

Université de Montréal

Rôle de l'hormone parathyroïdienne dans l'inhibition du
cytochrome P450 hépatique chez le rat souffrant d'insuffisance
rénale chronique.

par
Josée Michaud

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

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

Décembre, 2005

© Josée Michaud, 2005



W

H

U58

2006

V's 85

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 :
Rôle de l'hormone parathyroïdienne dans l'inhibition du
cytochrome P450 hépatique chez le rat souffrant d'insuffisance
rénale chronique

présenté par :
Josée Michaud

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Patrick du Souich
Président-rapporteur

Dr Vincent Pichette
Directeur de recherche

Dr Yves Théorêt
Membre du jury

Résumé en français

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est associée à une réduction du métabolisme de plusieurs médicaments, particulièrement ceux métabolisés par le foie, et cette réduction est causée par une diminution du cytochrome P450 (CYP450) hépatique. C'est la présence de facteurs sériques qui cause cette inhibition du CYP450. Nous avons émis l'hypothèse que l'hormone parathyroïdienne (PTH) pourrait être un de ces facteurs. Les objectifs de ce travail étaient de déterminer 1) le rôle de la PTH dans l'inhibition du CYP450 par le sérum urémique, 2) le rôle de la PTH *in vivo* dans l'inhibition du CYP450 par l'IRC et 3) le potentiel de la PTH à moduler le CYP450 dans les hépatocytes en culture. Pour ce faire, nous avons incubé des hépatocytes de rats avec du sérum dont la PTH a été immunoneutralisée et avec du sérum provenant de rats IRC-PTX. Nous avons évalué l'effet de la parathyroïdectomie (PTX) dans un modèle *in vivo*. Finalement, nous avons évalué l'effet de la PTH 1-34 sur des hépatocytes en culture. La déplétion du sérum par les anticorps anti-PTH annihile l'effet inhibiteur du sérum IRC. La PTX élimine aussi l'effet inhibiteur du sérum de rats atteints d'IRC dans les hépatocytes en culture. L'ajout de PTH dans les cultures d'hépatocytes inhibe l'expression du CYP450. Finalement, la PTX prévient partiellement l'inhibition du CYP450 hépatique dans un modèle *in vivo*. En bref, la PTH est un des facteurs qui causent la diminution du CYP450 chez les rats atteints d'IRC.

Mots-clés : Métabolisme des médicaments, Pharmacocinétique des médicaments, Parathyroïdectomie, Hyperparathyroïdie secondaire.

Résumé en anglais

Chronic renal failure (CRF) is associated with a decreased metabolism of many drugs, especially those metabolized by the liver, due to a down-regulation of hepatic cytochrome P450 (CYP450). Down-regulation of CYP450 in both rats and humans with CRF is caused by the presence of circulating mediators. We hypothesized that parathormone (PTH) could be one of those mediators. The objectives of this study were to determine 1) the role of PTH in the inhibition of CYP450 by uremic serum, 2) the role of PTH *in vivo* in the inhibition of CYP450 by CRF and 3) the capacity of PTH to down-regulate CYP450 in cultured hepatocytes. We incubated rat hepatocytes with PTH-depleted serum and with serum taken from CRF-PTX rats. We evaluated the effect of PTH in an *in vivo* model. We then evaluated the effect of PTH 1-34 on cultured hepatocytes. Serum depletion by anti-PTH antibodies counteracts the inhibitory effect of serum from nephrectomized rats. Parathyroidectomy (PTX) also prevents the inhibitory effect of serum from nephrectomized rats in cultured hepatocytes. Adding PTH in cultured liver cells inhibits the expression of CYP450. Finally, PTX partially prevents the inhibition of hepatic CYP450 in an *in vivo* model. In short, PTH is one of the factors involved in the down-regulation of CYP450 in rats with CRF.

Keywords: Drug metabolism, Drug pharmacokinetic, Parathyroidectomy, Secondary hyperparathyroidism

Table des matières

Résumé en français	iii
Résumé en anglais.....	v
Table des matières	vi
Liste des tableaux	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations	ix
Dédicaces.....	x
Remerciements.....	xi
Introduction	1
1. IRC : Classification, étiologie, complications	1
2. Pharmacocinétique et IRC.....	4
2.1 Absorption	4
2.1.1 Vidange gastrique.....	4
2.1.2 pH gastrique	5
2.1.3 Métabolisme de premier passage intestinal	6
2.1.4 Transporteurs intestinaux	6
2.2 Distribution	8
2.2.1 Liaison à l'albumine	8
2.2.2 Liaison à la glycoprotéine acide $\alpha 1$	9
2.3 Élimination.....	9
2.3.1 Élimination rénale.....	9
2.3.2 Élimination par le métabolisme	10
2.4 Métabolisme	11
2.4.1 Généralité	11
2.4.2 Les enzymes de phase I.....	12
2.4.3 Les enzymes de phase II.....	13
2.4.4 Les enzymes de phase II et IRC	14
2.4.5 Les enzymes de phase I et IRC	15
3. Facteurs	19
3.1 PTH.....	22
4. Hypothèses.....	23
5. Objectifs.....	23
6. Article	24
7. Discussion	62
8. Conclusions.....	80
9. Références	82

Liste des tableaux

Article

Tableau 1 :
Physiological characteristics of rats.....54

Tableau 2 :
Nucleotide sequences of PCR primers.....55

Discussion

Tableau 3 :
Concentrations sériques de PTH.....63

Liste des figures

Article

Figure 1 :

Expression of CYP3A2 protein, mRNA and drug metabolizing activity in normal rat hepatocytes incubated for 24 hours with control or CRF rat sera.....56

Figure 2 :

Expression of CYP3A2 protein, mRNA and drug metabolizing activity in normal rat hepatocytes incubated for 24 hours with control, CRF or PTX-CRF rat sera.....57

Figure 3 :

Expression of CYP3A2 protein, mRNA and drug metabolizing activity in CTL or CRF rats with or without prior parathyroidectomy (PTX).....58

Figure 4 :

Dose-response effect of PTH on CYP3A2 protein and mRNA expression in rat hepatocytes incubated with various concentration of 1-34 PTH.....59

Figure 5 :

Effect of PTH $10^{-9}M$ on the CYP3A2 metabolic activity in cultured rat hepatocytes.....60

Figure 6 :

Effect of PTH on the protein expression of some other P450 isoforms in rat hepatocytes incubated with $10^{-9}M$ rat PTH.....61

Liste des sigles et abréviations

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
[Ca²⁺]_i : Calcium intracellulaire
CREB : *Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein*
CRF : *Chronic renal failure*
CYP450 : Cytochrome P450
GSK-3β : Glycogène synthase kinase 3-béta
HPTS : Hyperparathyroïdie secondaire
IFN : Interféron
IGF-1 : Facteur de croissance insulino-mimétique de type 1
IL-1 : Interleukine-1
IL-6 : Interleukine-6
IRC : Insuffisance rénale chronique
KDa : Kilodalton
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : Protéine kinase activée par des agents mitogènes
MRP2 : *Multi-drug resistance related protein* de type 2
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB : Facteur nucléaire kappa B
pH : Potentiel hydrogène
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PTH : Hormone parathyroïdienne
PTX : Parathyroïdectomie
PXR : Récepteur pregnane X
TFG : Taux de filtration glomérulaire
TGF-β : Facteur de croissance transformant bêta
TNF : Facteur de nécrose tumorale
VDR : Récepteur de vitamine D

Dédicaces

L'imagination est plus importante
que les connaissances...
Albert Einstein

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Vincent Pichette pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses encouragements et pour sa disponibilité lors de ma maîtrise. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire et en particulier Francois Leblond pour son aide dans toutes les sphères de mes recherches, Judith Naud pour son aide technique et ses encouragements, Karine Desbiens pour l'aide dans les manipulations, Caroline Boisvert, Émilie Simard, Jessica Harding et Louise Lévesque qui rendent le travail si agréable. Je remercie aussi le département de pharmacologie pour son soutien financier ainsi que les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC). Je tiens à remercier ma famille : Jocelyn, Gaétan, Lisette, Simon et mon amie Nadine qui m'ont soutenue tout au long de mes études, ainsi que les familles Michaud et Fortin, et plus particulièrement ma tante Sisi qui m'a aidée à trouver ma voie! Finalement, je tiens aussi à remercier les Docteurs Patrick du Souich, Yves Théorêt et Vincent Pichette pour la révision de ce mémoire de maîtrise.

Introduction

1. IRC : Classification, étiologie, complications

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est caractérisée par une diminution du nombre de néphrons, unités fonctionnelles du rein, causant une diminution progressive et irréversible du taux de filtration glomérulaire. La fonction rénale ne peut ainsi plus maintenir l'homéostasie de l'organisme et des complications surviennent.

L'IRC est caractérisée par plusieurs stades principalement classés selon le taux de filtration glomérulaire (TFG) qui est un excellent indicateur des dommages rénaux [1]. Premièrement, il y a le stade 1, où il y a un dommage rénal mais où le TFG est supérieur ou égal à 90 ml/min/1.73 m². Au stade 2, le dommage rénal est léger mais provoque une diminution du TFG entre 60-89 ml/min/1.73 m². Un dommage intermédiaire est associé au stade 3, le TFG est entre 30-59 ml/min/1.73 m². Au stade 4, les dommages sont plus sévères et le TFG est entre 15-29 ml/min/1.73 m². Le dernier stade est le stade 5 appelé la phase terminale de l'insuffisance rénale chronique où le TFG est inférieur à 15 ml/min/1.73 m². À cette étape, plus de 90 % des néphrons sont détruits et seuls les traitements de dialyse (*dialysis* = séparation) ou la transplantation rénale permettent la survie du patient [2].

Au Canada, 1,9 millions de personnes souffrent d'IRC (stades 1 à 5). C'est plus d'un Canadien sur quinze, dont la plupart n'ont pas encore été

diagnostiqués. Le stade 5 de l'IRC touche environ 25 000 personnes au Canada dont 5 000 personnes au Québec. La prévalence de l'IRC augmente en moyenne de 9 % par année au Canada [3].

Les coûts associés à l'IRC sont très élevés puisqu'un grand nombre de médicaments sont administrés, les hospitalisations sont fréquentes et prolongées et les infrastructures et fournitures nécessaires au traitement de dialyse des patients sont très coûteuses. Le coût d'un traitement de dialyse est de 32 000 \$ par patient pour la première année et 22 000 \$ (dollars canadiens en 1988) les années suivantes [4]. D'autres sources avancent même 160 000 \$ pour 5 années de traitement [5].

L'IRC est causée dans les deux tiers des cas par le diabète et par l'hypertension artérielle. Les autres étiologies sont les glomérulonéphrites, les maladies rénales ischémiques et certaines maladies héréditaires comme les maladies rénales polykystiques [1].

Les complications de l'IRC sont nombreuses et importantes. La filtration glomérulaire étant réduite les déchets azotés s'accumulent dans le sang (urémie). La concentration sanguine de créatinine accroît dans le sang ainsi que le potassium (hyperkaliémie), pouvant causer un arrêt cardiaque. Chez les individus atteints d'IRC, les reins sont incapables de produire suffisamment d'ammoniaque dans les tubules proximaux afin de permettre l'excrétion des acides endogènes dans l'urine sous forme d'ammonium. Cette

accumulation d'acide cause une acidose métabolique. L'oedème pulmonaire et l'hypertension sont fréquents en IRC et sont secondaires, entre autres, à une rétention hydrosodée ainsi qu'à une augmentation de la rénine qui est responsable de l'augmentation de l'angiotensine. L'érythropoïétine est synthétisée par les reins et est nécessaire à la production des globules rouges. Chez les patients souffrant d'IRC, il existe une diminution de la production d'érythropoïétine provoquant une anémie. Il y a aussi apparition d'hyperparathyroïdie secondaire (HPTS), se traduisant par des niveaux sériques élevés de parathormone, entraînant une hypocalcémie et une hyperphosphatémie. Ces désordres sont causés par une diminution de la synthèse de 1,25-dihydroxyvitamin D par le rein et peuvent mener à l'ostéopénie [1]. (Plus de détails sur l'HPTS seront donnés dans la section 2.4.5)

Les patients au stade 5 de l'IRC prennent un très grand nombre de médicaments. En effet, ces patients ingèrent en moyenne onze médicaments par jour afin de traiter les facteurs qui ont causé leur IRC (hypertension, diabète) ainsi que ses complications (HPTS, anémie) [6, 7]. Les doses de médicaments sont ajustées chez les patients au stade 3 à 5 en fonction du TFG. Malgré cet ajustement, plus de 40% des patients atteints d'IRC reçoivent des doses de médicaments trop importantes produisant ainsi des effets secondaires sérieux [8]. Ceci s'explique par le fait que l'IRC entraîne de nombreuses altérations des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des médicaments [9]. La section 2 résumera les

principales répercussions cinétiques et dynamiques chez les individus souffrant d'IRC.

2. Pharmacocinétique et IRC

Les paramètres pharmacocinétiques des médicaments, tels que l'absorption, la distribution et l'élimination, sont affectés par l'IRC entraînant des modifications de leur biodisponibilité, de leur liaison protéique et de leur clairance.

2.1 Absorption

La biodisponibilité orale d'un médicament est définie comme étant la fraction de la dose administrée d'un médicament qui atteint la circulation systémique [10]. La biodisponibilité dépend du processus d'absorption, mais aussi des phénomènes de dissolution, de premier passage et d'extrusion des médicaments par des transporteurs.

L'absorption et la biodisponibilité d'un médicament sont modifiées chez les patients atteints d'IRC puisque la maladie affecte les caractéristiques du tractus gastro-intestinal, comme la vidange gastrique et le pH gastrique, mais aussi les phénomènes de premier passage et d'extrusion des médicaments.

2.1.1 Vidange gastrique

Les patients atteints d'IRC peuvent souffrir de gastroparésie, ce qui ralentit la vidange de l'estomac [11, 12]. Le délai de la vidange gastrique

affecte la concentration sanguine maximale du médicament et aussi le temps nécessaire pour atteindre la concentration maximale, ce qui peut être un facteur limitant quand l'action du médicament doit être rapide [10].

2.1.2 pH gastrique

Plusieurs études ont démontré que le pH gastrique peut être augmenté chez les individus souffrant d'IRC. En effet, on retrouve de fortes concentrations sériques d'urée chez les patients souffrant d'IRC. Ceci est dû à une diminution de son excrétion rénale. L'uréase gastrique, en présence de ces fortes concentrations d'urée, forme de l'ammoniaque, ce qui cause une augmentation du pH gastrique [13]. De plus, de nombreux médicaments couramment consommés par les patients souffrant d'IRC ont le potentiel d'augmenter le pH gastrique et la motilité intestinale. Par exemple, de par leur fonction, les antiacides augmentent le pH gastrique de même que les inhibiteurs de la pompe à protons qui empêchent la relâche d'ions H^+ dans l'estomac, entraînant ainsi une alcalinisation des sucs gastriques [13-16]. Le pH plus élevé de l'estomac peut alors affecter la dissolution et l'ionisation des médicaments qui sont habituellement mieux absorbés dans un environnement acide et ainsi réduire leur biodisponibilité [10, 12, 15].

Par ailleurs, l'administration simultanée de certains médicaments avec d'autres contenant des molécules cationiques, par exemple les antiacides, peut entraîner la formation de composés insolubles suite à la chélation d'ions métalliques et ainsi réduire leur biodisponibilité [12, 15-17].

2.1.3 Métabolisme de premier passage intestinal

Le métabolisme de premier passage intestinal peut aussi influencer la biodisponibilité d'un médicament. Lorsqu'un médicament pris oralement passe la barrière intestinale par diffusion passive ou à l'aide d'un transport actif, il peut être métabolisé par le cytochrome P450 (CYP450) dans l'entérocyte [10, 14]. De nombreux médicaments sont métabolisés dans l'intestin par le CYP450 3A4 chez l'humain et cet isoforme compte pour le trois quart des isoformes du CYP450 contenus dans l'intestin [18]. Une diminution du CYP450 peut donc augmenter la biodisponibilité des médicaments. Il est possible que ce phénomène survienne en IRC.

Quoiqu'il n'y ait pas d'études humaines sur le sujet, quelques études animales supportent cette hypothèse. Par exemple, Leblond et al ont démontré que l'IRC est associée à une réduction d'environ 30 % de l'activité du CYP450 intestinal dans un modèle d'IRC induite par néphrectomie chez le rat. Cette diminution d'activité est secondaire à une diminution de l'expression génique [19]. *In vitro*, l'inhibition du CYP450 intestinal entraîne une réduction de la biotransformation de plusieurs médicaments, ce qui pourrait théoriquement augmenter la biodisponibilité de certains médicaments [19].

2.1.4 Transporteurs intestinaux

Les transporteurs intestinaux jouent un rôle important dans la biodisponibilité des médicaments. La P-glycoprotéine est un transporteur

retrouvé dans plusieurs organes comme l'intestin, le foie, les reins et le cerveau [20, 21]. Au niveau de l'intestin, la P-glycoprotéine permet l'extrusion des médicaments dans la lumière intestinale réduisant ainsi leur biodisponibilité. La P-glycoprotéine protège ainsi l'organisme contre l'accumulation des substances organiques en les rejetant dans la lumière intestinale, les empêchant ainsi d'atteindre la circulation systémique. Une diminution de la P-glycoprotéine aurait pour effet d'augmenter la biodisponibilité des médicaments qu'elle transporte.

Des études chez les animaux atteints d'IRC démontrent qu'il y a une diminution de l'activité de la P-glycoprotéine intestinale [22, 23]. Plus récemment dans notre laboratoire, nous avons démontré que cette diminution de l'activité de la P-glycoprotéine intestinale est attribuée à une diminution de l'expression protéique d'environ 70 % [24]. Cette inhibition de la P-glycoprotéine pourrait provoquer une augmentation de la biodisponibilité de certains médicaments puisqu'une plus grande concentration de médicaments pourrait atteindre la circulation systémique [24].

En plus de la P-glycoprotéine, il existe d'autres transporteurs intestinaux comme le *multi-drug resistance related protein* de type 2 (MPR2), qui, comme la P-glycoprotéine, se retrouve sur la surface apicale des entérocytes. Il s'agit d'un autre transporteur qui favorise la sécrétion de médicaments vers la lumière intestinale, où ils seront éliminés dans les fèces.

Chez les rats atteints d'IRC, l'expression protéique du MRP2 est diminuée de 60% alors que son activité est diminuée de 40 % [24].

En résumé, la réduction du CYP450 intestinal et des transporteurs apicaux pourrait expliquer l'augmentation de la biodisponibilité de plusieurs médicaments chez les individus atteints d'IRC.

