



ELSEVIER

ARTICLE ORIGINAL

Effet de l'inhibition des transporteurs OAT1 et MRP2 sur la clairance de l'adéfovir

Tubular transporters OAT1 and MRP2 and clearance of adefovir

Aude Servais ^{a,*}, Philippe Lechat ^b, Noël Zahr ^b, Saik Urien ^b,
Guy Aymard ^b, Marie Chantal Jaudon ^c, Gilbert Deray ^a,
Corinne Isnard Bagnis ^a

^a Service de néphrologie, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France

^b Service de pharmacologie, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France

^c Service de biochimie, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Reçu le 17 janvier 2005 ; accepté le 6 juin 2005

MOTS CLÉS

Transporteurs
organiques
anioniques ;
Probenécide ;
Rats TR- ;
Clairance rénale ;
NONMEM

KEYWORDS

Organic anion
transporter;
Probenecid;
TR- rats;
Adefovir clearance;
NONMEM

Résumé L'adéfovir est sécrété dans les urines par le transporteur organique anionique tubulaire (OAT1) et par les protéines de résistance multiple aux produits (MRP2, 4 et 5). Nous avons étudié la clairance de l'adéfovir chez le rat normal après inhibition des transporteurs par le probénécide ainsi que chez le rat TR- déficient en MRP2. Après traitement par probénécide ou placebo, la pharmacocinétique de l'adéfovir (10 mg/kg) a été étudiée par une approche de type pharmacocinétique de population (NONMEM). La fraction de substance excrétée dans les urines est basse dans nos expériences. La clairance rénale de l'adéfovir est significativement plus basse ($p < 0,05$) chez les rats TR- traités par probénécide ($0,03 \pm 0,02$ l/heure) que chez les rats témoins normaux ($0,09 \pm 0,05$ l/heure), chez les rats normaux traités par probénécide ($0,10 \pm 0,07$ l/heure) et chez les rats TR- témoins ($0,13 \pm 0,07$ l/heure). In vivo chez le rat, la mutation de MRP2 seule n'affecte pas la clairance de l'adéfovir suggérant que MRP2 ne joue pas un rôle clé dans la sécrétion de l'adéfovir. Une inhibition pharmacologique supplémentaire des transporteurs diminue sa clairance rénale, ce qui peut refléter une inhibition de mécanismes de compensation mis en œuvre en l'absence de MRP2.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Abstract Adefovir is transported by the organic anion transporter (OAT1) and the multi-drug resistant protein (MRP2, 4 and 5). We studied adefovir clearance in rat after inhibition of transporters by probenecid and in TR- rats, in which MRP2 is lacking. After treatment by probenecid or placebo, pharmacokinetics of adefovir 10 mg/kg was studied via population modeling (NONMEM). The fraction of drug excreted in the urine was low. Renal clearance of adefovir was significantly lower ($P < 0.05$) in probenecid TR- rats (0.03 ± 0.02 l/hour) than in normal control (0.09 ± 0.05 l/hour), in normal probenecid

* Auteur correspondant. Service de néphrologie, hôpital Necker-Enfants-malades, 161, rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France.

Adresse e-mail : aude.servais@nck.ap-hop-paris.fr (A. Servais).

(0.10 ± 0.07 l/hour) and in TR- control rats (0.13 ± 0.07 l/hour). In vivo in rats MRP2 mutation alone did not affect adefovir clearance suggesting that MRP2 does not play a critical role in the secretion of adefovir. Additional pharmacological inhibition of transporters decreased renal clearance, which may reflect inhibition of compensating transport mechanisms activated when MRP2 is lacking.

© 2005 Elsevier SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Introduction

Les phosphonates de nucléosides acycliques constituent une nouvelle famille de produits antiviraux à laquelle appartient l'adéfovir [1]. Cette classe thérapeutique est largement prescrite dans le traitement de l'infection par le VIH et de la co-infection B-VIH en particulier chez les patients résistant à la lamivudine. Ces médicaments sont excrétés dans les urines par un mécanisme de sécrétion tubulaire active au niveau du tubule proximal par l'intermédiaire de transporteurs tubulaires rénaux parmi lesquels OAT1 sur la membrane basolatérale de la cellule tubulaire et MRP2 et MRP4 au niveau apical [2,3]. Ces transporteurs tubulaires sont impliqués dans la réponse individuelle à une thérapie donnée, dans les interactions compétitives entre médicaments et dans leur toxicité tubulaire.

