expression in uremic rat intestine. *Am J Physiol* 1994; 267(6 Pt 2):F926-30.

96. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF. Parathyroid hormone regulates 25-hydroxyvitamin D(3)-24-hydroxylase mRNA by altering its stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24):13572-6.
97. Arnaud CD. Hyperparathyroidism and renal failure. *Kidney Int* 1973; 4(2):89-95.
98. Bistrrian BR. 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.
99. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. [Oxidative stress in chronic renal failure and hemodialysis]. *Nephrologie* 2003; 24(7):377-9.
100. Peppia M, Uribarri J, Cai W, et al. Glycooxidation and inflammation in renal failure patients. *Am J Kidney Dis* 2004; 43(4):690-5.
101. Matzke GE, Frey RF. Drug dosing in patients with impaired renal function. *In* Pipiro JT TR, Hayes PE, Yee GC, Matzke GR, Posey ML, ed. *Pharmacotherapy: A pathophysiologic basis*. New York: Elsevier Science Publishing Inc, 1992. pp. 750-763.
102. Matzke GR, Frye RF. Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* 1997; 16(3):205-31.
103. Balant LP. [Renal insufficiency and drug metabolism]. *Therapie* 1987; 42(4):393-7.
104. Cano N, Catelloni F, Fontaine E, et al. Isolated rat hepatocyte metabolism is affected by chronic renal failure. *Kidney Int* 1995; 47(6):1522-7.
105. Kevorkian JP, Michel C, Hofmann U, et al. Assessment of individual CYP2D6 activity in extensive metabolizers with renal failure: comparison of sparteine and dextromethorphan. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 59(5):583-92.
106. Kim YG, Shin JG, Shin SG, et al. Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 54(6):612-20.

107. Toon S, Ross CE, Gokal R, Rowland M. An assessment of the effects of impaired renal function and haemodialysis on the pharmacokinetics of fluconazole. *Br J Clin Pharmacol* 1990; 29(2):221-6.
108. Uchida N, Kurata N, Shimada K, 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.
109. Leber HW, Gleumes L, Schutterle G. Enzyme induction in the uremic liver. *Kidney Int Suppl* 1978(8):S43-8.
110. Leber HW, Schutterle G. Oxidative drug metabolism in liver microsomes from uremic rats. *Kidney Int* 1972; 2(3):152-8.
111. Patterson SE, Cohn VH. Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure. *Biochem Pharmacol* 1984; 33(5):711-6.
112. Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP, Pichette V. Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(11):1317-20.
113. Rosenberg DW. Dietary modulation of cytochrome P450 in the small intestinal epithelium. *Pharmacology* 1991; 43(1):36-46.
114. Seitz HK, Poschl G. The role of gastrointestinal factors in alcohol metabolism. *Alcohol Alcohol* 1997; 32(5):543-9.
115. Taburet AM, Vincent I, Perello L, et al. Impairment of drug biotransformation in renal disease an in vitro model. *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 59, 1996. pp. 136.
116. Klin M, Smogorzewski M, Massry SG. Chronic renal failure increases cytosolic Ca²⁺ of hepatocytes. *Am J Physiol* 1995; 269(1 Pt 1):G103-9.
117. Klin M, Smogorzewski M, Khilnani H, et al. Mechanisms of PTH-induced rise in cytosolic calcium in adult rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 1):G754-63.

118. Madore GR, Sherman PJ, Lane JM. Parathyroid hormone. *J Am Acad Orthop Surg* 2004; 12(2):67-71.
119. Goltzman D, Hurdy G. Parathyroid hormone. *In* Becker KL, ed. Principles and practice of endocrinology and metabolism. Philadelphia: Lippincott, 1990. pp. 402-411.
120. Carmeliet G, Van Cromphaut S, Daci E, et al. Disorders of calcium homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17(4):529-46.
121. Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, et al. Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int* 2002; 62(5):1791-8.
122. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13:29-83.
123. Palumbo C, Albonici L, Bei R, et al. HMBA induces cell death and potentiates doxorubicin toxicity in malignant mesothelioma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54(5):398-406.
124. Naud J, Leblond F, Desbien K, et al. **Primary rat enterocyte culture to study intestinal cellular drug metabolism.** *Br J Pharmacol* Submitted.
125. Tindberg N, Baldwin HA, Cross AJ, Ingelman-Sundberg M. Induction of cytochrome P450 2E1 expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Mol Pharmacol* 1996; 50(5):1065-72.
126. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
127. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 1964; 239:2370-8.
128. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259):680-5.

129. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
130. Robitaille R, Leblond FA, Henley N, et al. Alginate-poly-L-lysine microcapsule biocompatibility: a novel RT-PCR method for cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates. *J Biomed Mater Res* 1999; 45(3):223-30.
131. Paine MF, Schmiedlin-Ren P, Watkins PB. Cytochrome P-450 1A1 expression in human small bowel: interindividual variation and inhibition by ketoconazole. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(3):360-4.
132. Nash T. The calorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsh reaction. *Biochem J* 1953; 55:416-21.
133. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130(6):461-70.
134. Gibson TP. Renal disease and drug metabolism: an overview. *Am J Kidney Dis* 1986; 8(1):7-17.
135. Michaud J, Desbien K, Dézy F, et al. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 by serum from patients with chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* Submitted.
136. Rostami-Hodjegan A, Kroemer HK, Tucker GT. In-vivo indices of enzyme activity: the effect of renal impairment on the assessment of CYP2D6 activity. *Pharmacogenetics* 1999; 9(3):277-86.
137. Dowling TC, Briglia AE, Fink JC, et al. Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73(5):427-34.

138. Van Peer AP, Belpaire FM. Hepatic oxidative drug metabolism in rats with experimental renal failure. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977; 228(2):180-3.
139. Terao N, Shen DD. Reduced extraction of I-propranolol by perfused rat liver in the presence of uremic blood. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 233(2):277-84.
140. Konishi K. Pharmacokinetics of cefmenoxime in patients with impaired renal function and in those undergoing hemodialysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30(6):901-5.
141. Ding H, Gao XL, Hirschberg R, et al. Impaired actions of insulin-like growth factor 1 on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of rats with chronic renal failure. Evidence for a postreceptor defect. *J Clin Invest* 1996; 97(4):1064-75.
142. Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, et al. Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1996; 97(10):2167-73.
143. Qing DP, Ding H, Vadgama J, et al. Elevated myocardial cytosolic calcium impairs insulin-like growth factor-1-stimulated protein synthesis in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(1):84-92.
144. Pollack GM, Shen DD. Effect of renal failure and bis(2-ethylhexyl) phthalate pretreatment on the disposition and metabolism of antipyrine in the rat. *J Pharm Sci* 1984; 73(1):29-33.
145. Wright MR, Axelson JE, Rurak DW, et al. Effect of haemodialysis on metoclopramide kinetics in patients with severe renal failure. *Br J Clin Pharmacol* 1988; 26(4):474-7.
146. Abdel-Razzak Z, Corcos L, Fautrel A, et al. Transforming growth factor-beta 1 down-regulates basal and polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytochromes P-450 1A1 and 1A2 in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 1994; 46(6):1100-10.

147. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, 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.
148. Massry SG, Smogorzewski M. Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver. *Kidney Int Suppl* 1997; 62:S5-7.
149. Massry SG, Klin M, Ni Z, et al. Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats. *Kidney Int* 1995; 48(4):1324-31.