2.2 Distribution

2.2.1 Liaison à l'albumine

Le volume de distribution d'un médicament est influencé par sa liaison aux protéines plasmatiques, aux tissus et au volume d'eau corporel. Tous ces éléments peuvent être altérés en présence d'IRC [25]. Les médicaments acides se lient à l'albumine et l'IRC réduit la liaison à l'albumine de nombreux médicaments acides [26]. En IRC, il existe deux phénomènes majeurs pour expliquer l'augmentation de la fraction libre des médicaments acides. Premièrement, il existe une réduction de la liaison à l'albumine car celle-ci est carbamylée (changement de la conformation de l'albumine causé par l'urémie), réduisant ainsi l'accès aux sites de liaison [11, 26, 27]. Deuxièmement, il existe un phénomène de compétition entre des acides organiques et certains médicaments acides [11, 26, 27]. Accessoirement, l'hypoalbuminémie, lorsqu'elle est significative, peut augmenter la fraction libre, ceci ayant été décrit pour la phénytoïne [27, 28].

En résumé, il existe une diminution de la liaison à l'albumine des médicaments acides, ce qui peut entraîner une augmentation de la fraction libre et mener à de la toxicité, particulièrement pour les médicaments à faible index thérapeutique.

2.2.2 Liaison à la glycoprotéine acide α_1

Les médicaments basiques se lient à la glycoprotéine acide α_1 [10]. La concentration sérique de cette protéine est souvent élevée chez les patients souffrant d'IRC, mais la liaison des médicaments à la glycoprotéine acide α_1 ne semble pas affectée [14, 29].

2.3 Élimination

Un médicament peut être éliminé inchangé dans la bile ou l'urine, ou être métabolisé par le foie pour en faciliter l'élimination par la bile, par la filtration glomérulaire ou la sécrétion tubulaire [30]. Ces deux voies d'élimination sont évidemment affectées chez les individus atteints d'IRC.

2.3.1 Élimination rénale

Une très grande majorité de médicaments est éliminée par les reins, soit par filtration glomérulaire, soit par sécrétion tubulaire. Premièrement, un médicament est filtré par le glomérule selon son poids moléculaire, sa liaison aux protéines plasmatiques, sa concentration dans le plasma et le débit rénal [10]. Les petites protéines peuvent être filtrées, mais un médicament lié à

l'albumine ne l'est pas. La vitesse de filtration d'un médicament est donc directement proportionnel à sa concentration libre dans le plasma [10]. Deuxièmement, un médicament peut être éliminé par les reins via la sécrétion tubulaire. Il s'agit, cette fois, d'un mécanisme actif nécessitant des transporteurs.

L'IRC est une maladie qui affecte les reins, donc qui touche toutes les étapes d'élimination rénale des médicaments, comme la filtration et la sécrétion. Chez les individus atteints d'IRC, l'élimination des médicaments par la filtration glomérulaire et par la sécrétion tubulaire est diminuée, il y a alors une plus grande concentration plasmatique, ce qui augmente le temps de demi-vie des médicaments dans le sang [25, 31, 32].

2.3.2 Élimination par le métabolisme

Un médicament peut être métabolisé avant d'être éliminé par l'organisme. Cette biotransformation permet de changer les propriétés chimiques d'un médicament afin de le rendre plus polaire et faciliter son élimination rénale ou biliaire.

L'excrétion dépend de l'hydrophilicité d'un médicament, alors que la majorité des médicaments sont lipophiliques. Si un médicament est hydrophilique, il lui sera impossible de traverser les membranes cellulaires riches en lipides, compromettant ainsi son efficacité. À l'inverse, s'il est trop lipophile, il sera complètement insoluble dans les fluides corporels. La

formulation d'une très grande majorité de médicaments sur le marché est légèrement lipophile, pour permettre aux composés de traverser facilement les membranes cellulaires tout en leur assurant une certaine solubilité dans les fluides corporels [33]. Par contre, le fait que les médicaments soient lipophiles les empêche d'être excrétés par les reins. Les agents lipophiles doivent donc être plus hydrosolubles (plus polaires) afin d'être éliminés. C'est le métabolisme qui augmente l'hydrophilicité des médicaments. Ce sont les réactions catalysées par les enzymes de phase I et de phase II qui rendent les médicaments de plus en plus polaires afin de permettre leur excrétion [33].

2.4 Métabolisme

2.4.1 Généralité

Les enzymes du métabolisme sont classées en deux types, celles de phase I et celles de phase II. Les enzymes de phase I sont les plus importantes et elles participent à la biotransformation de la majorité des médicaments. Elles catalysent des réactions d'hydrolyse, de réduction et d'oxydation [10]. Tous les jours, l'organisme est exposé à de nombreux composés chimiques appelés xénobiotiques. Ces xénobiotiques comprennent les médicaments, mais aussi les drogues et autres composés qui se retrouvent dans l'environnement, la nourriture, l'air et l'eau [34]. Toutes ces substances peuvent être biotransformées par le CYP450, de même que de nombreux composés endogènes.

En plus de métaboliser les xénobiotiques, le CYP450 participe à la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (progestérone, prégnénolone, cortisol, testostérone, estradiol), des prostaglandines et des acides gras, à l'oxydation des lipides et à l'hydrolyse de la vitamine D₃ [35]. Le CYP450 peut aussi participer à la transformation de composés non actifs en métabolites actifs ou malheureusement, en produits carcinogéniques [36].

2.4.2 Les enzymes de phase I

Le CYP450 fait partie de la famille des enzymes de phase I présente dans une foule d'organismes, du procaryote jusqu'au mammifère le plus complexe [35]. Son nom lui vient du fait qu'il possède une absorption maximale à 450 nm dans le spectre UV lorsqu'il forme un adduit avec le monoxyde de carbone [37, 38]. Plus de 1200 gènes du CYP450 ont été identifiés et plus de 1000 articles sont publiés par année sur le CYP450. Les domaines d'application du CYP450 sont nombreux : la microbiologie, la toxicologie, la physiologie, les sciences de l'environnement, la biologie végétale, la biochimie et bien sûr la pharmacologie [39].

Le CYP450 est une protéine qui possède en son centre un groupement hème. Cette hémoprotéine procède à l'ajout d'une molécule d'oxygène sur un xénobiotique. Ce processus requiert le transfert de deux électrons. Cette réaction d'oxydation ajoute une molécule d'oxygène sur le substrat et une autre sur une molécule d'eau [34].

Le CYP450 est localisé sur la membrane du réticulum endoplasmique. Chez l'humain, il est majoritairement retrouvé dans le foie, mais il est aussi exprimé dans plusieurs autres organes comme l'intestin, le cerveau, les reins, le cœur, les poumons, les testicules, le placenta, les seins, la peau, l'épithélium nasal, le pancréas et la rate [40-44]. Le site majeur du métabolisme des médicaments reste le foie où la quantité de CYP450 est très élevée.

C'est l'isoforme CYP450 3A4 qui est le plus abondant dans le foie humain (30 % du contenu hépatique total) et il participe au métabolisme de plus de 50 % des médicaments utilisés en pratique médicale [14]. Les isoformes suivants sont aussi importants dans le métabolisme des médicaments chez l'humain : CYP450 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 et 2E1 [14].

2.4.3 Les enzymes de phase II

Les réactions d'oxydation qui sont faites par le CYP450 permettent d'augmenter l'hydrophilicité des médicaments dans le but de faciliter leur excrétion ou de les préparer pour les enzymes de phase II. Les réactions de conjugaison telles que la glucuronidation, la sulfatation, la méthylation et l'ajout de glutathion sont assurées par les enzymes de phase II. L'ajout d'un groupement plus polaire par les enzymes de phase II a pour but d'augmenter encore plus l'hydrophilicité des médicaments et ainsi faciliter leur excrétion [10]. La conjugaison d'un groupement polaire nécessite des enzymes de

transfert de haute énergie de type transférase, unique à chaque type de conjugaison. Les enzymes de phase II sont localisées sur le réticulum endoplasmique ou dans le cytosol des cellules [34]. Comme pour les enzymes de phase I, la localisation principale des enzymes de conjugaison est le foie, mais on en retrouve aussi dans l'intestin, les reins, les poumons, la prostate, la peau, le cerveau et la rate [14]. La glucuronidation est la réaction de conjugaison la plus importante chez l'humain [45].

Une diminution éventuelle des enzymes de phase I et II pourrait augmenter les concentrations sériques des médicaments métabolisés par celles-ci, ce qui aurait comme conséquence de changer la pharmacocinétique des médicaments et ainsi d'accroître leurs effets secondaires [14]. Dans les sections suivantes, nous discuterons des répercussions de l'IRC sur le métabolisme des médicaments.

2.4.4 Les enzymes de phase II et IRC

Les études animales en sont encore à un stade précoce, mais plusieurs études laissent croire que, chez l'humain, certaines réactions de conjugaison sont réduites en IRC. En effet, des médicaments habituellement métabolisés par la réaction d'acétylation comme la dapsonne, l'hydrazinophtalazine, l'isoniazide et la procainamide ont une clairance métabolique diminuée chez les individus atteints d'IRC [14, 46-48]. D'autres médicaments, comme l'acétaminophène, la morphine, le lorazépam, l'oxazépam et le naproxen qui sont métabolisés par l'ajout d'un groupement

glutathion, voient leur élimination diminuée chez les patients souffrant d'IRC [14, 49, 50]. La sulfatation semble aussi diminuée chez les individus atteints d'IRC puisque le minoxidil, la dopamine et la salbutamol s'accumulent chez ces individus [14, 49]. Enfin, la réaction de méthylation semble elle aussi être affectée par l'IRC, car les médicaments comme la dobutamine, la dopamine et la 6-mercaptopurine sont plus lentement métabolisés [14, 51-53].

Toutes ces études *in vivo* ont été menées chez des humains souffrant d'IRC, donc il n'a pas encore été mis en évidence si cette diminution du métabolisme est due à une diminution de l'activité, de l'expression protéique ou de l'expression génique des différents enzymes et isoformes de phase II. Mais, il apparaît de plus en plus probable que les enzymes de phase II soient diminuées chez les patients atteints d'IRC, provoquant ainsi une augmentation de la concentration plasmatique des médicaments chez les individus souffrant d'IRC.

2.4.5 Les enzymes de phase I et IRC

La biotransformation effectuée par les enzymes de phase I a une très grande influence sur la concentration plasmatique des médicaments. S'il y a une diminution de l'activité du CYP450, alors la concentration plasmatique des médicaments métabolisés par celui-ci sera alors augmentée.

Contrairement aux enzymes de phase II, les enzymes de phase I ont été très bien documentées chez les individus atteints d'IRC. Dès 1980, des

études chez l'humain ont mis en évidence que la clairance hépatique de certains médicaments est affectée chez les patients souffrant d'IRC [29, 54-56]. Les effets de l'IRC sur le métabolisme de nombreux médicaments ont été évalués. Toutes ces études chez l'humain suggèrent qu'une diminution de l'activité des différents isoformes du CYP450 est responsable de la diminution du métabolisme hépatique de certains médicaments chez les patients présentant une IRC [57-60].

C'est en 1970 que les premières études animales ont démontré une réduction de la quantité et de l'activité du CYP450 dans les microsomes de foie de rat atteint d'IRC [61-64]. Depuis, les techniques de détection de différents isoformes tant au niveau de l'expression protéique, génique ou de l'activité se sont grandement améliorées. Notre laboratoire a été un des premiers à démontrer, à l'aide d'un modèle animal, la régulation des différents isoformes des enzymes de phase I chez les rats atteints d'IRC. Premièrement, notre équipe a évalué l'effet de l'IRC, induite par néphrectomie 5/6, sur le métabolisme hépatique *in vivo* chez le rat. Cette étude s'est intéressée à trois principaux isoformes impliqués dans le métabolisme des médicaments, soient le CYP1A2, 2C11 et 3A2. Des tests d'exhalation avec des sondes radioactives spécifiques pour ces isoformes, CYP450 1A2, 2C11 et 3A2, ont démontré une diminution significative de l'activité des isoformes du CYP450 2C11 et 3A2 chez les rats atteints d'IRC comparativement aux rats témoins, alors que l'activité du CYP450 1A2 était inchangée. En effet, le métabolisme de l'aminopyrine et de l'érythromycine

était réduit de 35% chez les rats souffrant d'IRC, alors que le métabolisme de la caféine était identique [65].

Récemment, la diminution de l'activité du CYP450 3A2 a été corroborée chez l'humain (CYP450 3A4), où l'activité, mesurée par un test d'exhalation à l'aide de l'érythromycine marquée, est diminuée de 28 % chez des patients atteints d'IRC à un stade 5 [66].

Afin d'expliquer ces différences d'activité, notre laboratoire a évalué l'expression protéique, l'expression génique et l'activité *in vitro* des différents isoformes du CYP450 hépatique chez les rats atteints d'IRC. Il a été démontré que l'expression protéique des isoformes du CYP450 2C11, 3A1 et 3A2 est diminuée de 45 %, 85 % et 65 % chez les rats souffrant d'IRC. Par contre, l'expression protéique des isoformes du CYP450 1A2, 2C6, 2D1 et 2E1 demeure inchangée. Cette diminution est associée à une réduction de l'ARNm du CYP2C11, 3A1 et 3A2, suggérant un défaut de synthèse protéique. De plus, le métabolisme *in vitro* de l'érythromycine, molécule qui évalue l'activité du CYP450 3A2, est diminué de plus de 50 % dans les microsomes de rats souffrant d'IRC [67]. Ces diminutions d'activité, d'expression protéique et génique, sont directement corrélées à la clairance de créatinine des rats atteints d'IRC.

Les causes de la diminution du CYP450 restaient encore mal comprises. L'équipe de Terao et Shen a montré que la perfusion de foie de

rats normaux avec du sérum de rats atteints d'IRC provoque une diminution de l'extraction du 1-propranolol [68]. L'hypothèse d'un facteur sérique dans le sérum de rats atteints d'IRC fut donc soulevée pour expliquer la diminution du CYP450 hépatique chez les patients atteints d'IRC.

Récemment, nous avons montré que le contenu en CYP450 total était réduit de 35 % dans des hépatocytes de rats normaux incubés avec du sérum de rats souffrants d'IRC, comparativement à du sérum de rats témoins [69]. De plus, nous avons évalué les effets du sérum de rats atteints d'IRC sur l'expression protéique et génique du CYP450. Des hépatocytes de rats normaux ont été incubés pendant 24 heures avec du sérum de rats atteints d'IRC ou témoins et les résultats ont montré une réduction significative (plus de 40 %) de l'expression protéique des isoformes CYP2C6, 2C11, 3A1 et 3A2 dans les hépatocytes en présence de sérum de rats souffrant d'IRC. Cette réduction s'expliquait principalement par une diminution de synthèse puisque l'expression de l'ARNm du CYP450 2C11 et 3A2 était réduite de 27 % et 36 %, respectivement, dans des hépatocytes incubés avec du sérum de rats atteints d'IRC comparativement au sérum provenant de rats témoins. Ces résultats démontrent qu'un ou des facteurs présents dans le sérum sont responsables de l'inhibition du CYP450 chez les rats souffrant d'IRC.

Par la suite, un fractionnement du sérum a permis d'évaluer quel poids moléculaire possède le ou les facteurs responsables de l'inhibition du CYP450 par le sérum de rat atteint d'IRC. C'est la fraction 10 à 30 kDa du

sérum de rats souffrant d'IRC qui provoque une diminution de 40% de l'expression protéique de l'isoforme du CYP450 3A2 [69].

Afin de préciser s'il existe aussi chez l'humain des facteurs sériques pouvant inhiber le CYP450 hépatique, nous avons évalué les effets du sérum de patients atteints d'IRC sur des cultures d'hépatocytes de rats [70]. Comme pour le sérum de rat, le contenu en CYP450 total, l'expression protéique et génique des différents isoformes (1A2, 2C6, 2C11, 2D1, 3A2, 4A1) étaient diminués d'au moins 45 % dans les hépatocytes de rats incubés avec du sérum de patients atteints d'IRC, alors que l'isoforme du CYP450 2E1 demeurait inchangé. Le fractionnement du sérum a aussi mis en évidence que l'inhibition du CYP450 hépatique est causée par la fraction 10 à 15 kDa du sérum des patients souffrant d'IRC [70].

En résumé, ces travaux démontrent aussi bien chez le rat que chez l'humain, que le sérum d'individus souffrant d'IRC contient un ou des facteurs responsables de l'inhibition du CYP450. L'étape suivante était par conséquent de tenter d'identifier le ou les facteurs impliqués dans l'inhibition du CYP450 chez les patients atteints d'IRC.

3. Facteurs

Plusieurs molécules s'accumulent chez les individus souffrant d'IRC et pourraient théoriquement être responsables de l'inhibition du CYP450. Premièrement, il existe de nombreuses toxines urémiques ; en effet, plus de

90 toxines ont été rapportées chez les patients atteints d'IRC [71]. Les plus connues sont le sulfate inodoxyle, l'acide 3-carboxy-4-méthyl-5-propyl-2-fluranpropanoïque, l'indoleacétate et l'acide hippurique [72]. Par contre, très peu d'études ont démontré l'effet de ces toxines sur les enzymes impliquées dans le métabolisme des endobiotiques et xénobiotiques

Deuxièmement, l'IRC est considérée de plus en plus comme un état inflammatoire [73, 74]. En effet de nombreuses cytokines sont élevées chez les patients atteints d'IRC comme l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6), les protéines inhibitrices des granulocytes et le facteur de croissance transformant (TGF- β) [75-79]. Point intéressant, une certaine proportion de ces cytokines possède un poids moléculaire d'environ 15 kDa, et c'est le poids moléculaire du ou des facteurs qui semblent responsables de l'inhibition du CYP450 dans nos études [69-71]. D'un point de vue cinétique, ces cytokines sont capables d'inhiber le CYP450 hépatique *in vitro* et *in vivo*, de plus, elles pourraient augmenter la glycoprotéine acide α 1, diminuant ainsi la fraction libre de certains médicaments basiques [80-85].

Troisièmement, l'IRC est associée à de nombreuses modifications métaboliques dont une des plus importantes est l'HPTS. Nous avons émis l'hypothèse que la PTH puisse inhiber le CYP450 et ce, pour les raisons suivantes :

a) la PTH possède un poids moléculaire d'environ 10 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire du ou des facteurs présents dans la fraction sérique inhibant le CYP450.

b) chez les individus atteints d'IRC, la PTH est responsable de la diminution de la synthèse de plusieurs protéines comme la lipase hépatique, le récepteur de la vasopressine, l'angiotensine II dans les hépatocytes et le facteur de croissance insulino-mimétique de type I (IGF-1) dans les cardiomyocytes [86-89], donc elle pourrait être responsable de la diminution du CYP450.

c) la PTH est une hormone très augmentée chez les individus souffrant d'IRC (HPTS). En effet, les niveaux de PTH peuvent passer de 5 $\mu\text{mol/L}$ à 150 $\mu\text{mol/L}$ chez des patients atteints d'IRC. Les étiologies de cette HPTS sont nombreuses. L'hyperphosphatémie augmente la liaison du phosphate avec le calcium sanguin. La concentration de calcium libre décroît stimulant ainsi la production de PTH afin de provoquer la relâche de calcium par les os. Mais en HPTS, il n'y a pas de boucle de rétroaction négative, normalement effectuée par la vitamine D(1,25). En effet, l'IRC provoque une déficience en vitamine D active 1,25 suite à la diminution de l'enzyme 1α -hydroxylase, qui est présente au niveau du rein seulement. La 1α -hydroxylase ajoute habituellement un groupement hydroxyle en position 1 sur la vitamine D ce qui la rend active afin d'agir au niveau des parathyroïdes, des reins et des intestins. En IRC, la vitamine D n'est pas active et n'a plus la capacité d'augmenter 1) l'absorption du calcium par les intestins, 2) la réabsorption du

calcium par les reins et 3) l'arrêt de la relâche de PTH par les glandes parathyroïdes. Par conséquent, plus l'IRC progresse, plus l'HPTS devient sévère [1, 90-92].