L'intérêt du probénécide est réapparu en tant qu'agent néphroprotecteur en association au cidofovir, un autre analogue nucléosidique. En effet, en inhibant le transport tubulaire des anions organiques, le probénécide diminuerait l'accumulation dans les cellules tubulaires rénales du cidofovir et réduirait sa toxicité rénale [4].

L'objectif de notre étude a été d'étudier in vivo chez le rat le retentissement de l'inhibition des transporteurs OAT1 et MRP2 par le probénécide sur la clairance de l'adéfovir. Parallèlement, la cinétique de l'adéfovir a été étudiée chez le rat TR-, muté pour MRP2 [5].

Méthodes

Nous avons utilisé pour nos expériences 40 rats Wistar mâles adultes (poids moyen 329 ± 6 g), fournis par Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) et 32 rats TR- (poids moyen 333 ± 5 g) commercialisés par Harlan (Gannat, France). Après traitement pendant quatre jours par 100 mg/kg PO de probénécide ou par placebo, l'adéfovir (10 ou 30 mg/kg) a été administré par voie artérielle aux rats Wistar mâles normaux ou aux rats TR-. Des prélèvements sanguins séquentiels ont été réalisés pendant 48 heures (cinq à six par rat) et les urines ont été recueillies pendant la même période pour

dosages plasmatique et urinaire de l'adéfovir par HPLC, puis analyse de la pharmacocinétique par une approche de type population (NONMEM). L'adéfovir a été fourni par le laboratoire Gilead Sciences Inc. Le probénécide est disponible chez Sigma.

Résultats

Pour l'analyse pharmacocinétique, 299 échantillons plasmatiques de 72 rats étaient disponibles. L'étude, selon une approche de type population, a permis de déterminer un modèle de base bicompartimental (Fig. 1). Aucune influence de la dose injectée n'a été trouvée sur les paramètres pharmacocinétiques, indiquant que la pharmacocinétique est linéaire. Les résultats sont présentés dans le Tableau 1 et sur la Fig. 2.

La clairance totale de l'adéfovir chez les rats TR-témoins n'était pas différente de celle des rats témoins normaux. En revanche, la clairance totale chez les rats TR- traités par probénécide était significativement diminuée ($p < 0,001$) par rapport aux rats témoins normaux, aux rats normaux prétraités par probénécide et aux rats TR- témoins. La clairance de l'adéfovir était significativement plus élevée ($p < 0,001$) chez les rats normaux prétraités par probénécide par rapport aux rats normaux témoins.

La clairance rénale de l'adéfovir chez les rats TR-témoins n'était pas différente de celle des rats normaux témoins. Elle était significativement plus basse ($p < 0,05$) chez les rats TR- prétraités par

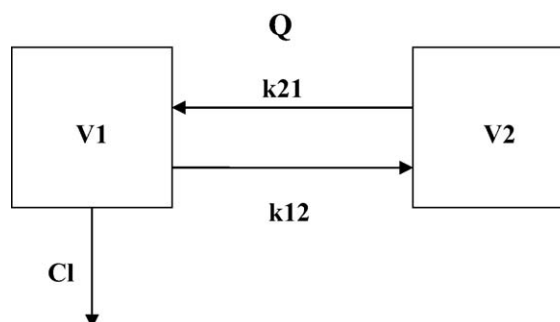


Figure 1 Modèle pharmacocinétique avec V1 et V2 : les volumes central et périphérique ; Cl : la clairance ; Q : la clairance diffusionnelle entre les volumes central et périphérique ; k21 et k12 : les constantes de diffusion de V2 à V1 et de V1 à V2.

Tableau 1 Paramètres pharmacocinétiques après injection d'adéfovir par voie artérielle chez des rats normaux ou TR-, prétraités par probénécide ou par placebo.