3.1 PTH

La PTH est produite par les cellules principales des glandes parathyroïdes. Elle est principalement responsable du maintien de l'homéostasie du calcium et du phosphate. La PTH est synthétisée sous forme de préprohormone de 115 acides aminés. Le clivage de 25 acides aminés en fait une prohormone de 90 acides aminés. Une dernière modification protéolytique transforme l'hormone dans une forme active de 84 acides aminés. Ces modifications sont effectuées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Finalement, l'hormone est entreposée dans les granules de sécrétion. La PTH a une demie-vie d'environ 4 minutes [93] et elle est dégradée principalement par les reins en de nombreux fragments. Parmi ces fragments, de nombreux sont encore actifs et possèdent une demie-vie de quelques heures. Une forme de PTH contenant les 34 premiers acides aminés de la portion N-terminale est biologiquement active, on la nomme PTH 1-34. La PTH agit au niveau des ostéocytes et des ostéoblastes afin de dégrader la matrice osseuse et ainsi libérer du calcium dans la circulation [1].

4. Hypothèses

Ce projet de maîtrise porte sur les effets de la PTH sur le métabolisme des médicaments et son implication dans la diminution du CYP450 chez les individus atteints d'IRC. Nous avons émis les hypothèses suivantes :

- La PTH est le médiateur sérique impliqué dans la régulation négative du CYP450 hépatique par le sérum provenant de rats souffrant d'IRC.
- La PTH est le facteur impliqué dans la réduction *in vivo* du CYP450 hépatique chez les rats atteints d'IRC.
- La PTH inhibe l'expression protéique, l'expression génique et l'activité du CYP450 hépatique *in vitro*.

5. Objectifs

Afin de vérifier les hypothèses émises, les objectifs étaient donc les suivants:

1. Déterminer le rôle de la PTH dans l'inhibition du CYP450 par le sérum de rats atteints d'IRC.
2. Déterminer le rôle de la PTH *in vivo* dans l'inhibition du CYP450 par l'IRC.
3. Déterminer l'effet de la PTH *in vitro* dans les hépatocytes en culture.

6. Article

Article soumis dans le *Journal of the American Society of Nephrology*

Josée Michaud, Judith Naud, François Désy, François A. Leblond, Alain Bonnardeaux et Vincent Pichette

Role of parathyroid hormone in the down-regulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure.

Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du programme

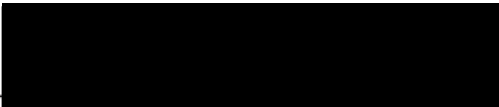
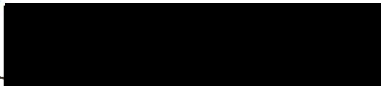



Josée Michaud
M. Sc. en Pharmacologie

2. Description de l'article

Josée Michaud, Judith Naud, François Désy, François A. Leblond, Alain Bonnardeaux, Vincent Pichette, *Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. Journal of the American Society of Nephrology*. En préparation.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Josée Michaud inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Rôle de la parathormone dans l'inhibition du cytochrome P450 hépatique en insuffisance rénale chronique.

Judith Naud		13/12/2005
	Signature	Date
François Désy		14/12/05
	Signature	Date
François A. Leblond		4/01/06
	Signature	Date
Alain Bonnardeaux		2005-12-20
	Signature	Date
Vincent Pichette		20/12/05
	Signature	Date

Role of parathyroid hormone in the down-regulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure

Josée Michaud^{1,2}, Judith Naud^{1,2}, Francois Désy Ph.D¹, Francois A. Leblond
Ph.D¹, Alain Bonnardeaux MD Ph.D¹, and Vincent Pichette MD Ph.D^{1,2}

¹Nephrology Service and Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital
Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Québec, Canada

² Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de
Montréal, Québec, Canada

Address correspondence to: Vincent Pichette M.D. Ph.D.
Centre de Recherche Guy-Bernier
Hôpital Maisonneuve-Rosemont
5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec,
Canada
H1T 2M4
Tel: (514) 252-3489
Fax: (514) 255-3026
E-mail: [REDACTED]

Running title: PTH down-regulates cytochrome P450

Subject: Cell Biology

ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) is associated with a decrease in drug metabolism secondary to a decrease in liver cytochrome P450 (P450). The predominant theory to explain this decrease is the presence of factors in the blood of uremic subjects. In the present study we tested the hypothesis that PTH could be this factor. The objectives of this study were to determine 1) the role of PTH in the down-regulation of hepatocyte P450 induced by rat uremic serum, 2) the role of PTH in the down-regulation of liver P450 in CRF rats, and 3) the effects of PTH on P450 in hepatocytes. For this purpose, 1) we incubated hepatocytes with CRF rat serum depleted with anti-PTH antibodies or with serum from CRF parathyroidectomized (CRF-PTX) rat, 2) we evaluated the effect of PTX on liver P450 in CRF rats, and 3) we determined the effects of PTH on P450 in hepatocytes. The depletion of PTH from CRF serum completely reversed the down-regulating effect of CRF serum on P450 in hepatocytes. Adding PTH (10^{-9} M) into depleted CRF serum induced a decrease in P450 similar to non-depleted CRF serum. The serum of CRF-PTX rats had no effect on P450 in hepatocytes compared to CRF serum. Adding PTH in CRF-PTX serum induced a similar decrease in P450 as obtained with CRF serum. Finally, PTX prevented the decrease of liver P450 in CRF rat. In summary, PTH is the major mediator implicated in the down-regulation of liver P450 in CRF rats.

INTRODUCTION

Chronic renal failure (CRF) interferes with the elimination of many drugs because of the reduction in glomerular filtration rate (GFR) and tubular secretion (1). However, renal failure also diminishes the metabolic clearance of selected drugs secondary to decrease of hepatic and intestinal metabolism of these drugs (2-6). The major determinant for these metabolic changes is a reduction in enzymatic activity.

Cytochrome P450 (P450) is the major catalyst of drug biotransformation. Several animal studies have shown that liver and intestinal P450 are reduced in CRF (7-10). These studies demonstrated that CRF is associated with a decrease in the activity as well as in the expression of liver and intestinal P450 isoforms secondary to reduced mRNA levels (9, 10). The main hypothesis to explain P450 activity and expression down-regulation is the presence of endogenous inhibitors in the blood of uremic animals modulating the P450. Indeed, we have shown that in normal hepatocytes incubated for 24 hours with serum from rats with CRF, total P450 level and protein expression of several P450 isoforms decreased by 45% compared to serum from control animals (11). This decrease in protein expression of P450 isoforms was secondary to reduced gene expression (11). Similar results have been shown with serum of patients with severe CRF (12). Thus, the next step, was to find which factor in the uremic blood down-regulates P450 in CRF.

CRF is associated with multiple metabolic disturbances. As a consequence, numerous molecules are increased in CRF. However, taking into account the changes induced by CRF (metabolic, hormonal and retention of toxins) and the factors known to affect the P450, two main mediators are most likely to be associated with down-regulation of P450 in CRF: parathyroid hormone (PTH) and pro-inflammatory cytokines (6). Although the potency of cytokines to down-regulate P450 have been established in inflammatory disease (13-15), we hypothesized that PTH could be implicated in the down-regulation of P450 in CRF for the following reasons: 1) secondary hyperparathyroidism is frequent in CRF (16); 2) PTH is known to down-regulate the mRNA of many proteins particularly in the liver but also in other tissue such as the heart (17-19) and 3) we have found a strong correlation between the levels of PTH and P450 reduction induced by serum of patients (12).

The objectives of this study were to determine 1) the role of PTH in the *in vitro* down-regulation of liver P450 induced by rat uremic serum, 2) the role of PTH in the *in vivo* down-regulation of liver P450 in CRF rats, and 3) the *in vitro* effects of PTH on P450 in cultured hepatocytes. For this purpose, 1) we incubated normal rat hepatocytes with CRF rat serum pre-adsorbed on immobilised anti-PTH antibodies or with serum from CRF parathyroidectomized (CRF-PTX) rat, 2) we evaluated the effect of PTX in CRF rats on liver P450 activity and expression, and 3) we determined the

effects of PTH on P450 in cultured hepatocytes.

MATERIALS AND METHODS

Experimental model

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Saint-Charles, Que, Canada), weighting 200 to 300 g were housed in the Research Centre animal care facility and maintained on Purina rat pellets and water *ad libitum*. An acclimatisation period of 3 days was allowed before any experimental work was undertaken. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for care and use of laboratory animals.

As shown in Table I, rats were divided in 4 groups. Hepatocytes were isolated from normal rats (n=35) and the sera used for incubation experiments were obtained from CRF, CRF-PTX, control or control-PTX rats at the time of sacrifice.

Chronic renal failure was induced by two-stage five-sixth nephrectomy as previously published (9, 20). After surgery, CRF animals were fed Purina rat chow and water *ad libitum*. Rats from control group also underwent two sham laparotomies (day 1 and 8). Control rats were pair-fed the same amount of rat chow that was ingested by the CRF rats on the previous day. At day 41 after the nephrectomy, the rats were housed in metabolic cages and urine was collected for 24 hours to determine the clearance of creatinine. Rats were sacrificed by decapitation at 42 days. Blood was collected and rapidly stored on ice. After coagulation, serum was recovered by centrifugation (600g for 10 min

at 4°C) and samples were kept for the measurement of serum creatinine and urea. The remaining sera were stored at -80°C.

Total parathyroidectomy (PTX) was performed as previously described (18). Briefly, surgical PTX was carried out under a surgical microscope, without removal of the thyroid tissue. The success of the PTX was ascertained by a significant decrease of calcium after PTX. To avoid hypocalcemia, PTX animals were then supplemented in calcium by adding calcium gluconate to drinking water (control 5%; CRF 2.5%). Rats were then allowed to recover for a week before the five-sixth nephrectomy. Control rats received sham surgery in the neck region.

Immunoabsorption of PTH in uremic serum

In order to deplete PTH in the sera of CRF rats, we used polystyrene beads (8.4 mm) coated with goat antibodies specific to the N-terminal (1-34) region of rat PTH (Alpco Diagnostics, Windham, NH). Each of these beads can bind at least 400 pg of PTH. Rat sera were incubated at 4°C for 16 hrs with beads (7 beads/ml of serum). After depletion, treated sera were added to culture media (10%) and filtered on 0.22 µm filter. Sample of depleted sera were reserved for quantification of PTH after depletion. Non-depleted control and CRF sera were concomitantly incubated at 4°C and treated in the same way.

Hepatocyte isolation and culture

Hepatocytes were isolated from normal rats according to the two-step liver perfusion method of Seglen as previously published (11). Collagenase Type 4 (Worthington, Lakewood, NJ) was used.

After pre-incubation, the medium was changed for 2 ml of William E medium containing 10% of serum from rats with CRF, CRF-PTX or from control animals. The serum of one rat was used for one experiment. Thereafter, the hepatocytes were incubated for another 24 hours. Hepatocytes were then harvested by scraping in phosphate-buffered saline. For mRNA analysis, cells were harvested in RLT buffer (Qiagen, Mississauga, Ont, Canada). Samples were stored at -80°C up to analysis.

To assess whether liver P450 could be down-regulated by PTH, a dose-response curve was obtained by measuring the ability of a wide range PTH (Rat synthetic 1-34 PTH, Sigma) concentrations (10^{-12} to 10^{-7} M) to depress the P450 of normal hepatocytes. Incubation time was 24 hours. PTH was dissolved in 0.15 N acetic acid. Hepatocytes were then harvested as described above, and stored at -80°C up to analysis.

Microsome preparation from hepatocytes and liver

Hepatocyte microsomes were isolated by differential centrifugation (21). The pellet containing the microsomes was resuspended in 0.9% NaCl and stored at -80°C up to the analysis. Liver microsomes were isolated by

differential centrifugation according to Cinti *et al.* (22). The pellet containing the microsomes was stored at -80°C in Tris 0.1 M pH 7.4, glycerol 20%, EDTA 10 mM up to analysis.

Western blot analysis

Although several cytochrome P450 isoforms are implicated in the metabolism of drugs, we only assessed CYP1A1, CYP2C11, CYP2E1 and CYP3A2, which are the more abundant isoforms in the rat liver and are those most affected by CRF as previously reported (9). These isoforms were assessed by western blotting as described elsewhere (9). P450 were detected using polyclonal goat anti-rat 1A1, 2C11, 2E1 and 3A2 (Gentest Corporation, Woburn, MA), respectively. Beta-Actin was detected using a mouse anti-chicken β -Actin (Neo-Markers, Fremont, CA). Immune complexes were revealed by secondary antibodies (swine anti-goat IgG coupled to peroxidase from Biosource International or Goat anti-mouse IgG coupled to peroxidase from Sigma) and the Luminol derivative of Lumi-Light Western blotting substrate (Roche Diagnostics). Immune reaction intensity was determined by computer-assisted densitometry on Fuji LAS-3000 LCD camera coupled to the analysis program MultiGauge.

RNA isolation and real-time quantitative polymerase chain reaction analysis

RNA extractions were done on either the liver or the hepatocytes with the RNeasy Midi and Mini Kit from Qiagen respectively. One μg of total RNA

was used to prepare cDNA by reverse transcription using Omniscript RT kit from Qiagen and random primer from Invitrogen (Burlington, Ont, Canada). Quantitative PCR analysis was performed using Platinum SYBR green qPCR (Invitrogen) on the iCycler real-time detection system (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ont, Canada). Specific primer set were designed for each of the two tested mRNA (3A2 and GAPDH) on the basis of published cDNA sequences with the aid of the Jellyfish computer program and are reported in Table II. All primers were obtained from Sigma and their specificity was confirmed by sequencing the resulting PCR product on ABI Prism 3100 analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). Used PCR conditions were optimized to 95°C for 15 seconds, 59°C for 30 seconds 72°C for 60 seconds. The respective PCR products were cloned in the pCr 2.1 vector using TA cloning Kit (Invitrogen). The resulting plasmids were purified with Hispeed Plasmid Midi Kit from Qiagen, quantified at 260nm and dilute to make a standard curve.

Evaluation of CYP3A activity

In order to evaluate the metabolic activity of CYP3A in microsome of either treated hepatocytes or the livers microsomes of the different groups of rats, a selective fluorescent probe, the 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl]furan-2(5H)-one (DFB) that is specifically metabolized by rat CYP3A2 was used as previously reported (23). In the case of microsomes, 25µg of protein were used. The fluorescence of the metabolite (DFH) was read on the cytofluorometer (Cytofluor 4000/TR,

Perspective Biosystems, Framingham, MA) using appropriate wavelength (excitation filter: 360/40nm; emission filter: 460/40nm). Standard curve was prepared with known dilution of DFH. For hepatocytes, substrate was added directly to the culture after removal of the culture media and replacement by Krebs buffer containing 12,5mM HEPES.

Blood and urine chemistries

Blood (urea, creatinine, calcium) and urine (creatinine) chemistries were determined with a Hitachi 717 autoanalyser (Roche). PTH was measured by using the Rat intact PTH ELISA Kit (Alpco Diagnostics), which measure the intact 1-84 PTH. The lowest detectable level is 15pg/ml.

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm s.e. mean. Differences between groups were assessed by using an unpaired Student's *t* test or an ANOVA test. Significant ANOVA was followed by a post-hoc Scheffe analysis (Dunnett for fig 4). The threshold of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Biochemical parameters and body weight in rats (Table I)

Table I presents the biochemical parameters and body weight of the four groups of animals studied. Compared to control animals, CRF rats had higher levels of plasma creatinine and lower values of creatinine clearance which was reduced by 80% ($p < 0.001$). Body weights in control and CRF rats were similar. The serum PTH was increased 10-fold in CRF rats, reflecting the magnitude of secondary hyperparathyroidism. PTH levels were undetectable in parathyroidectomized animals. Although, there was a small decrease of plasma calcium in PTX rats, it was not statistically different than in control rats (Table I).

Role of PTH in the down-regulation of liver P450 induced by uremic serum

Two sets of experiments were conducted. We first neutralized PTH in uremic serum. As shown in figure 1, we confirmed our previous results as CRF serum induced a 34% and 43% decrease in CYP3A protein expression and mRNA levels, respectively. The depletion of CRF serum with anti-PTH antibodies completely reversed the inhibitory effect of CRF serum on CYP3A (figure1). Adding PTH (at a concentration similar to CRF serum, which is 10^{-9} M) into depleted CRF serum induced a similar decrease in CYP3A levels as non-depleted CRF serum, confirming that the depletion procedure was specific for PTH (figure 1). Similar results were obtained for CYP3A activity evaluated

by the DFB assay. We also evaluated another major isoform in the rat (CYP2C11), and as shown for CYP3A, the depletion in PTH of CRF serum reverses the down-regulation of CYP2C11 induced by uremic serum (data not shown).

To further confirm the role of PTH in uremic serum, we evaluated the effect of serum from PTX animals. As shown in figure 2, the serum of parathyroidectomized CRF rats (CRF-PTX) have no down-regulating effects on CYP3A protein and mRNA expression. Again, adding PTH (10^{-9} M) in CRF-PTX serum induced a similar decrease in CYP3A levels as obtained with CRF serum (figure 2). Similar results were obtained when we evaluated the activity of CYP3A by the DFB assay and also for the expression of CYP2C11 (data not shown).

Role of PTH in the *in vivo* down-regulation of P450 induced by CRF

These experiments were to determine whether PTH is implicated in the *in vivo* decrease of P450 constantly found in CRF. As shown in figure 3, we confirmed that in CRF, there was a 72% decrease in liver CYP3A protein expression. However, preventing the development of secondary hyperparathyroidism by PTX partly reverses the negative effect of CRF on CYP3A. The mRNA coding for CYP3A2 was significantly reduced in CRF subjects. We also observed a significant increase in mRNA levels in CRF-PTX rats. The magnitude of this increase was similar (around 300%) for both protein expression and mRNA. Similar results were obtained when we evaluated the

metabolic activity of CYP3A by the DFB assay.

***In vitro* effect of PTH on P450 in cultured hepatocytes**

To confirm that PTH was not only implicated in the down-regulation of liver P450 in uremia but could also regulate *in vitro* liver P450, we incubated during 24 hours normal hepatocytes with synthetic 1-34 rat PTH.

a) Dose-response curve of PTH on liver CYP3A in cultured hepatocytes

Figure 4 depicts the effects of different concentrations of PTH (10^{-12} to 10^{-7} M) on the protein expression as well as on the mRNA levels of CYP3A2 of hepatocytes. As the concentration of PTH increased there was a dose dependant decrease in CYP3A2 levels both at the protein and mRNA level, that tends to plateau at 10^{-8} M. Interestingly, the *in vivo* concentrations obtained in our CRF rats were between 10^{-10} to 10^{-9} M (see Table 1). There was no effect of PTH on other control hepatocyte proteins (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Aspartate aminotransferase or β -actin) (Data not shown).

b) Effects of PTH on CYP3A activity in cultured hepatocytes

The effects of PTH (at a concentration of 10^{-9} M) on the CYP3A activity in shown on figure 5. When hepatocytes where incubated with PTH, the activity of CYP3A was decreased by approximately 40%, which is a decrease similar to that obtained with uremic serum or in CRF rats (figure 1 and 2).

c) Effects of PTH on other P450 isoforms

Since CRF as well as uremic serum were associated with a decrease in several P450 isoforms, we were interested to determine whether PTH could modulate other P450 isoforms in cultured hepatocytes. Figure 6 shows that beside CYP3A, PTH (10^{-9} M) could also decrease the protein expression of CYP1A1 and CYP2C11 and had no effect on CYP2E1.

DISCUSSION

This study demonstrates that PTH is the major mediator implicated in the down-regulation of liver P450 in CRF rats. Indeed, we showed that the depletion of CRF serum with anti-PTH antibodies completely reverses the inhibitory effect on P450 of CRF serum in cultured hepatocytes. Adding PTH (10^{-9} M) into depleted CRF serum induced a similar decrease in P450 as CRF serum non-depleted. The serum of parathyroidectomized CRF rats (CRF-PTX) had no effect on P450 compared to CRF serum. Again, adding PTH in CRF-PTX serum induced a similar decrease in P450 as obtained with CRF serum. Finally, PTX partly prevented the decrease of liver P450 in CRF rat.

Renal failure has been generally thought to decrease only the renal clearance of drugs (24). However, several studies have demonstrated that CRF also decreased hepatic drug metabolism secondary to a decrease in liver P450 (9). The main reason for decreased P450 activity and expression in the liver appears to be the presence of uremic factors that accumulate in CRF (11). Indeed, we have shown that in normal hepatocytes incubated for 24 hours with serum from rats or patients with CRF, total P450 level and protein expressions of several P450 isoforms decreased by 45% compared to serum from control animals (11, 12). This decrease in protein expression of P450 isoforms was secondary to reduced gene expression (11, 12).

In the present study we hypothesized that PTH could be a major factor

implicated in the down-regulation of liver P450 induced by CRF and our results confirm this hypothesis. Indeed, incubation of normal rat hepatocytes with CRF rat serum pre-adsorbed on immobilised anti-PTH completely reversed the inhibitory effect of uremic serum on cytochrome P450 (figure 1). Similar results were obtained when we incubated serum from CRF-PTX rats (figure 2). Furthermore, our results showed that PTH could down-regulate liver P450 isoforms. Incubating hepatocytes from normal rats with rat PTH (1-34) resulted in a dose-dependent reduction in the protein expression as well as mRNA of CYP2C11 and 3A2 (figures 5 and 6). At concentrations found in CRF (10^{-10} to 10^{-9} M), there was a reduction of more than 40% in the P450, similar to what we found with CRF serum.

CRF is associated with an increase in PTH (secondary or tertiary hyperparathyroidism), that causes several uremic complications (25-29). More specifically, PTH down-regulates the mRNA of many proteins, such as hepatic lipase, as well as the receptors for vasopressin, angiotensin II in hepatocytes and IGF-1 in cardiomyocytes (17-19). Recently, CRF-induced resistance to IGF-1 have been attenuated by parathyroidectomy, suggesting a role of PTH in this resistance (19). The mechanisms underlying these effects of PTH appear related to an increase of cAMP and/or an increase in intracellular calcium (26).

The effects of PTH on the isoforms of P450 implicated in the metabolism of drugs as found in this study, could also be secondary to

activation of cAMP and increase in $[Ca^{2+}]_i$. PTH signalling pathway includes the generation of cAMP with activation of protein kinase A (PKA) and subsequent phosphorylation of proteins (30). In hepatocytes PTH increases cAMP production (31), that could cause a phosphorylation of P450 by a cAMP-dependent protein kinase, leading to a decrease in the activity of selected isoenzymes of the P450 (32, 33), or a down-regulation of the expression of genes (CYP1A1, 2B1, 2B6, 3A1) (34, 35). However, some data also suggest that PTH may activate PKC (30), and that could also lead to P450 inhibition (36). On the other hand the role of $[Ca^{2+}]_i$ in the regulation of P450 remains poorly defined. (35, 37, 38). Further studies are ongoing to precise the mechanism of PTH induced P450 down-regulation.

Aside from these well characterised PTH-signalling pathways, recent data also suggest a third hypothesis through which PTH could inhibit P450. This is via activation of the nuclear factor- κ B (NF- κ B). NF- κ B is a pleiotropic transcription factor playing an important role in the regulation of physiological processes including immune responses, inflammatory reactions, cell proliferation, apoptosis, and developmental processes (39). Several studies have shown that NF- κ B plays an important role in mediating the suppression of P450 expression by inflammatory agents, such as inflammatory cytokines and LPS (40, 41). Moreover, it has been reported that PTH causes dose and time-related increases in NF- κ B in human and rat osteoblastic cells (42, 43). Thus, PTH may act via NF- κ B to down-regulate P450. Again, further studies are

ongoing.

In the present study we also evaluated whether PTX could prevent the down-regulation of liver P450 induced *in vivo* by CRF. As shown in figure 3, P450 decreased by 72% in CRF rat livers but only by 28% in CRF-PTX liver. This reduction, while less important, was still significant compared to control rats. These results also suggest that PTH is a major factor not only *in vitro* but also *in vivo*. However, these results also suggest that *in vivo*, other factors could be implicated in the down-regulation of liver P450. One of these factors could be cytokines. Indeed, several studies have demonstrated that CRF is associated with a chronic activation of inflammatory response (44, 45). Patients with CRF show an increase in plasma levels of many cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), monocyte chemotactic and activating factor, interleukin-6 (IL-6), granulocyte inhibitory protein and transforming growth factor (46-50). On the other hand, cytokines are able to down-regulate hepatic P450 *in vitro* and *in vivo* (13-15). These observations support the hypothesis that beside PTH, cytokines could down-regulate the liver P450 in CRF rats.

In conclusion, CRF is associated with a decrease in liver P450 secondary to reduced mRNA levels. The main reason for the decrease in P450 is the presence of uremic factors that accumulate in CRF. In the present study we demonstrated that PTH is one of these factors. Preventing secondary hyperparathyroidism by PTX precludes the down-regulation of

liver P450 in CRF rats. Finally, we have identified a new hormone (PTH) modulating the major drug metabolizing system, the P450.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the CIHR and the Fond de la Recherche en Santé du Québec. Part of this work has been presented at the 14th International Conference on Cytochromes P450 in Dallas.

REFERENCES

1. Matzke GE, Frey RF: Drug dosing in patients with impaired renal function. In: *Pharmacotherapy: A pathophysiologic basis*, Second ed, edited by Pipiro JT TR, Hayes PE, Yee GC, Matzke GR, Posey ML, New York, Elsevier Science Publishing Inc, 1992, pp 750-763
2. Matzke GR, Frye RF: Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity. *Drug Saf* 16: 205-231, 1997
3. Touchette MA, Slaughter RL: The effect of renal failure on hepatic drug clearance. *DICP* 25: 1214-1224, 1991
4. Gibson TP: Renal disease and drug metabolism: an overview. *Am J Kidney Dis* 8: 7-17, 1986
5. Pichette V, Leblond F: Metabolism of drugs in chronic renal failure. *Recent Res Devel Drug Metabol Disposition* 1: 43-56, 2002
6. Pichette V, Leblond FA: Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* 4: 91-103., 2003
7. Uchida N, Kurata N, Shimada K, Nishimura Y, Yasuda K, Hashimoto M, Uchida E, Yasuhara H: Changes of hepatic microsomal oxidative drug metabolizing enzymes in chronic renal failure (CRF) rats by partial nephrectomy. *Jpn J Pharmacol* 68: 431-439., 1995
8. Patterson SE, Cohn VH: Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure. *Biochem Pharmacol* 33: 711-716, 1984

9. Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, Pichette V: Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 12: 326-332., 2001
10. Leblond FA, Petrucci M, Dube P, Bernier G, Bonnardeaux A, Pichette V: Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 13: 1579-1585., 2002
11. Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V: Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol* 137: 1039-1046., 2002
12. Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, Pichette V: Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol* 144: 1067-1077, 2005
13. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, Guillouzo A: Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 44: 707-715, 1993
14. Abdel-Razzak Z, Corcos L, Fautrel A, Campion JP, Guillouzo A: 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* 46: 1100-1110, 1994
15. 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* 366: 159-164, 1995

16. Levi R, Silver J: Pathogenesis of parathyroid dysfunction in end-stage kidney disease. *Pediatr Nephrol* 20: 342-345. Epub 2004 Nov 2010., 2005
17. Massry SG, Klin M, Ni Z, Tian J, Kedes L, Smogorzewski M: Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats. *Kidney Int* 48: 1324-1331, 1995
18. Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG: Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J Clin Invest* 97: 2167-2173, 1996
19. Qing DP, Ding H, Vadgama J, Wu YY, Kopple JD: Elevated myocardial cytosolic calcium impairs insulin-like growth factor-1-stimulated protein synthesis in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 10: 84-92, 1999
20. Leblond FA, Giroux L, Villeneuve JP, Pichette V: Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure. *Drug Metab Dispos* 28: 1317-1320., 2000
21. 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* 50: 1065-1072., 1996
22. Cinti DL, Moldeus P, Schenkman JB: Kinetic parameters of drug-metabolizing enzymes in Ca²⁺-sedimented microsomes from rat liver. *Biochem Pharmacol* 21: 3249-3256, 1972
23. Nicoll-Griffith DA, Chauret N, Houle R, Day SH, D'Antoni M, Silva JM: Use of a benzyloxy-substituted lactone cyclooxygenase-2 inhibitor as a

selective fluorescent probe for CYP3A activity in primary cultured rat and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 32: 1509-1515., 2004

24. Cantu TG, Ellerbeck EF, Yun SW, Castine SD, Kornhauser DM: Drug prescribing for patients with changing renal function. *Am J Hosp Pharm* 49: 2944-2948, 1992

25. Goltzman D, Hurdy G: Parathyroid hormone. In: *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, edited by Becker KL, Philadelphia, Lippincott, 1990, pp 402-411

26. Massry SG, Smogorzewski M: Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver. *Kidney Int Suppl* 62: S5-7, 1997

27. Smogorzewski M, Massry SG: Defects in B-cell function and metabolism in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int Suppl* 78: S186-189., 2001

28. Llach F, Velasquez Forero F: Secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure: pathogenic and clinical aspects. *Am J Kidney Dis* 38: S20-33., 2001

29. Smogorzewski MJ: Central nervous dysfunction in uremia. *Am J Kidney Dis* 38: S122-128., 2001

30. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC: Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene* 282: 1-17., 2002

31. Picotto G, Massheimer V, Boland R: Parathyroid hormone stimulates calcium influx and the cAMP messenger system in rat enterocytes. *Am J Physiol* 273: C1349-1353, 1997
32. Jansson I, Curti M, Epstein PM, Peterson JA, Schenkman JB: Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction. *Arch Biochem Biophys* 283: 285-292, 1990
33. Pyerin W, Horn F, Taniguchi H: Posttranslational modifications of the cytochrome P-450 monooxygenase system. *J Cancer Res Clin Oncol* 113: 155-159, 1987
34. Sidhu JS, Omiecinski CJ: cAmp-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 270: 12762-12773, 1995
35. Galisteo M, Marc N, Fautrel A, Guillouzo A, Corcos L, Lagadic-Gossmann D: Involvement of cyclic nucleotide- and calcium-regulated pathways in phenobarbital-induced cytochrome P-450 3A expression in mouse primary hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 1270-1277, 1999
36. LeHoux JG, Dupuis G, Lefebvre A: Regulation of CYP11B2 gene expression by protein kinase C. *Endocr Res* 26: 1027-1031., 2000
37. Clyne CD, White PC, Rainey WE: Calcium regulates human CYP11B2 transcription. *Endocr Res* 22: 485-492, 1996
38. Graier WF, Simecek S, Sturek M: Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signalling of Ca²⁺ entry in human and bovine endothelial cells. *J Physiol (Lond)* 482: 259-274, 1995

39. Li Q, Verma IM: NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725-734., 2002
40. Tian Y, Ke S, Denison MS, Rabson AB, Gallo MA: Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 274: 510-515., 1999
41. Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y: Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 276: 39638-39644., 2001
42. Ali NN, Gilston V, Winyard PG: Activation of NF-kappaB in human osteoblasts by stimulators of bone resorption. *FEBS Lett* 460: 315-320., 1999
43. Guillen C, Martinez P, de Gortazar AR, Martinez ME, Esbrit P: Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277: 28109-28117., 2002
44. Bistrrian BR: Role of the systemic inflammatory response syndrome in the development of protein-calorie malnutrition in ESRD. *Am J Kidney Dis* 32: S113-117, 1998
45. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T: Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int* 55: 1899-1911, 1999
46. Higuchi T, Yamamoto C, Kuno T, Mizuno M, Takahashi S, Kanmatsuse K: Increased production of interleukin-1beta and interleukin-1

receptor antagonist by peripheral blood mononuclear cells in undialyzed chronic renal failure. *Nephron* 76: 26-31, 1997

47. Akahoshi T, Kobayashi N, Hosaka S, Sekiyama N, Wada C, Kondo H: In-vivo induction of monocyte chemotactic and activating factor in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 10: 2244-2249, 1995

48. Oettinger CW, Bland LA, Oliver JC, Arduino MJ, McAllister SK, Favero MS: The effect of uremia on tumor necrosis factor-alpha release after an in vitro whole-blood endotoxin challenge. *J Am Soc Nephrol* 4: 1890-1895, 1994

49. Sunder-Plassmann G, Kapiotis S, Gasche C, Klaar U: Functional characterization of cytokine autoantibodies in chronic renal failure patients. *Kidney Int* 45: 1484-1488, 1994

50. Ziesche R, Roth M, Papakonstantinou E, Nauck M, Horl WH, Kashgarian M, Block LH: A granulocyte inhibitory protein overexpressed in chronic renal disease regulates expression of interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 301-305, 1994

Table I: Physiological characteristics of rats

		PTX			
		(-)		(+))	
Nephrectomy		(-)	(+)	(-)	(+)
Group		CTL	CRF	CTL-PTX	CRF-PTX
Rats (N)		22	20	11	12
Body weight	g	376.4 ± 15.4	318.0 ± 12.1	376.8 ± 16.6	323.5 ± 15.2
Serum creatinine	µmol/L	56.6 ± 1.3	215.8 ± 13.3 ^a	53.4 ± 0.8	211.1 ± 28.7 ^a
Creatinine clearance	µl/100g/min	389.9 ± 16.4	78.2 ± 9.9 ^a	371.0 ± 24.1	79.1 ± 12.4 ^a
PTH	pg/ml	50.4 ± 7.0	1734.1 ± 560.2 ^a	19.3 ± 2.5 ^a	18.2 ± 3.8 ^a
Calcemia	mmol/L	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1

a: p<0.05 vs. Control group

Table II: Nucleotide sequences of PCR primers

mRNA	Primer sequence (5'-3')	Predicted Product size
3A2	GATTCTAAGCATAAGCACCGAGT ACAGGGCTTTATGAGACACTTCGTCTT	91 bp
GAPDH	TAAAGGGCATCCTGGGCTACACT CTTACTCCTTGGAGGCCATGTAG	201 bp

Primers for 3A2 and GAPDH were designed based on published cDNA sequences with the aid of the Jellyfish computer program. The resulting PCR product was sequenced on an ABI Prism 3100 analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) to confirm the specificity of the primers.

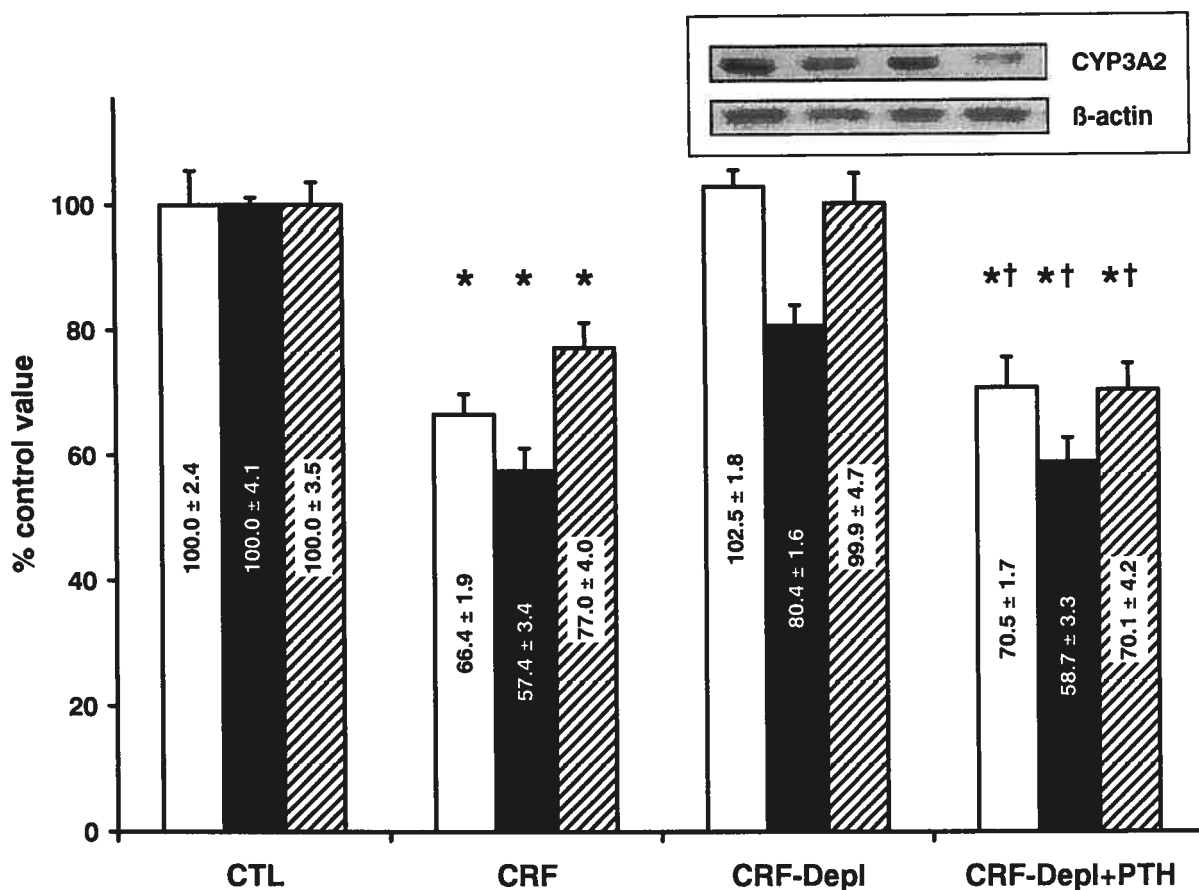


Figure 1 Expression of CYP3A2 protein (white bars), mRNA (black bars) and drug metabolizing activity as measured by using 3-[(3,4-difluorobenzyl)oxy]-5,5-dimethyl-4-[4-methylsulfonyl]phenyl]furan-2(5H)-one (DFB) as specific substrate (hatched bar) in normal rat hepatocytes incubated for 24 hours with control or CRF rat sera. Sera were used either non-treated or after pre-adsorption during 16 hours at 4°C with latex beads coated with antibodies specific for rat PTH to remove PTH. A portion of the depleted sera was supplemented with 10^{-9} M 1-34 rat PTH before incubation with hepatocytes. CYP3A2 protein expression was measured by western blot while specific mRNA were quantified by qPCR. Results of samples incubated with control rat serum were defined as 100%. Representative blots were shown in insert. *: $p < 0.05$ when compared to CTL serum. †: $p < 0.05$ when compared to depleted CRF sera.