	Cl totale (l/heure)	FE u (%)	Cl « non rénale » (l/heure)	Cl rénale (l/heure)
<i>Rats normaux témoins</i> (n = 22)	0,38 ± 0,10	26 ± 13	0,29 ± 0,11	0,09 ± 0,05
<i>Rats normaux + probénécide</i> (n = 18)	0,58 ± 0,09*	18 ± 12	0,47 ± 0,10*	0,10 ± 0,07
<i>Rats TR- témoins</i> (n = 22)	0,38 ± 0,09	34 ± 18	0,25 ± 0,10	0,13 ± 0,07
<i>Rats TR- + probénécide</i> (n = 10)	0,19 ± 0,08*, **, ***	17 ± 10	0,16 ± 0,06*, **	0,03 ± 0,02*, ***

* $p < 0,001$ vs rat témoin normal ; ** $p < 0,001$ vs rat normal + probénécide ; *** $p < 0,001$ vs rat TR- témoin ; Cl : clairance ; FE u : fraction excrétée dans les urines. Moyenne ± SEM.

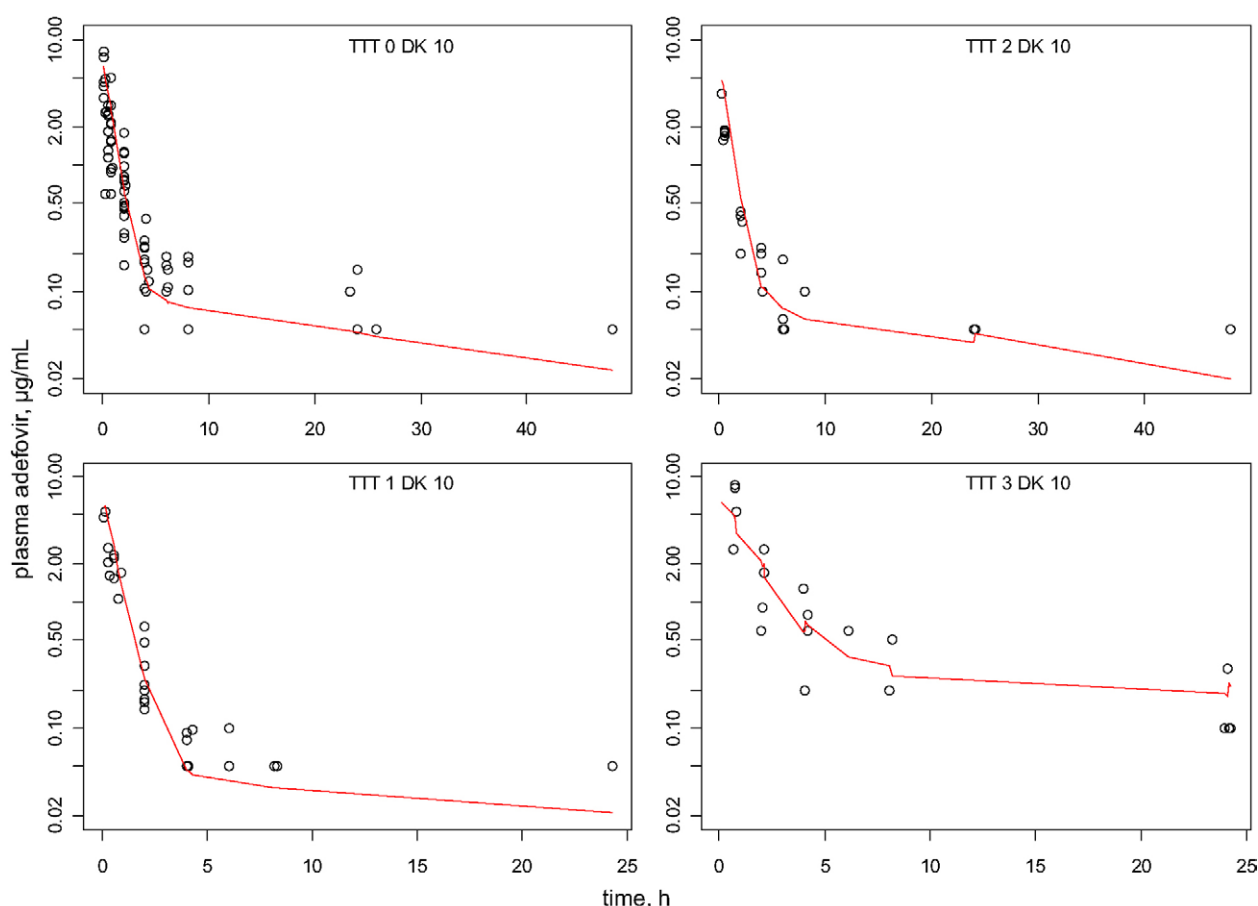


Figure 2 Concentration plasmatique d'adéfovir en µg/ml en fonction du temps (en heures, h) après injection intra-artérielle de 10 mg/kg chez les rats normaux témoins (TTT0), les rats normaux ayant reçu du probénécide (TTT1), les rats TR- témoins (TTT2) et les rats TR- ayant reçu du probénécide (TTT3). La ligne représente les concentrations prédites de la population.

probenécide que chez les rats témoins normaux, chez les rats normaux prétraités par probénécide et chez les rats TR- témoins. La fraction excrétée dans les urines était basse dans tous les groupes.

Par ailleurs, chez les rats TR- ayant reçu du probénécide, la clairance « non rénale » était significativement diminuée ($p < 0,001$) par rapport aux groupes témoins. En revanche, elle était significativement augmentée ($p < 0,01$) chez les rats nor-

maux ayant reçu du probénécide comparés aux rats normaux témoins et aux rats TR-.

Discussion

L'objectif de ce travail était de développer un modèle animal pour étudier in vivo les interactions entre l'adéfovir et les transporteurs anioniques.

Nous avons montré que la mutation isolée de MRP2 n'affecte pas la clairance de l'adéfovir. Après une inhibition pharmacologique supplémentaire des transporteurs, les clairances totale, rénale et non rénale sont diminuées. En revanche, le traitement par probénécide chez les rats normaux provoque une augmentation de la clairance non rénale.