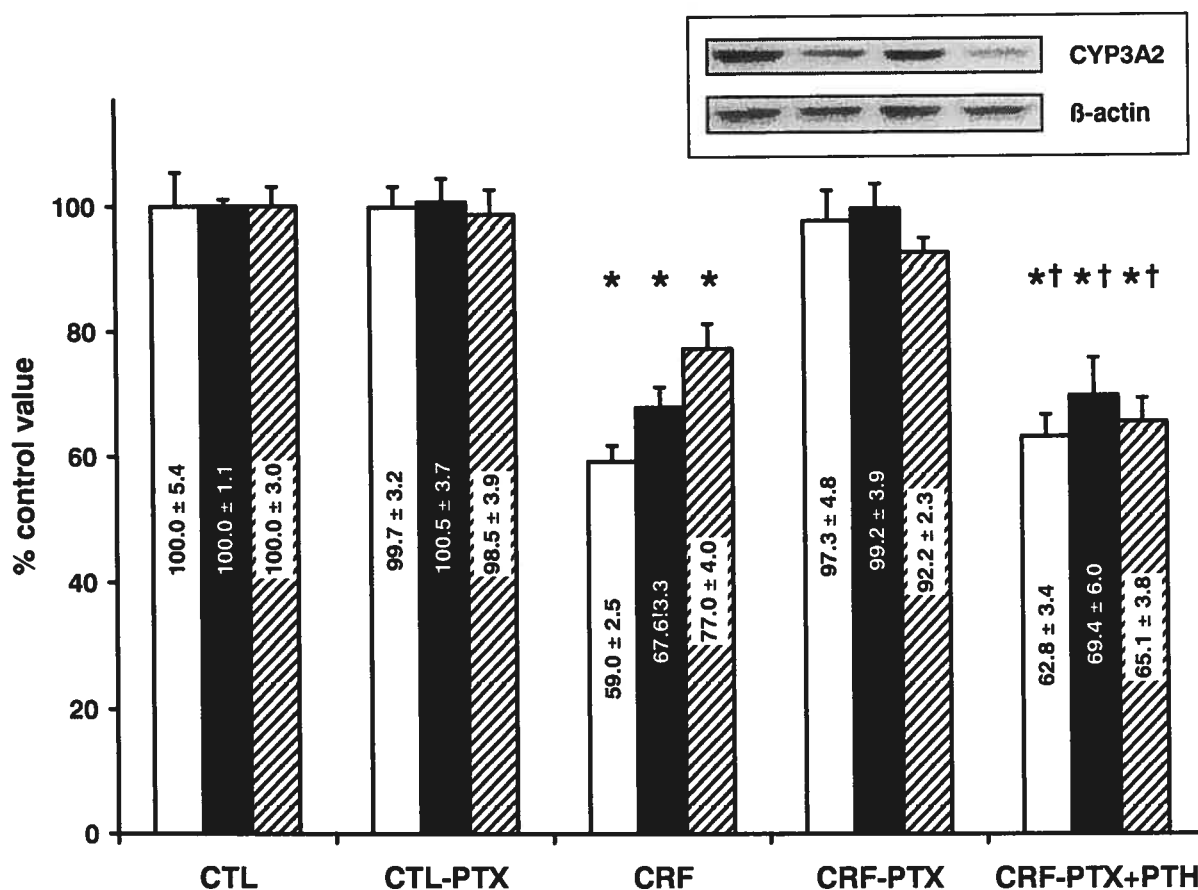


Figure 2 Expression of CYP3A2 protein (white bars), mRNA (black bars) and drug metabolizing activity as measured by using DFB as specific substrate (hatched bar) in normal rat hepatocytes incubated for 24 hours with control, CRF or PTX-CRF rat sera. A portion of the PTX-CRF sera was supplemented with 10^{-9} M 1-34 rat PTH before incubation with hepatocytes. CYP3A2 protein expression was measured by western blot while specific mRNA were quantified by qPCR. Results of samples incubated with control rat serum were defined as 100%. Representative blots were shown in insert. *: $p < 0.05$ when compared to CTL serum. †: $p < 0.05$ when compared to PTX-CRF sera.

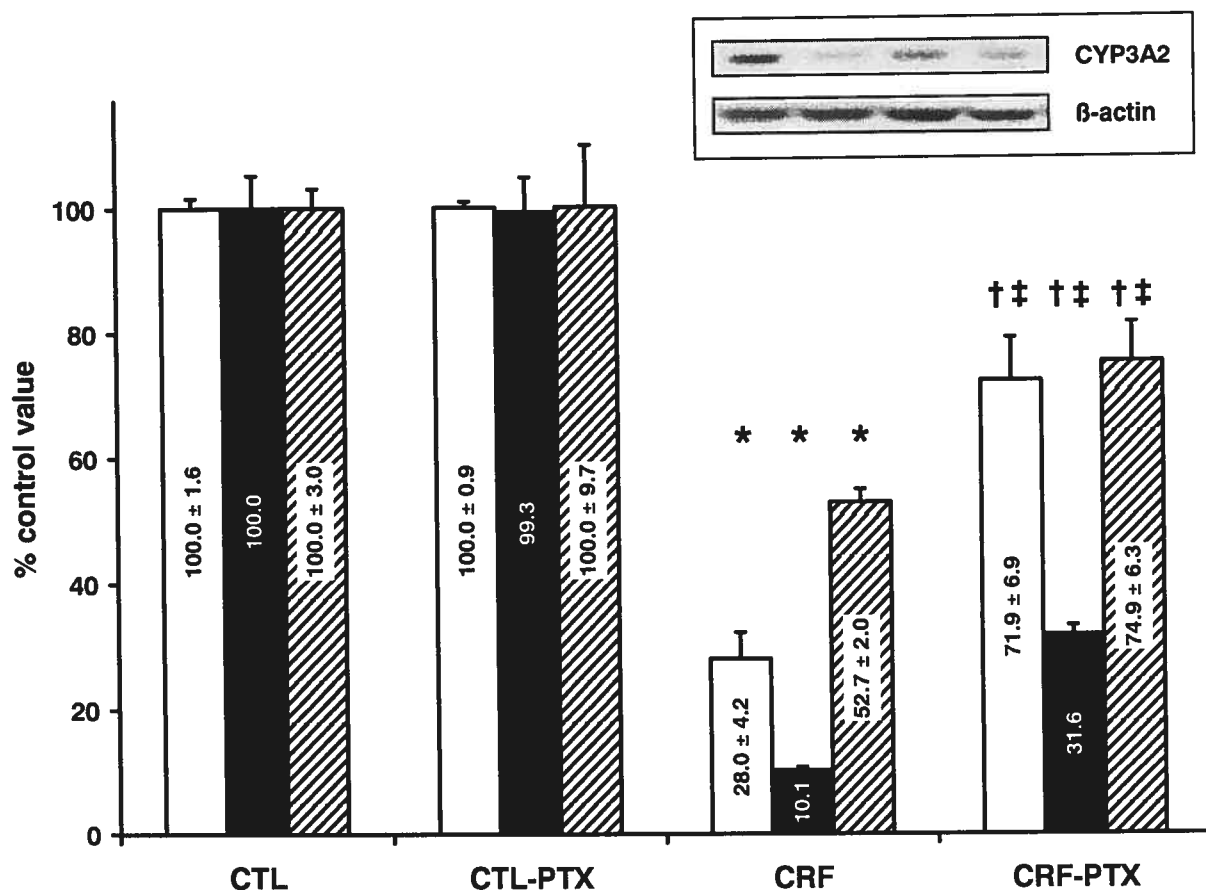


Figure 3 Expression of CYP3A2 protein (white bars), mRNA (black bars) and drug metabolizing activity as measured by using DFB as specific substrate (hatched bar) in sham operated (CTL) or CRF rats with or without prior parathyroidectomy (PTX). CTL rats were defined as 100% for CRF rats. Similarly, CTL-PTX were defined as 100% for CRF-PTX rat. CYP3A2 protein expression was measured by western blot. Representative blots were shown in insert. *: $p < 0.001$ when compared to CTL rats †: $p < 0.05$ when compared to CRF rats. ‡ $p < 0.05$ when compared to CTL-PTX rats.

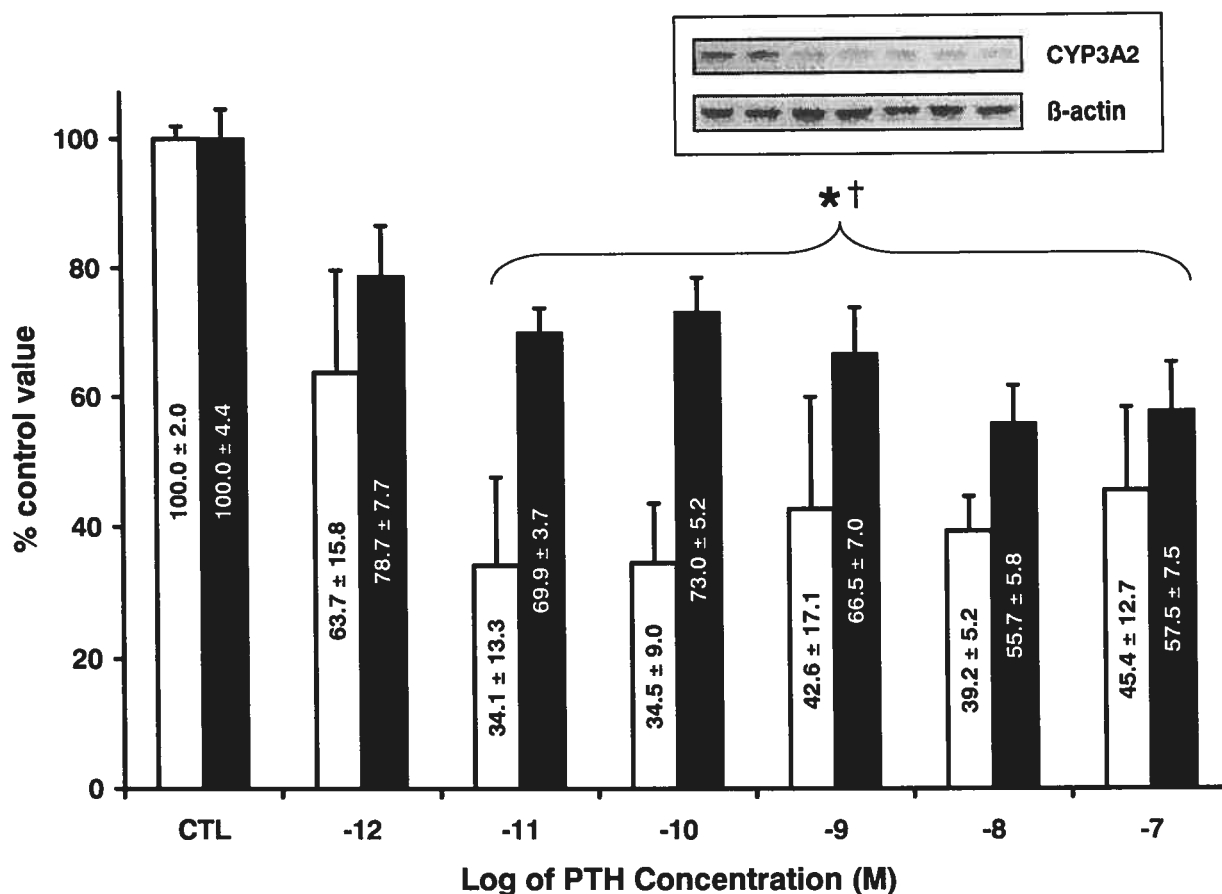


Figure 4 Dose-response effect of PTH on CYP3A2 protein (white bars) and mRNA expression (black bars) by hepatocytes incubated for 24 hours with various concentrations of 1-34 rat PTH in 10% calf serum. CYP3A2 protein expression was measured by western blot while specific mRNA were quantified by qPCR. Results of samples incubated with calf serum without added PTH were defined as 100%. Representative blots were shown in insert. *: $p < 0.01$ when protein expression was compared to hepatocytes incubated without PTH. †: $p < 0.01$ when mRNA expression was compared to hepatocytes incubated without PTH.

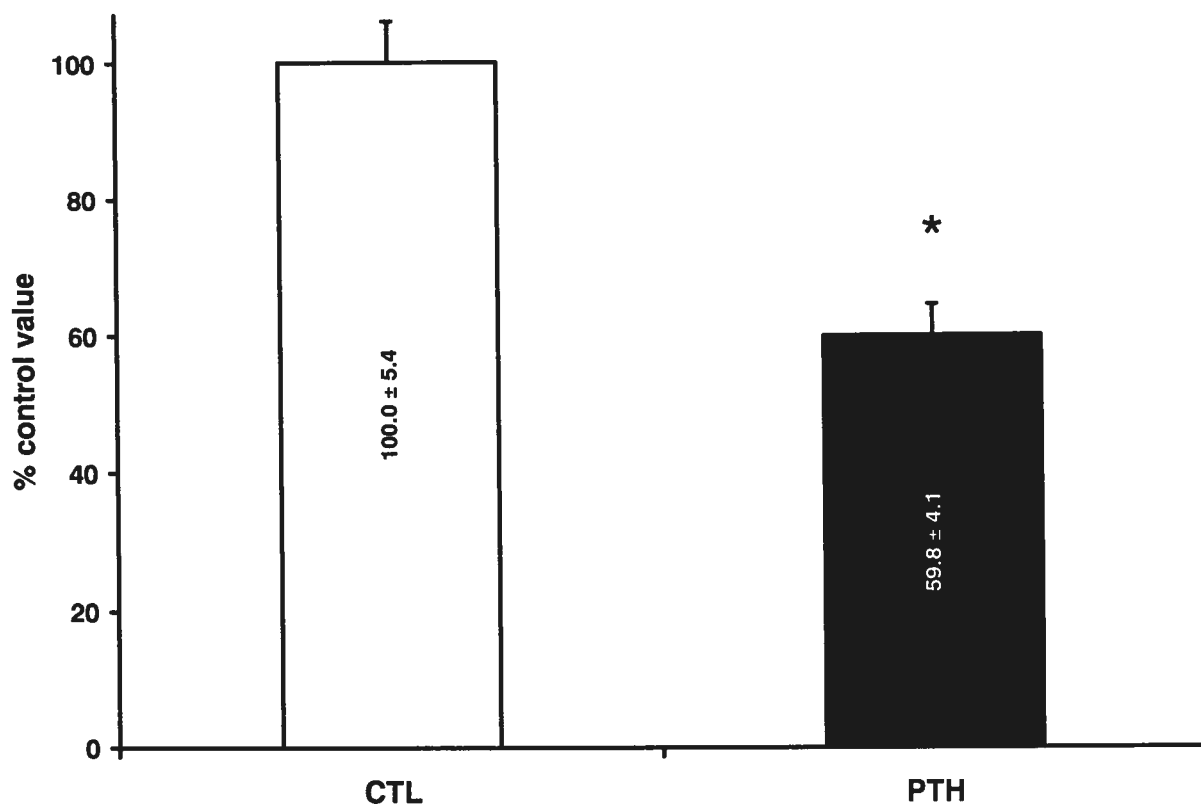


Figure 5 Effect of PTH 10^{-9} M on the CYP3A2 metabolic activity of 24 hours cultured hepatocytes. Metabolic activity was measured with DFB as specific substrate. Washed cells were incubated for 60 minutes with DFB at 37°C. Metabolite (DFH) production was measured on supernatant by fluorometry. *: $p < 0,001$ when compared to hepatocytes incubated without PTH which were defined as 100%.

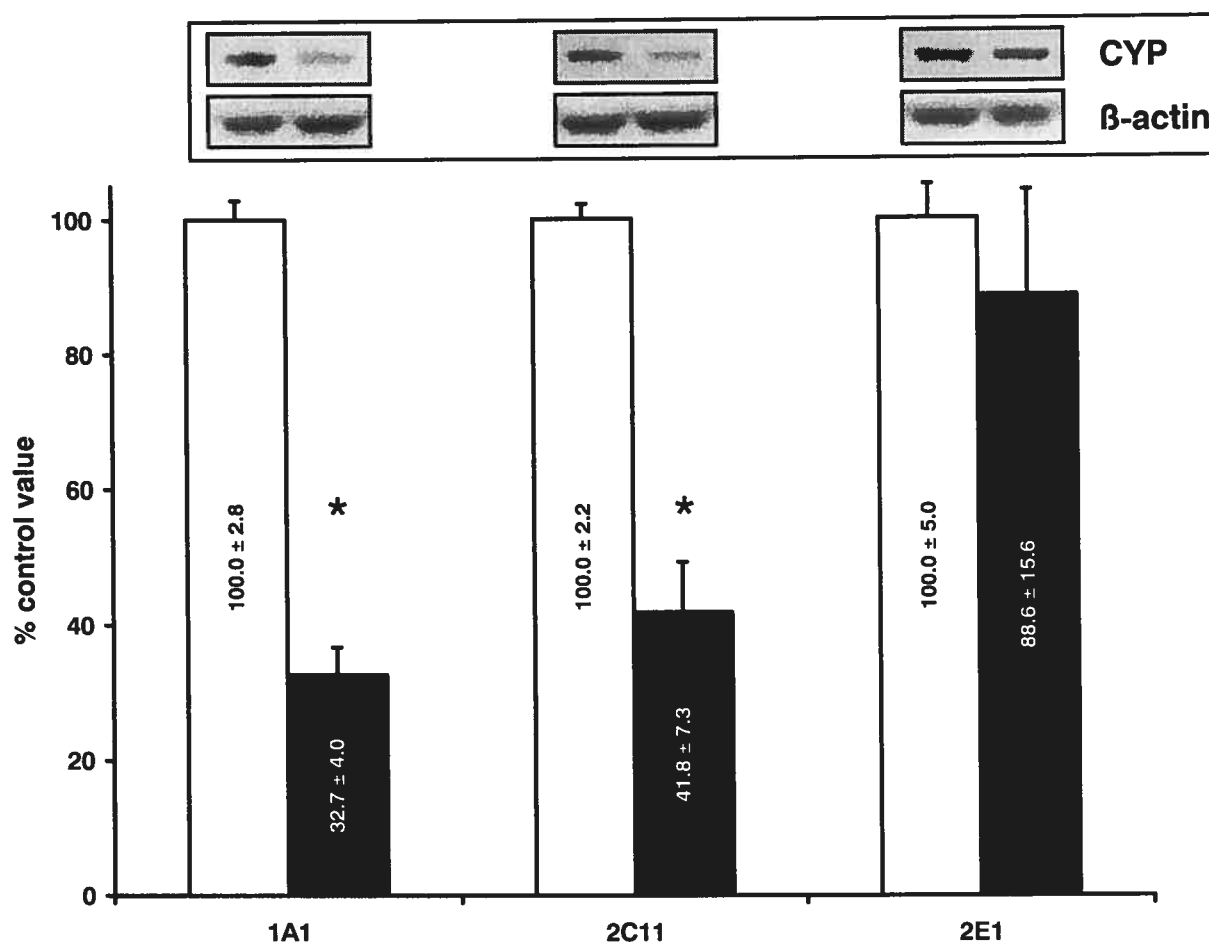


Figure 6 Effect of PTH on the protein expression of other P450 isoforms in hepatocytes incubated for 24 hours with 10^{-9} M rat PTH (black bars). Specific isoforms were determined by western blot using monospecific antibodies. Expression of each isoform in hepatocytes incubated without PTH (white bars) was defined as 100%. Representative blots were shown in insert. *: $p < 0,001$

7. Discussion

Mon travail de maîtrise portait sur le rôle de la PTH dans l'inhibition du CYP450 hépatique chez les rats ayant une IRC. Les résultats de mon projet de recherche, exposés dans ce mémoire, démontrent non seulement que la PTH est un facteur important dans la réduction du CYP450 hépatique chez le rat atteint d'IRC, mais qu'elle est aussi un facteur expliquant l'effet inhibiteur du sérum urémique.

Dans un premier temps, nous avons dû mettre sur pied le modèle expérimental de PTX. Ce modèle est basé sur celui de Massry où les glandes parathyroïdes sont retirées à l'aide d'un électrocautère [94]. L'eau de boisson a été remplacée par du gluconate de calcium en solution afin de normaliser les niveaux de calcium sanguin [94]. L'IRC est induite chez les rats par néphrectomie 5/6 une semaine après avoir subi une PTX. Les rats ont été suivis soigneusement après les chirurgies, la quantité de nourriture consommée, le poids, la quantité de gluconate de calcium ou d'eau consommée ont été notés quotidiennement. Les données biochimiques présentées dans le tableau 1 montrent certaines différences entre les rats témoins, IRC, PTX et IRC-PTX. En effet, notre modèle d'IRC reflète bien la réalité des patients IRC puisque la clairance de créatinine des rats opérés est fortement diminuée, comme on l'observe chez les patients atteints d'IRC. Aussi, les niveaux sanguins de PTH sont élevés chez les rats souffrant d'IRC, suite à une hyperparathyroïdie secondaire, mais les rats ayant subi une PTX

ou une néphrectomie suivie d'une PTX ont une concentration sanguine de PTH légèrement plus faible que celle des rats témoins (tableau 3). Ces données nous indiquent que les PTX ont été totales et qu'elles normalisent bien les niveaux de PTH habituellement élevés en IRC.

Tableau 3 : Concentrations sériques de PTH.

	Rat		Humain	
Témoin	< 15 à 63 pg/mL	10^{-12} M	~ 47 pg/mL	10^{-12} M
IRC	404 à 5760 pg/mL	10^{-9} M	~ 1410 pg/mL	10^{-9} M
PTX	< 15 à 21 pg/mL	10^{-12} M		
IRC-PTX	< 15 à 20 pg/mL	10^{-12} M		
IRC Déplété	31 à 59 pg/mL			

Le premier objectif de ce projet de recherche était de déterminer le rôle de la PTH dans l'inhibition du CYP450 par le sérum de rats atteints d'IRC. Deux approches expérimentales ont été prises. La première était de dépléter de la PTH le sérum de rats atteints d'IRC. Pour ce faire, nous avons utilisé des billes enrobées d'anticorps anti-PTH. Le sérum de rats souffrant d'IRC contenait, avant la déplétion, environ 1734 $\mu\text{g/mL}$ de PTH alors que le sérum après déplétion en contenait environ 50 $\mu\text{g/mL}$. Des hépatocytes de rats normaux ont été incubés avec du sérum déplété de rats atteints d'IRC. Nous avons par la suite évalué l'expression protéique, génique et l'activité du CYP3A2 dans des hépatocytes incubés avec du sérum de rats témoins, IRC,

IRC-déplété et IRC-déplété dans lequel de la PTH commerciale a été ajoutée après la déplétion. Nos résultats montrent que l'expression protéique et génique, ainsi que l'activité du CYP450 3A2 dans les hépatocytes incubés avec le sérum déplété de rats souffrant d'IRC sont comparables à ce que l'on observe dans les hépatocytes incubés avec le sérum de rats témoins (figure 1 a et b). Le retrait de la PTH du sérum de rats atteints d'IRC élimine donc son effet inhibiteur sur le CYP3A2. Lorsque de la PTH commerciale (10^{-9} M) est ajoutée au sérum et mise en présence d'hépatocytes, l'expression protéique, génique et l'activité du CYP3A2 sont réduites de façon similaire à ce que l'on observe en présence de sérum de rats souffrants d'IRC. Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle la PTH est le facteur sérique chez les rats atteints d'IRC qui cause une inhibition du CYP3A2.

La deuxième approche expérimentale, afin de vérifier l'implication de la PTH dans l'inhibition du CYP450 chez les rats ayant une IRC, était de vérifier *in vitro* l'effet d'une PTX. Nous avons vérifié le rôle de la PTH dans l'inhibition du CYP450 par le sérum de rats atteints d'IRC et ayant subi une PTX. Cette fois-ci, la déplétion de la PTH se fait *in vivo*. Les sérums de rats témoins, IRC, IRC-PTX, PTX et IRC-PTX avec addition de PTH commerciale (10^{-9} M) ont été mis en présence d'hépatocytes de rats normaux. Nous avons ensuite évalué l'expression protéique, génique et l'activité du CYP3A2 après 24 heures de culture. Nos résultats démontrent que l'ablation des parathyroïdes avant la néphrectomie provoque un changement dans le sérum qui annihile la diminution de l'expression et l'activité du CYP3A2 des hépatocytes en culture

que l'on observe normalement avec du sérum de rat souffrant d'IRC, les ramenant à des niveaux comparables à ceux observés avec du sérum de rats témoins (figure 2 a et b). L'ablation des parathyroïdes empêche le développement de l'hyperparathyroïdie secondaire de l'IRC et semble supprimer l'inhibition de l'expression protéique et génique ainsi que de l'activité du CYP3A2. Finalement, l'ajout de la PTH commerciale dans le sérum IRC-PTX provoque une inhibition du CYP3A2, semblable à celle observée dans des hépatocytes incubés avec du sérum de rats souffrant d'IRC. Ces résultats suggèrent que la PTH est le facteur inhibant le CYP3A2 dans le sérum de rats atteints d'IRC.

Un troisième objectif de ma maîtrise était de préciser si la PTH était elle aussi impliquée *in vivo* dans la régulation négative du CYP450 induite par l'IRC. Pour ce faire, nous avons vérifié les effets *in vivo* de la PTX sur le CYP450 hépatique des rats ayant une IRC. Nous avons évalué l'expression protéique, génique et l'activité du CYP3A2 dans le foie des rats témoins, témoins, PTX, IRC et IRC-PTX. Comme dans le modèle *in vitro*, les rats IRC-PTX présentent une expression protéique ainsi qu'une activité du CYP3A2 comparable à celles des rats témoins et témoins-PTX (figure 3). Une grande diminution des concentrations sériques de la PTH suite à la PTX totale semble donc supprimer l'inhibition du CYP450 habituellement observée chez les rats atteints d'IRC. Il est cependant à noter que les niveaux d'expression et d'activité du CYP3A2 n'ont pas été normalisés de façon complète par la PTX, suggérant que la PTH n'est peut-être pas le seul médiateur responsable

in vivo de la réduction du CYP450 chez les rats atteints d'IRC. Nous reviendrons sur les autres médiateurs potentiels un peu plus loin dans la discussion.

Ces résultats montrent donc que la PTH est un médiateur important impliqué dans la régulation du CYP450 chez les rats souffrant d'IRC. Par conséquent, il était essentiel de déterminer quels sont les effets de l'hormone *in vitro* sur le CYP450 hépatique. L'expression protéique et génique du CYP3A2 ont été évaluées dans des hépatocytes incubés avec différentes concentrations de PTH 1-34 de rat. Ce fragment contient la portion N-terminale de la PTH intacte, un fragment actif. Des concentrations de PTH variant de 10^{-12} à 10^{-7} M ont été utilisées puisque la concentration normale de PTH chez l'homme se situe environ à 10^{-12} M, alors que la concentration chez un patient souffrant d'IRC est de l'ordre du 10^{-9} M [95, 96]. La courbe dose réponse obtenue montre que l'inhibition du CYP3A2 par la PTH est maximale à partir de 10^{-10} M (figure 4). Nos résultats suggèrent donc que, chez un individu IRC, la concentration de PTH présente (10^{-9} M) a la capacité d'inhiber l'expression protéique et génique du CYP3A2. Dans le même ordre d'idée, nous avons démontré que l'activité du CYP450 3A2 est diminuée de 40 % dans les hépatocytes de rats incubés avec de la PTH 1-34 (10^{-9} M) comparativement à des hépatocytes incubés dans un milieu sans PTH ajoutée (figure 5). Ces observations semblent confirmer que la PTH est un inhibiteur de l'expression et de l'activité du CYP3A2 dans des hépatocytes normaux. De façon très intéressante, la PTH affecte non seulement le

CYP3A2 qui est l'isoforme le plus impliqué dans le métabolisme des médicaments chez le rat, mais aussi le CYP2C11. En effet, nous avons observé que l'expression protéique du CYP2C11 est diminuée de 60 % dans les hépatocytes mis en présence de PTH (figure 6). Nous avons aussi évalué l'expression protéique du CYP450 1A1 et du 2E1 dans des hépatocytes incubés avec de la PTH. L'expression protéique du CYP1A1 est réduite de 68 % alors que celle du CYP2E1 reste inchangée. Ces résultats confirment que la PTH participe à la diminution de l'expression de plusieurs isoformes du CYP450 en IRC.

Les résultats de ces expériences montrent que la PTH est un médiateur majeur dans l'effet inhibiteur du sérum de rats ayant une IRC. De plus, la PTH est impliquée dans l'inhibition du CYP450 *in vivo* induite par l'IRC. Par contre *in vivo*, la PTX entraîne une récupération de l'expression protéique et génique ainsi que de l'activité du CYP450 qui n'est pas totale. Ceci suggère qu'*in vivo* la PTH n'est pas le seul facteur, chez les rats atteints d'IRC, qui provoque une inhibition du CYP450. Plusieurs explications sont possibles : faiblesse du modèle expérimental de la PTX ou présence *in vivo* d'autres facteurs, chez les rats souffrants d'IRC, tels que des toxines urémiques et des cytokines proinflammatoires qui pourraient être responsables de l'inhibition du CYP450 en collaboration avec la PTH.

Modèle expérimental

La PTX consiste à l'ablation chirurgicale des glandes parathyroïdes au nombre de 2 chez le rat et de 4 chez l'homme. L'ablation des parathyroïdes est une chirurgie fine. Il est donc très difficile de les retirer entièrement sans abîmer la thyroïde située à proximité, en raison de leur très petite taille chez le rat. Il est clair cependant que la PTX a été réussie puisque les concentrations de PTH ont chuté dramatiquement chez les rats IRC-PTX. Par contre, il est difficile d'évaluer cliniquement si un dommage a été créé au niveau de la glande thyroïde. Un dommage à la thyroïde peut causer de l'hypothyroïdie et celle-ci pourrait expliquer pourquoi la PTX ne prévient pas totalement la réduction du CYP450 chez les rats atteints d'IRC. Une étude publiée en 1991 par Ram *et al.* démontre que l'hypothyroïdie provoque une augmentation de l'expression protéique et génique du CYP450 3A2, diminue l'activité et l'ARNm du CYP2C11 et sans toutefois avoir d'effet sur l'expression du CYP2A2 [97]. Cette étude a été corroborée par une autre équipe qui confirme que l'hypothyroïdie induit le CYP3A2 alors qu'elle inhibe le CYP2C11 [98]. L'inhibition de l'activité du CYP2C11 est même directement proportionnelle à la diminution de concentration plasmatique d'hormones thyroïdiennes sanguines [99]. D'autres CYP450 sont aussi affectés par l'hypothyroïdie. En effet, le CYP4A2 et la réductase CYP450 hépatique sont diminués dans les cas d'hypothyroïdie [100, 101].

De plus, la PTX provoque des effets autres que l'abaissement des niveaux de PTH. Elle fait chuter dramatiquement les niveaux de calcium

sanguin et de phosphate. L'addition du gluconate de calcium dans l'eau de boisson des rats est alors essentielle pour normaliser les niveaux de calcium. Dans le groupe témoin, la calcémie est de 1.3 mmol/L, chez les rats ayant subi une PTX, elle est de 1.0 mmol/L et, chez les rats souffrant d'IRC et ayant subi une PTX, elle est de 1.2 mmol/L (tableau 1). La normalisation du calcium est difficile puisque la consommation de l'eau est légèrement inférieure chez les rats souffrant d'IRC et le gluconate donne un goût moins appétissant à l'eau. De plus, la consommation d'eau additionnée de gluconate est variable d'un rat à l'autre selon la sévérité de l'IRC, ce qui modifie énormément les concentrations de calcium chez les rats. Comme les niveaux de calcium ne sont pas constants d'un individu à l'autre, ceci pourrait avoir un effet sur l'inhibition du CYP450. Cette hypocalcémie légère pourrait expliquer pourquoi la PTX ne prévient pas totalement la réduction du CYP450 chez les rats qui souffrent d'IRC. L'hypocalcémie est associée à l'augmentation de la 1α -hydroxylase (CYP27B1) et à une diminution de la 24-hydroxylase (CYP24) [102, 103].

Une autre hypothèse pour expliquer nos résultats serait une dénutrition. En effet, la PTX et la néphrectomie sont des chirurgies assez lourdes et les rats souffrant d'IRC et les rats IRC-PTX mangent souvent moins que la moyenne des rats normaux en santé, même si les rats témoins sont nourris selon la quantité de nourriture consommée par les rats avec lesquels ils sont couplés, le poids des rats atteints d'IRC ou IRC-PTX est plus

faible (tableau 1). Cette dénutrition pourrait provoquer la production de corps cétoniques, comme l'acétone, l'acide acétoacétique et l'acide 3-hydroxybutyrique. Les effets des corps cétoniques sur les enzymes de phase I sont assez controversés, mais les études récentes proposent que l'acide acétoacétique augmente l'expression protéique du CYP2E1, alors qu'il diminue son expression génique [104]. Le même groupe affirme que l'acide 3-hydroxybutyrique n'a aucun effet sur le CYP450 [104]. Finalement, d'autres équipes ont démontré que l'acétone augmente l'activité des CYP2E1 et 3A2, alors que l'activité des CYP2D, 1A2 et 2C est diminuée [105, 106]. Donc, la dénutrition causée par les chirurgies pourrait modifier l'expression des CYP450 et ainsi diminuer l'effet des PTX.

Finalement, il est important de noter que la PTX n'affecte pas l'expression du récepteur à PTH dans le foie, [94] alors que l'IRC induit une réduction de son expression suite à une diminution de l'expression de l'ARNm et une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire [107].

Facteurs autres que PTH.

L'absence de normalisation du CYP450 suite à la PTX pourrait aussi suggérer qu'*in vivo*, il existe d'autres médiateurs que la PTH tels que des toxines urémiques ou des cytokines.

Les toxines urémiques sont des produits de la décomposition de molécules endogènes qui s'accumulent en IRC puisqu'ils sont habituellement éliminés par les reins. En effet, en IRC, la sécrétion rénale des ions organiques est diminuée [108-110]. En fait, plus de 90 toxines ont été dénombrées chez les patients urémiques [71]. Les ions organiques les plus connus sont le sulfate inodoxyle, l'acide 3-carboxy-4-méthyl-5-propyl-2-fluranpropanoïque, l'indoleacétate et l'acide hippurique et ils s'accumulent en grande quantité dans le sérum urémique [72]. Ces toxines urémiques sont impliquées dans de nombreuses complications en IRC, comme la dysfonction des plaquettes, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, la neuropathie, un changement dans la liaison des médicaments à l'albumine et des irrégularités dans la fonction thyroïdienne [72, 111-113]. Très peu d'études ont démontré une modulation des enzymes du CYP450 par les différentes toxines urémiques. Une seule étude a démontré que l'activité de la 1α -hydroxylase rénale (CYP27B1) est inhibée chez les rats perfusés avec un ultrafiltrat de sérum urémique, suggérant que les toxines urémiques sont responsables de cette diminution d'activité [114]. Par contre, les toxines urémiques sont connues pour avoir un effet sur les différents transporteurs hépatiques comme les MRP et la P-glycoprotéine. La diminution de ces transporteurs hépatiques par les toxines urémiques augmentent donc la biodisponibilité des médicaments [72]. De plus, certaines études suggèrent que l'activité des enzymes de phase II comme la glucuronidation et l'acétylation sont réduites

chez les individus atteints d'IRC, à cause de la présence des toxines urémiques [115, 116].