In vivo chez l'homme, 98 % du produit est retrouvé inchangé dans les urines en 24 heures [6] avec une clairance rénale supérieure à celle de la créatinine, compatible avec une sécrétion tubulaire active. En revanche, dans notre travail chez le rat Wistar, la fraction excrétée dans les urines d'adéfovir est très faible et peu différente chez les rats mutés pour MRP2, les animaux normaux traités par probénécide et les animaux normaux témoins. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que l'expression des transporteurs, leur affinité et leur distribution entre le foie et le rein sont espèce-dépendantes [3].

Les doses administrées dans l'étude (10 à 30 mg/kg) sont supérieures aux doses thérapeutiques maximales utilisées chez l'homme : cependant, les données pharmacocinétiques montrent qu'il n'y a pas de phénomène de saturation des transporteurs.

Les études in vitro indiquent qu'un mécanisme de sécrétion tubulaire active est impliqué dans l'élimination de l'adéfovir, via OAT1, OAT3 et MRP2. Cependant, in vivo chez le rat, l'absence de MRP2 n'affecte pas la clairance rénale de l'adéfovir. MRP2 ne semble donc pas jouer de rôle important dans la sécrétion de l'adéfovir. Cependant, l'absence d'un transporteur dans un modèle animal de KO ne démontre pas la signification de ce transporteur dans des conditions physiologiques : MRP2 pourrait avoir une importance chez le rat normal et chez les rats mutés pour MRP2, un mécanisme de compensation par l'intermédiaire d'autres transporteurs, MRP4 en particulier, pourrait être impliqué [10,5]. Ces transporteurs supplémentaires pourraient alors être inhibés par le probénécide, ce qui expliquerait que la clairance rénale de l'adéfovir est diminuée chez les rats TR-prétraités par probénécide. On ne retrouverait pas cet effet chez les animaux normaux ayant reçu du probénécide dans la mesure où ils n'auraient pas développé de mécanisme de compensation similaire. On observe le même effet sur la clairance non rénale qui n'est pas différente entre les rats témoins normaux et TR-, mais qui est diminuée chez les rats TR- ayant reçu du probénécide. Cette clairance non rénale pourrait être une clairance métabolique dans les hépatocytes ou dans les lymphocytes. L'absence de transporteur pourrait affecter l'expression et peut-être aussi la distribution entre

les membranes apicale et basolatérale d'autres transporteurs, ce qui expliquerait la différence d'action du probénécide observée entre les rats normaux et les rats TR-.