D'autres médiateurs possibles seraient les cytokines. Chez les patients IRC, les concentrations des cytokines proinflammatoires sont augmentées tel l'IL-1, l'IL-6, les protéines inhibitrices des granulocytes, les interférons (IFN), le facteur de nécrose tumorale (TNF) et le TGF- β [75-79]. La dialyse est responsable de la relâche de ces cytokines dans le sang [71]. L'IL-1, le TNF α , le TNF β , sont appelés les protéines de phase aiguë de type I, alors que l'IL-6 est dans la catégorie des protéines de phase aiguë de type II [80]. Or, ces cytokines sont aussi connues pour moduler les différents isoformes du CYP450 hépatique [80-85, 117-120]. En effet, de nombreuses études montrent que l'IL-1 diminue l'activité des CYP1A, 2B et 3A puisqu'il y a une diminution de l'ARNm des CYP1A1, 1A2, 2B, 2D6, 2C 2E1, 3A dans des cultures d'hépatocytes de rats et d'humains [83-85, 121, 122]. Ensuite, l'IL-6 et le TNF α réduisent l'activité des CYP1A, 2B et 3A et inhibent l'ARNm des CYP1A2, 2C, 2E1, 3A2 dans un modèle *in vitro* d'hépatocytes de rats et d'humains [83-85, 121, 122]. Les IFNs α et γ possèdent la capacité d'inhiber l'activité du CYP1A et du CYP3A. Ils inhibent aussi l'expression de l'ARNm des isoformes du CYP1A et 2E, mais n'affectent pas l'ARNm des CYP2C et 3A dans des hépatocytes humains [83, 84]. Le TGF- β 1 provoque une diminution de l'activité, de l'ARNm et de l'expression protéique du CYP1A

[84]. Tous ces résultats ont été obtenus dans des cultures primaires d'hépatocytes de rats ou d'humains.

Outres ces études *in vitro*, il existe aussi un modèle animal d'inflammation basé sur l'administration de lipopolysaccharide (LPS), un composant de la membrane des bactéries gram-négatives. Le LPS stimule la relâche de nombreuses cytokines proinflammatoires dans le sang, comme l'IL-1, l'IL-6 et le TNF α [117]. Chez la souris, l'injection du LPS inhibe l'expression d'ARNm du CYP1A2, 2A5, 2C29, 2E1, 3A11 (l'équivalent du 3A2 chez le rat et du 3A4 chez l'humain), 4A10 et 4A14 [117, 123]. Comme plusieurs cytokines sont induites simultanément dans le modèle d'administration de LPS, il est difficile d'évaluer la contribution de chaque cytokine dans l'inhibition du CYP450. Des résultats semblables ont été observés avec un modèle d'inflammation aseptique. Des hépatocytes de lapins ont été incubés avec du sérum de lapin traité à la térébenthine ou avec du sérum d'humain présentant des signes d'infection respiratoire virale. Le fractionnement du sérum et l'immuno-neutralisation de différentes cytokines indiquent que l'IL-6, l'IFN γ , l'IL-1 β et le TNF α sont responsables de l'inhibition de l'activité et de l'expression protéique et génique du CYP1A1, 1A2 et 3A6 (équivalent au 3A2 chez le rat et au 3A4 chez l'humain) [120, 124]. Il est donc aussi possible que les cytokines participent à l'inhibition du CYP450 en plus de la PTH. Ceci expliquerait que l'inhibition produite par la PTH n'est pas aussi grande que dans le sérum de rats atteints d'IRC.

En résumé, il est clair que les cytokines ont la capacité d'inhiber le CYP450 et qu'*in vivo* elles pourraient être impliquées dans la réduction du CYP450 hépatique induite par l'IRC.

Comme plusieurs études l'ont démontré, l'IL-6 produit une diminution du CYP450 hépatique. Cette cytokine est augmentée chez les patients atteints d'IRC puisqu'ils se trouvent dans un état d'inflammation. Aussi, les niveaux d'IL-6 sont augmentés chez les humains et les rongeurs en réponse à un excès de PTH circulant [125, 126]. L'équipe de Mitnick a récemment démontré que la présence de PTH augmente la production d'IL-6 ainsi que son récepteur au niveau du foie [127]. Nos résultats montrent que l'ajout de PTH dans les cultures d'hépatocytes inhibe le CYP450. Comme l'étude de Mitnick le démontre, l'ajout de la PTH augmente la relâche de l'IL-6 et l'IL-6 peut induire une inhibition du CYP450. Donc, il serait intéressant de vérifier si l'inhibition du CYP450 par la PTH est médiée par l'augmentation de la production de l'IL-6 dans notre modèle d'hépatocytes de rats ou dans le modèle *in vivo*. L'utilisation d'un modèle murin d'IRC pourrait nous permettre d'utiliser des souris mutantes pour le gène de l'IL-6 et d'ainsi évaluer son implication dans l'inhibition du CYP450 par la PTH.

Mécanismes d'action de la PTH.

Nos résultats démontrent que la PTH est probablement le médiateur sérique le plus important, chez les individus atteints d'IRC, pour expliquer la

réduction du CYP450 hépatique. De plus, nous avons démontré que cette hormone module *in vitro* le CYP450 hépatique. Les mécanismes d'action de la PTH demeurent cependant imprécis.

Il est intéressant de mentionner qu'une augmentation de PTH a déjà été associée à une diminution de l'ARNm de certaines protéines hépatiques comme la lipase hépatique, les récepteurs de la vasopressine et de l'angiotensine II, ainsi que l'IGF-1 dans les cardiomyocytes [86-89]. Les mécanismes qui provoquent l'inhibition de ces protéines par la PTH sont associés à une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), à l'activation de la PKC, à une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) ou à l'activation du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) [96, 128, 129]. Des mécanismes similaires pourraient être impliqués dans l'inhibition du CYP450 par la PTH.

a) Voie de la PKA

La première hypothèse est que l'activation de l'AMPc serait impliquée dans l'inhibition du CYP450 par la PTH. La voie de signalisation de la PTH inclut la production d'AMPc qui provoque l'activation de la protéine kinase A (PKA), ce qui entraîne la phosphorylation de plusieurs protéines effectrices, comme le *cyclic adenosine monophosphate response element binding protein* (CREB) et la glycogène synthase kinase 3-béta (GSK-3 β) [130, 131].

Les effets de l'AMPc sur le CYP450 demeurent controversés, mais une grande majorité des études démontrent que l'augmentation d'AMPc inhibe le CYP450. Par exemple, la production de l'AMPc entraîne la phosphorylation du CYP450, ce qui cause une diminution de l'activité des différents isoformes du CYP450 [131-136]. L'augmentation de la production de l'AMPc provoque aussi une inhibition de l'expression génique du CYP450 1A1, 2B1, 2B6 et 3A1 [137, 138], inhibe l'activité du CYP450 2B et 2E1 [131, 136] et diminue l'induction du CYP450 2B1 et 3A par le phénobarbital [117].

b) Activation PKC

Il a été proposé que la PTH pourrait activer directement la protéine kinase C (PKC) [130] et ceci pourrait mener à une inhibition du CYP450 [139, 140]. La PKC peut inhiber l'activité et l'expression de plusieurs isoformes par différents moyens. En effet, l'activation de la voie de signalisation des PKC diminue l'activité du récepteur pregnane X (PXR), ce qui inhibe l'expression génique du CYP3A hépatique [140]. Les PKC peuvent diminuer le récepteur à vitamine D (VDR) et ainsi inhiber l'expression de l'ARNm du 3A4 [141]. Aussi, la PKC diminue le promoteur du CYP11B2 et peut provoquer une diminution de son activité [142]. Par contre, les PKC augmentent l'activité des CYP1B1 et CYP1A1, puisque le récepteur Ah est inactivé par une diminution de la phosphorylation des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAPK) [143].

c) Augmentation du calcium intracellulaire

L'IRC est associée à une forte augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ dans plusieurs types cellulaires dont les hépatocytes et les cardiomyocytes [86, 144, 145]. Chez les individus souffrant d'IRC, l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ est principalement due à l'excès de PTH et est l'une des causes des dysfonctions cellulaires [86, 89, 144-146]. L'équipe de Klin a démontré que chez les rats IRC-PTX, la production de la lipase hépatique, des récepteurs d'angiotensine II et de la vasopressine retourne à la normale parce que l'excès de PTH est prévenu par les PTX et qu'il y a une normalisation du calcium sanguin [88]. En plus de la PTX, les rats ont été traités avec du vérapamil, un antagoniste des canaux calciques qui a pour effet de normaliser les concentrations de calcium sérique. L'utilisation du vérapamil normalise la production de la lipase hépatique, l'expression des récepteurs d'angiotensine II et de la vasopressine tout comme une PTX [88]. De plus, l'activité de la lipase hépatique est diminuée dans les hépatocytes incubés de la PTH 1-34 (10^{-7} M et 10^{-6} M) [88]. En bref, la prévention de l'HPTS et l'utilisation de bloqueurs de canaux calciques préviennent la modulation de la lipase hépatique, des récepteurs d'angiotensine II et de la vasopressine par la PTH [88]. Donc, la PTH induit l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ via la stimulation d'une protéine G – adénylate cyclase – AMPc qui mène à la stimulation du système de transport du calcium pouvant être inhibé par des bloqueurs de canaux calciques [87]. L'activation des PKC par la PTH peut aussi conduire à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ [87].

Cependant, l'implication de l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ dans la régulation du CYP450 sont controversés. Premièrement, il a été démontré que l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ cause une élévation de l'expression de l'ARNm de l'aldostérone synthase (CYP450 11B) [147, 148]. Par contre, il a été montré qu'une diminution du $[Ca^{2+}]_i$ est associée à une augmentation du CYP450 microsomial [149]. Il est connu depuis longtemps que le calcium intracellulaire est un second messager dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. Les concentrations cytosoliques sont finement régulées, puisqu'une faible augmentation de courte durée par rapport au niveau basal envoie un signal à la cellule. L'élévation prolongée des niveaux basaux du $[Ca^{2+}]_i$ chez les individus atteints d'IRC perturbe les signaux envoyés à la cellule et mène à une dysfonction de la cellule [89]. Donc, l'inhibition du CYP450 par la PTH pourrait s'effectuer par l'augmentation des niveaux de $[Ca^{2+}]_i$.

d) Activation NF- κ B

Finalement, toujours afin de déterminer par quels mécanismes la PTH inhibe le CYP450, nous avons émis une quatrième hypothèse, soit celle de l'activation du NF- κ B. Le NF- κ B est un facteur de transcription pléiotropique qui joue un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologiques comme la réponse immunitaire, les réactions inflammatoires, la prolifération cellulaire, l'apoptose et le développement [150]. Le NF- κ B est un hétérodimère constitué de deux sous-unités : le p65 et le p50 [150, 151]. De nombreuses études démontrent que le NF- κ B est impliqué dans la

diminution de l'expression du CYP450 par les cytokines proinflammatoires et le LPS [151-153]. De plus, il a été montré que la PTH cause une augmentation du NF- κ B dans les cellules ostéoblastiques de rats et d'humains et ce, de façon dose et temps dépendants [128, 129]. La PTH pourrait donc agir via le NF- κ B afin d'inhiber le CYP450.

En conclusion, nous avons démontré que la PTH est l'un des médiateurs sériques impliqués dans la régulation négative du CYP450 hépatique par le sérum chez les rats souffrant d'IRC. Ensuite, nous avons montré que la PTH est un facteur impliqué dans la réduction *in vivo* du CYP450 hépatique chez les rats atteints d'IRC. Finalement, nous avons confirmé que la PTH inhibe l'expression protéique, l'expression génique et l'activité du CYP450 hépatique *in vitro*. Les résultats obtenus expliqueraient la diminution du métabolisme hépatique des médicaments observée chez les patients atteints d'IRC. Il reste maintenant à déterminer par quels mécanismes la PTH inhibe le CYP450.

8. Conclusions

Notre laboratoire a récemment démontré que chez le rat, l'IRC est associée à une réduction du CYP450 hépatique et intestinal. Cette réduction est causée par la présence de facteurs sériques. Dans ce projet de maîtrise, nous avons démontré que la PTH est un des facteurs sériques causant la diminution du CYP450 hépatique, chez les rats atteints d'IRC. En effet, nous avons montré que la déplétion en PTH du sérum de rats souffrant d'IRC rétablit les niveaux de CYP450 dans les hépatocytes incubés avec a) du sérum IRC déplété et b) du sérum de rat IRC-PTX. Ensuite, nous avons effectué une déplétion de la PTH par le biais de PTX dans un modèle *in vivo*. Dans ce modèle *in vivo*, nous avons aussi montré que la PTX rétablit l'expression du CYP450. Aussi, l'ajout de PTH 1-34 provoque une inhibition du CYP450 dans les hépatocytes en culture. D'autres isoformes importants dans le métabolisme des médicaments chez le rat sont aussi diminués en présence de PTH 1-34, comme le CYP1A1 et CYP2C11, alors que le CYP2E1 reste inchangé.

Les mécanismes d'action de la PTH sur le CYP450 demeurent mal compris. Toutefois, on peut émettre quelques hypothèses puisque la PTH peut activer les PKA dépendantes de l'AMPc, les PKC sont aussi activées par la PTH. L'excès de PTH provoque une forte augmentation de calcium intracellulaire et une activation du NF- κ B. Toutes ces voies sont aussi

impliquées dans la modulation du CYP450. Nous allons donc explorer quelles voies de signalisation sont empruntée par la PTH afin d'inhiber le CYP450.

9. Références

1. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. Vol. 10nd edition. 2000, Philadelphie: Saunder.
2. Levey, A.S., *Clinical practice. Nondiabetic kidney disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(19): p. 1505-11.
3. *Registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes, Rapport de 2001, Dialyse et transplantations*. Vol. Volume 1. 2001, Ottawa (Ontario): Institut canadien d'information sur la santé.
4. Prichard, S.S., *The costs of dialysis in Canada*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(Suppl 1): p. 22-4.
5. McLaughlin, K., et al., *An economic evaluation of early versus late referral of patients with progressive renal insufficiency*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(5): p. 1122-8.
6. Grabe, D.W., et al., *Evaluation of drug-related problems in an outpatient hemodialysis unit and the impact of a clinical pharmacist*. Clin Nephrol, 1997. **47**(2): p. 117-21.
7. Kaplan, B., et al., *Chronic hemodialysis patients. Part I: Characterization and drug-related problems*. Ann Pharmacother, 1994. **28**(3): p. 316-9.
8. Cantu, T.G., et al., *Drug prescribing for patients with changing renal function*. Am J Hosp Pharm, 1992. **49**(12): p. 2944-8.

9. Campoy, S. and R. Elwell, *Pharmacology & CKD: how chronic kidney disease and its complications alter drug response*. Am J Nurs, 2005. **105**(9): p. 60-71; quiz 72.
10. Winter, M., *Basic clinical pharmacokinetic*. Vol. 3rd edition. 1994, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
11. Lam, Y.W., et al., *Principles of drug administration in renal insufficiency*. Clin Pharmacokinet, 1997. **32**(1): p. 30-57.
12. Etemad, B., *Gastrointestinal complications of renal failure*. Gastroenterol Clin North Am, 1998. **27**(4): p. 875-92.
13. St Peter, W.L., K.A. Redic-Kill, and C.E. Halstenson, *Clinical pharmacokinetics of antibiotics in patients with impaired renal function*. Clin Pharmacokinet, 1992. **22**(3): p. 169-210.
14. Nolin, T.D., R.F. Frye, and G.R. Matzke, *Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease*. Am J Kidney Dis, 2003. **42**(5): p. 906-25.
15. Gugler, R. and H. Allgayer, *Effects of antacids on the clinical pharmacokinetics of drugs. An update*. Clin Pharmacokinet, 1990. **18**(3): p. 210-9.
16. Maton, P.N. and M.E. Burton, *Antacids revisited: a review of their clinical pharmacology and recommended therapeutic use*. Drugs, 1999. **57**(6): p. 855-70.
17. Tilstone, W.J. and A. Fine, *Furosemide kinetics in renal failure*. Clin Pharmacol Ther, 1978. **23**(6): p. 644-50.

18. Watkins, P.B., et al., *Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man*. J Clin Invest, 1987. **80**(4): p. 1029-36.
19. Leblond, F.A., et al., *Downregulation of intestinal cytochrome p450 in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(6): p. 1579-85.
20. Lown, K.S., et al., *Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine*. Clin Pharmacol Ther, 1997. **62**(3): p. 248-60.
21. Schinkel, A.H., *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Semin Cancer Biol, 1997. **8**(3): p. 161-70.
22. Kuniyama, M., et al., *Renal excretion of rhodamine 123, a P-glycoprotein substrate, in rats with glycerol-induced acute renal failure*. J Pharm Pharmacol, 1998. **50**(10): p. 1161-5.
23. Veau, C., et al., *Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(8): p. 1607-14.
24. Naud, J., et al., *Downregulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure*. Gastroenterology, Soumis.
25. Turnheim, K., *Pitfalls of pharmacokinetic dosage guidelines in renal insufficiency*. Eur J Clin Pharmacol, 1991. **40**(1): p. 87-93.
26. Matzke, G.R. and R.F. Frye, *Drug administration in patients with renal insufficiency. Minimising renal and extrarenal toxicity*. Drug Saf, 1997. **16**(3): p. 205-31.

27. Vanholder, R., R. De Smet, and S. Ringoir, *Factors influencing drug protein binding in patients with end stage renal failure*. Eur J Clin Pharmacol, 1993. **44**(Suppl 1): p. S17-21.
28. Vanholder, R., et al., *Drug protein binding in chronic renal failure: evaluation of nine drugs*. Kidney Int, 1988. **33**(5): p. 996-1004.
29. Elston, A.C., M.K. Bayliss, and G.R. Park, *Effect of renal failure on drug metabolism by the liver*. Br J Anaesth, 1993. **71**(2): p. 282-90.
30. Gabardi, S. and S. Abramson, *Drug dosing in chronic kidney disease*. Med Clin North Am, 2005. **89**(3): p. 649-87.
31. Swan, S.K. and W.M. Bennett, *Drug dosing guidelines in patients with renal failure*. West J Med, 1992. **156**(6): p. 633-8.
32. Talbert, R.L., *Drug dosing in renal insufficiency*. J Clin Pharmacol, 1994. **34**(2): p. 99-110.
33. Mycek, M.J., R.A. Harvey, and P.C. Champe, *Pharmacology*. Vol. 2nd edition. 2000, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
34. Katzung, B.G., *Basic and clinical pharmacology*. Vol. 9nd edition. 2004, New York: Lange Medical Books/McGray-Hill.
35. Lewis, D.F.V., *Guide to cytochrome P450, Structure and function*. 2001, Boca Raton: CRC Press.
36. Guengerich, F.P., *Cytochromes P450, drugs, and diseases*. Mol Interv, 2003. **3**(4): p. 194-204.
37. Omura, T. and R. Sato, *A new cytochrome in liver microsomes*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 1375-6.