La clairance non rénale du produit est très nettement augmentée chez les rats normaux ayant reçu du probénécide par rapport aux témoins. L'adéfovir est une prosubstance puisqu'au niveau cellulaire, il est phosphorylé en sa forme active, l'adéfovir diphosphate [7]. Ces métabolites phosphorylés intracellulaires ne sont pas mesurables et, de ce fait, aucune donnée n'est disponible sur leur exposition clinique. Chez l'homme, le métabolisme ne contribue pas significativement à la clairance totale du médicament [8]. En revanche, les données pharmacocinétiques chez le rat Wistar, dans nos expériences, sont en faveur d'une majoration de la concentration tissulaire (dans les lymphocytes ou les hépatocytes) et/ou du métabolisme de l'adéfovir. L'augmentation des concentrations intracellulaires du substrat pourrait induire l'activité d'enzymes du métabolisme. Cela n'est probablement pas dû à MRP2 puisque les rats déficients en MRP2 ont un comportement identique aux rats normaux. MRP4, MRP5 et OAT-k1 (qui est spécifique du rat) pourraient être impliqués dans la mesure où ils jouent un rôle dans l'extrusion de l'adéfovir hors de la cellule et qu'ils peuvent être inhibés par le probénécide.

L'existence d'une activation intracellulaire d'une petite fraction de l'adéfovir injecté par phosphorylation conduit à des effets antiviraux prolongés difficilement prédictibles par les études pharmacocinétiques conventionnelles [9] dans la mesure où, la concentration intracellulaire des métabolites phosphorylés n'est pas dosable. Le taux d'élimination du sérum ne reflète pas la vraie durée d'action du produit puisque l'effet antiviral dépend des concentrations intracellulaires des métabolites phosphorylés actifs. Selon l'interaction médicamenteuse en cause au niveau des transporteurs, on s'expose à un sous- ou un surdosage en médicament qu'il conviendrait de pouvoir prédire et prévenir en raison de ses conséquences potentielles en termes d'efficacité et de toxicité.

Conclusion

Notre étude met en évidence le rôle potentiel des interactions tubulaires induites par les médicaments sur les effets thérapeutiques des analogues nucléosidiques. Les patients étant exposés toute leur vie durant à des associations thérapeutiques, il est fondamental de tenter de documenter précisément les mécanismes tubulaires impliqués.

Références

- [1] Squires KE. An introduction to nucleoside and nucleotide analogues. *Antiviral Ther* 2001;6(suppl 3):1-14.
- [2] Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003;55:425-61.
- [3] Russel F, Masereeuw R, Van Aubel R. Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Ann Rev Physiol* 2002;64:563-94.
- [4] Lacy S, Hitchcock M, Lee W, Tellier P, Cundy K. Effect of oral probenecid coadministration on the chronic toxicity and pharmacokinetics of intravenous cidofovir in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 1998;44:97-106.
- [5] Masereeuw R, Notenboom S, Smeets PH, Wouterse AC, Russel FG. Impaired renal secretion of substrates for the multidrug resistance protein 2 in mutant transporter-deficient (TR-) rats. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2741-9.
- [6] Cundy KC, Barditch-Crovo P, Walker RE, Collier AC, Ebeling D, Toole J, et al. Clinical pharmacokinetics of adefovir in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2401-5.
- [7] Merta A, Votruba I, Jindrich J, Holy A, Cihlar T, Rosenberg I, et al. Phosphorylation of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine and 9-(S)-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)adenine by AMP(dAMP) kinase from L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 1992;44:2067-77.
- [8] Qaqish RB, Mattes KA, Ritchie DJ. Adefovir dipivoxil: a new antiviral agent for the treatment of hepatitis B virus infection. *Clin Ther* 2003;25:3084-99.
- [9] Cundy KC. Clinical pharmacokinetics of the antiviral nucleotide analogues cidofovir and adefovir. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:127-43.
- [10] Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Ren Physiol* 2000;279:F216-F232.

Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com