38. Omura, T. and R. Sato, *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2370-2378.
39. Bernhardt, R., *Cytochrome P450: Structure, function and generation of reactive oxygen species*. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, 1995. **127**: p. 137-221.
40. Williams, J.A., et al., *Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue*. Carcinogenesis, 2000. **21**(9): p. 1683-9.
41. Waterman, M.R., *Cytochrome P450 : Cellular distribution and structural considerations*. Current opinion in structural biology, 1992. **2**: p. 384-387.
42. Hellmold, H., et al., *Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 886-95.
43. Hakkola, J., et al., *Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta*. Biochem Pharmacol, 1996. **51**(4): p. 403-11.
44. Hakkola, J., et al., *Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human fetoplacental unit: role in intrauterine toxicity*. Crit Rev Toxicol, 1998. **28**(1): p. 35-72.
45. Liston, H.L., J.S. Markowitz, and C.L. DeVane, *Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology*. J Clin Psychopharmacol, 2001. **21**(5): p. 500-15.

46. Levy, M., Y. Caraco, and G. Geisslinger, *Drug acetylation in liver disease*. Clin Pharmacokinet, 1998. **34**(3): p. 219-26.
47. Kim, Y.G., et al., *Decreased acetylation of isoniazid in chronic renal failure*. Clin Pharmacol Ther, 1993. **54**(6): p. 612-20.
48. du Souich, P. and S. Erill, *Metabolism of procainamide in patients with chronic heart failure, chronic respiratory failure and chronic renal failure*. Eur J Clin Pharmacol, 1978. **14**(1): p. 21-7.
49. Nicolas, P., et al., *Clinical pharmacokinetics of diacerein*. Clin Pharmacokinet, 1998. **35**(5): p. 347-59.
50. Osborne, R., et al., *The pharmacokinetics of morphine and morphine glucuronides in kidney failure*. Clin Pharmacol Ther, 1993. **54**(2): p. 158-67.
51. Loehrer, F.M., et al., *Evidence for disturbed S-adenosylmethionine : S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions?* Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(3): p. 656-61.
52. Perna, A.F., et al., *Membrane protein damage and methylation reactions in chronic renal failure*. Kidney Int, 1996. **50**(2): p. 358-66.
53. Perna, A.F., et al., *Homocysteine and transmethylations in uremia*. Kidney Int Suppl, 2001. **78**: p. S230-3.
54. Balant, L.P., P. Dayer, and J. Fabre, *Consequences of renal insufficiency on the hepatic clearance of some drugs*. Int J Clin Pharmacol Res, 1983. **3**(6): p. 459-74.

55. Gibson, T.P., *Renal disease and drug metabolism: an overview*. Am J Kidney Dis, 1986. **8**(1): p. 7-17.
56. Touchette, M.A. and R.L. Slaughter, *The effect of renal failure on hepatic drug clearance*. DICP, 1991. **25**(11): p. 1214-24.
57. Frye, R.F., et al. *Effect of renal insufficiency on CYP activity*. in *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1996.
58. Wedlund, P.J., et al., *Mephenytoin hydroxylation deficiency in Caucasians: frequency of a new oxidative drug metabolism polymorphism*. Clin Pharmacol Ther, 1984. **36**(6): p. 773-80.
59. Kevorkian, J.P., et al., *Assessment of individual CYP2D6 activity in extensive metabolizers with renal failure: comparison of sparteine and dextromethorphan*. Clin Pharmacol Ther, 1996. **59**(5): p. 583-92.
60. Rostami-Hodjegan, A., H.K. Kroemer, and G.T. Tucker, *In-vivo indices of enzyme activity: the effect of renal impairment on the assessment of CYP2D6 activity*. Pharmacogenetics, 1999. **9**(3): p. 277-86.
61. Leber, H.W. and G. Schutterle, *Oxidative drug metabolism in liver microsomes from uremic rats*. Kidney Int, 1972. **2**(3): p. 152-8.
62. Leber, H.W., L. Gleumes, and G. Schutterle, *Enzyme induction in the uremic liver*. Kidney Int Suppl, 1978(8): p. S43-8.
63. Van Peer, A.P. and F.M. Belpaire, *Hepatic oxidative drug metabolism in rats with experimental renal failure*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1977. **228**(2): p. 180-3.

64. Patterson, S.E. and V.H. Cohn, *Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure*. *Biochem Pharmacol*, 1984. **33**(5): p. 711-6.
65. Leblond, F.A., et al., *Decreased in vivo metabolism of drugs in chronic renal failure*. *Drug Metab Dispos*, 2000. **28**(11): p. 1317-20.
66. Dowling, T.C., et al., *Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease*. *Clin Pharmacol Ther*, 2003. **73**(5): p. 427-34.
67. Leblond, F., et al., *Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(2): p. 326-32.
68. Terao, N. and D.D. Shen, *Reduced extraction of l-propranolol by perfused rat liver in the presence of uremic blood*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1985. **233**(2): p. 277-84.
69. Guevin, C., et al., *Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure: role of uremic mediators*. *Br J Pharmacol*, 2002. **137**(7): p. 1039-46.
70. Michaud, J., et al., *Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450*. *Br J Pharmacol*, 2005. **144**(8): p. 1067-77.
71. Yavuz, A., et al., *Uremic toxins: a new focus on an old subject*. *Semin Dial*, 2005. **18**(3): p. 203-11.
72. Sun, H., L. Frassetto, and L.Z. Benet, *Effects of renal failure on drug transport and metabolism*. *Pharmacol Ther*, 2006. **109**(1-2): p. 1-11.
Epub 2005 Aug 8.

73. Bistran, B.R., *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): p. S113-7.
74. Stenvinkel, P., et al., *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure*. Kidney Int, 1999. **55**(5): p. 1899-911.
75. Akahoshi, T., et al., *In-vivo induction of monocyte chemotactic and activating factor in patients with chronic renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 1995. **10**(12): p. 2244-9.
76. Higuchi, T., et al., *Increased production of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist by peripheral blood mononuclear cells in undialyzed chronic renal failure*. Nephron, 1997. **76**(1): p. 26-31.
77. Oettinger, C.W., et al., *The effect of uremia on tumor necrosis factor-alpha release after an in vitro whole-blood endotoxin challenge*. J Am Soc Nephrol, 1994. **4**(11): p. 1890-5.
78. Sunder-Plassmann, G., et al., *Functional characterization of cytokine autoantibodies in chronic renal failure patients*. Kidney Int, 1994. **45**(5): p. 1484-8.
79. Ziesche, R., et al., *A granulocyte inhibitory protein overexpressed in chronic renal disease regulates expression of interleukin 6 and interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(1): p. 301-5.
80. Morgan, E.T., *Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection*. Drug Metab Rev, 1997. **29**(4): p. 1129-88.

81. Renton, K.W., *Cytochrome p450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection*. *Curr Drug Metab*, 2004. **5**(3): p. 235-43.
82. Raj, D.S., et al., *Markers of inflammation, proteolysis, and apoptosis in ESRD*. *Am J Kidney Dis*, 2003. **42**(6): p. 1212-20.
83. Abdel-Razzak, Z., et al., *Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture*. *Mol Pharmacol*, 1993. **44**(4): p. 707-15.
84. Abdel-Razzak, Z., 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): p. 1100-10.
85. Abdel-Razzak, Z., et al., *Interleukin-1 beta antagonizes phenobarbital induction of several major cytochromes P450 in adult rat hepatocytes in primary culture*. *FEBS Lett*, 1995. **366**(2-3): p. 159-64.
86. Massry, S.G., et al., *Impaired agonist-induced calcium signaling in hepatocytes from chronic renal failure rats*. *Kidney Int*, 1995. **48**(4): p. 1324-31.
87. Klin, M., et al., *Mechanisms of PTH-induced rise in cytosolic calcium in adult rat hepatocytes*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(5 Pt 1): p. G754-63.
88. Klin, M., et al., *Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(10): p. 2167-73.

89. Qing, D.P., 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): p. 84-92.
90. Silver, J. and R. Levi, *Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease*. Kidney Int Suppl, 2005(95): p. S8-12.
91. Silver, J. and R. Levi, *Cellular and molecular mechanisms of secondary hyperparathyroidism*. Clin Nephrol, 2005. **63**(2): p. 119-26.
92. Levi, R. and J. Silver, *Pathogenesis of parathyroid dysfunction in end-stage kidney disease*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(3): p. 342-5. Epub 2004 Nov 10.
93. Segre, G.V., et al., *Metabolism of parathyroid hormone: physiologic and clinical significance*. Am J Med, 1974. **56**(6): p. 774-84.
94. Smogorzewski, M., et al., *Parathyroidectomy does not affect mRNA of PTH-PTHrP receptor in kidney, liver, and heart*. Am J Nephrol, 1997. **17**(2): p. 187-92.
95. Goto, M., et al., *Decreased sensitivity of distal nephron and collecting duct to parathyroid hormone in pseudohypoparathyroidism type I*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(9): p. 1965-70.
96. Massry, S.G. and M. Smogorzewski, *Parathyroid hormone, chronic renal failure and the liver*. Kidney Int Suppl, 1997. **62**: p. S5-7.
97. Ram, P.A. and D.J. Waxman, *Hepatic P450 expression in hypothyroid rats: differential responsiveness of male-specific P450 forms 2a (IIIA2),*

- 2c (IIC11), and RLM2 (IIA2) to thyroid hormone. Mol Endocrinol, 1991. 5(1): p. 13-20.*
98. Badger, D., et al., *Reduction of thyroid hormone may participate in the modulation of cytochromes P450 2C11 and 3A2 by retinol. Life Sci, 1998. 63(25): p. PL367-72.*
99. Kraner, J.C., et al., *Suppression of rat hepatic microsomal cytochromes P450 by cyclophosphamide is correlated with plasma thyroid hormone levels and displays differential strain sensitivity. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 276(1): p. 258-64.*
100. Ram, P.A. and D.J. Waxman, *Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms. J Biol Chem, 1992. 267(5): p. 3294-301.*
101. Webb, S.J., et al., *Regulation of CYP4A expression in rat by dehydroepiandrosterone and thyroid hormone. Mol Pharmacol, 1996. 49(2): p. 276-87.*
102. Boyle, I.T., R.W. Gray, and H.F. DeLuca, *Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxycholecalciferol and 21,25-dihydroxycholecalciferol. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. 68(9): p. 2131-4.*
103. Omdahl, J.L., et al., *Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. Nat New Biol, 1972. 237(71): p. 63-4.*

104. Abdelmegeed, M.A., et al., *Acetoacetate induces CYP2E1 protein and suppresses CYP2E1 mRNA in primary cultured rat hepatocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(1): p. 203-13. Epub 2005 Jun 24.
105. Kachula, S.O. and O.O. Pentiuk, *[Effect of starvation and acetone on the enzyme systems of biotransformation and toxicity of xenobiotics--CYP2E1 substrates in rats]*. Ukr Biokhim Zh, 2004. **76**(1): p. 114-22.
106. Barnett, C.R., et al., *Induction of rat hepatic mixed-function oxidases by acetone and other physiological ketones: their role in diabetes-induced changes in cytochrome P450 proteins*. Xenobiotica, 1992. **22**(12): p. 1441-50.
107. Massry, S.G. and M. Smogorzewski, *PTH-PTHrP receptor in chronic renal failure*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(Suppl 1): p. 50-7.
108. Lin, J.H. and T.H. Lin, *Renal handling of drugs in renal failure. I: Differential effects of uranyl nitrate- and glycerol-induced acute renal failure on renal excretion of TEAB and PAH in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **246**(3): p. 896-901.
109. Inui, K., et al., *Decreased transport of p-aminohippurate in renal basolateral membranes isolated from rats with acute renal failure*. Pharm Res, 1989. **6**(11): p. 954-7.
110. Tanigawara, Y., et al., *Moment analysis of drug disposition in kidney. III: Transport of p-aminohippurate and tetraethylammonium in the perfused kidney isolated from uranyl nitrate-induced acute renal failure rats*. J Pharm Sci, 1990. **79**(3): p. 249-56.

111. Niwa, T., et al., *Serum levels of 3-deoxyglucosone and tissue contents of advanced glycation end products are increased in streptozotocin-induced diabetic rats with nephropathy*. *Nephron*, 1996. **74**(3): p. 580-5.
112. Niwa, T., M. Ise, and T. Miyazaki, *Progression of glomerular sclerosis in experimental uremic rats by administration of indole, a precursor of indoxyl sulfate*. *Am J Nephrol*, 1994. **14**(3): p. 207-12.
113. Dzurik, R., et al., *Hippurate participates in the correction of metabolic acidosis*. *Kidney Int Suppl*, 2001. **78**: p. S278-81.
114. Hsu, C.H. and S. Patel, *Uremic plasma contains factors inhibiting 1 alpha-hydroxylase activity*. *J Am Soc Nephrol*, 1992. **3**(4): p. 947-52.
115. Patterson, S.E. and V.H. Cohn, *Hepatic drug metabolism in rats with experimental chronic renal failure*. *Biochem Pharmacol*, 1984. **33**(5): p. 711-6.
116. Taburet, A.M. and E. Singlas, *Drug interactions with antiviral drugs*. *Clin Pharmacokinet*, 1996. **30**(5): p. 385-401.
117. Morgan, E.T., *Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how?* *Drug Metab Dispos*, 2001. **29**(3): p. 207-12.
118. Renton, K.W., *Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation*. *Pharmacol Ther*, 2001. **92**(2-3): p. 147-63.
119. Kourylko, O., et al., *Modulation of cyp1a2 and cyp3a6 catalytic activities by serum from rabbits with a turpentine-induced inflammatory*

- reaction and interleukin 6*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(1): p. 27-35.
Epub 2005 Oct 4.
120. Bleau, A.M., et al., *Interleukin-1beta, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes*. Eur J Pharmacol, 2003. **473**(2-3): p. 197-206.
121. Chen, J.Q., et al., *Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes: comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6*. Mol Pharmacol, 1995. **47**(5): p. 940-7.
122. Muntane-Relat, J., et al., *Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture*. Hepatology, 1995. **22**(4 Pt 1): p. 1143-53.
123. Richardson, T.A. and E.T. Morgan, *Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(2): p. 703-9. Epub 2005 Apr 28.
124. Bleau, A.M., et al., *Cytochrome P450 inactivation by serum from humans with a viral infection and serum from rabbits with a turpentine-induced inflammation: the role of cytokines*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(8): p. 1777-84.

125. Grey, A., et al., *A role for interleukin-6 in parathyroid hormone-induced bone resorption in vivo*. *Endocrinology*, 1999. **140**(10): p. 4683-90.
126. Grey, A., et al., *Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption--a clinical research center study*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(10): p. 3450-4.
127. Mitnick, M.A., et al., *Parathyroid hormone induces hepatic production of bioactive interleukin-6 and its soluble receptor*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. **280**(3): p. E405-12.
128. Ali, N.N., V. Gilston, and P.G. Winyard, *Activation of NF-kappaB in human osteoblasts by stimulators of bone resorption*. *FEBS Lett*, 1999. **460**(2): p. 315-20.
129. Guillen, C., et al., *Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein increase interleukin-6 by nuclear factor-kappa B activation in osteoblastic cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(31): p. 28109-17.
130. Swarthout, J.T., et al., *Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells*. *Gene*, 2002. **282**(1-2): p. 1-17.
131. Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch, *Fast regulation of cytochrome P450 activities by phosphorylation and consequences for drug metabolism and toxicity*. *Biol Chem*, 2002. **383**(10): p. 1587-92.

132. Jansson, I., et al., *Inverse relationship between cytochrome P-450 phosphorylation and complexation with cytochrome b5*. Arch Biochem Biophys, 1987. **259**(2): p. 441-8.
133. Jansson, I., et al., *Relationship between phosphorylation and cytochrome P450 destruction*. Arch Biochem Biophys, 1990. **283**(2): p. 285-92.
134. Pyerin, W., F. Horn, and H. Taniguchi, *Posttranslational modifications of the cytochrome P-450 monooxygenase system*. J Cancer Res Clin Oncol, 1987. **113**(2): p. 155-9.
135. Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch, *Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 446-9. Epub 2005 Aug 22.
136. Oesch-Bartlomowicz, B. and F. Oesch, *Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch*. Arch Biochem Biophys, 2003. **409**(1): p. 228-34.
137. Sidhu, J.S. and C.J. Omiecinski, *cAmp-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12762-73.
138. Galisteo, M., et al., *Involvement of cyclic nucleotide- and calcium-regulated pathways in phenobarbital-induced cytochrome P-450 3A expression in mouse primary hepatocytes*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(3): p. 1270-7.

139. LeHoux, J.G., G. Dupuis, and A. Lefebvre, *Regulation of CYP11B2 gene expression by protein kinase C*. *Endocr Res*, 2000. **26**(4): p. 1027-31.
140. Ding, X. and J.L. Staudinger, *Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **69**(5): p. 867-73. Epub 2005 Jan 21.
141. Hara, H., Y. Yasunami, and T. Adachi, *Alteration of cellular phosphorylation state affects vitamin D receptor-mediated CYP3A4 mRNA induction in Caco-2 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296**(1): p. 182-8.
142. LeHoux, J.G., G. Dupuis, and A. Lefebvre, *Control of CYP11B2 gene expression through differential regulation of its promoter by atypical and conventional protein kinase C isoforms*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(11): p. 8021-8. Epub 2000 Dec 13.
143. Ikegwuonu, F.I., M. Christou, and C.R. Jefcoate, *Regulation of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in mouse embryo fibroblast (C3H10T1/2) cells by protein kinase C (PKC)*. *Biochem Pharmacol*, 1999. **57**(6): p. 619-30.
144. Massry, S.G. and G.Z. Fadda, *Chronic renal failure is a state of cellular calcium toxicity*. *Am J Kidney Dis*, 1993. **21**(1): p. 81-6.
145. Massry, S.G. and M. Smogorzewski, *The mechanisms responsible for the PTH-induced rise in cytosolic calcium in various cells are not uniform*. *Miner Electrolyte Metab*, 1995. **21**(1-3): p. 13-28.

146. Klin, M., M. Smogorzewski, and S.G. Massry, *Chronic renal failure increases cytosolic Ca²⁺ of hepatocytes*. *Am J Physiol*, 1995. **269**(1 Pt 1): p. G103-9.
147. Clyne, C.D., P.C. White, and W.E. Rainey, *Calcium regulates human CYP11B2 transcription*. *Endocr Res*, 1996. **22**(4): p. 485-92.
148. Okamoto, M., et al., *Molecular identity and gene expression of aldosterone synthase cytochrome P450*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(1): p. 325-30. Epub 2005 Aug 10.
149. Graier, W.F., S. Simecek, and M. Sturek, *Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signalling of Ca²⁺ entry in human and bovine endothelial cells*. *J Physiol (Lond)*, 1995. **482**(Pt 2): p. 259-74.
150. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-kappaB regulation in the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(10): p. 725-34.
151. Ke, S., et al., *Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 39638-44.
152. Tian, Y., et al., *Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(1): p. 510-5.
153. Abdulla, D., et al., *The signal transduction pathways involved in hepatic cytochrome P450 regulation in the rat during a lipopolysaccharide-induced model of central nervous system inflammation*. *Drug Metab Dispos*, 2005. **33**(10): p. 1521-31. Epub 2005 Jul 8.



2021年12月15日