



HAL
open science

Effets du carbonate de sevelamer sur certaines toxines urémiques issues du microbiote intestinal

Yan Cluet

► **To cite this version:**

Yan Cluet. Effets du carbonate de sevelamer sur certaines toxines urémiques issues du microbiote intestinal. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-03075533

HAL Id: dumas-03075533

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03075533v1>

Submitted on 16 Dec 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le : 19 Septembre 2019

Par : Yan CLUET

EFFET DU CARBONATE DE SEVELAMER SUR CERTAINES
TOXINES UREMIQUES ISSUES DU MICROBIOTE INTESTINAL

JURY

Président

M. Gilles DUVERLIE – Pharmacien biologiste – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Directeur de thèse

Mme. Sophie LIABEUF-ESTEBANEZ – Pharmacien – Maitre de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Membres

M. Youssef BENNIS – Pharmacien biologiste – Maitre de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

M. Bernard BABAUD – Médecin généraliste

Thèse n°

Remerciements

Merci au Pr Gilles Duverlie, Chef du Service de Virologie du CHU d'Amiens, EA4294 AGIR, de bien vouloir me faire l'honneur de présider ce travail.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Dr Sophie Liabeuf ainsi qu'au Dr Youssef Bennis qui me fait l'honneur de juger ce travail, pour leur accompagnement et leur bienveillance tout au long de cette aventure.

Merci au Dr Bernard Babaud d'avoir suivi mon travail de si près durant toutes ces années et d'être aujourd'hui présent en tant que membre du jury.

Merci aux Dr Catherine Gilet et Dr Laurence Houssin de m'avoir fait découvrir le monde de la pharmacie d'officine à travers mes stages d'initiations et d'application.

Merci au Pr Said Kamel pour son accueil au sein du Laboratoire EA7517, Mécanismes Physiopathologiques et Conséquences des Calcifications Cardiovasculaires de l'Université de Picardie Jules Verne Amiens.

Merci au Dr Agnès Boullier pour l'aide apportée et le temps accordé à ce travail.

Merci au Dr Sandra Bodeau pour son accompagnement au cours de la suite de ce travail ainsi que pour sa ténacité face aux fournisseurs.

Merci à l'ensemble de l'équipe du Centre de Recherche Clinique du Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie pour leur accueil au sein du service.

Merci aux techniciens et aux internes du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie pour leur accueil, leur aide et leurs conseils au cours de mes manipulations.

Merci à mes amis ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Merci à mon amie, Mlle Lisa Delplancq, pour le temps passé à écouter et relire ce travail.

Merci à mes parents qui ont toujours été de bon conseil et qui ont su me soutenir dans mes choix et tout au long de mon parcours.

Table des matières

Liste des abréviations et anglicismes	1
Liste des Figures	3
Liste des Tableaux	4
A- Introduction	5
1- La maladie rénale chronique	5
2- Les toxines urémiques	6
3- Le carbonate de sevelamer	11
B- Hypothèse et Objectifs	13
C- Matériels et Méthodes	14
1- Produits chimiques et réactifs.....	14
2- Effet du carbonate de sevelamer <i>in vitro</i>	15
a) Préparation des échantillons et des standards.....	15
b) Influence du pH sur l'effet du carbonate de sevelamer.....	15
c) Méthode de dosage – instrumentation	15
d) Dosage du phosphore inorganique	17
3- Effet du carbonate de sevelamer, étude clinique.....	17
a) Collection et préparation des échantillons.....	17
b) Méthode de dosage	18
4- Analyse statistique.....	19
D- Résultats	19
1- Effet du carbonate de sevelamer <i>in vitro</i>	19
2- Dosage des toxines urémiques dans la population FRENCH	26
E- Discussion.....	30
F- Conclusion et Perspectives	35
Bibliographie.....	35
Annexes.....	41

Liste des abréviations et anglicismes

ACN : Acétonitrile

AGE : Produits Avancés de la Glycation

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AU : Arbitrary Unit

CBH : Centre de Biologie Humaine

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CRP : Protéine C Réactive

CURS : Centre Universitaire de Recherche en Santé

CML : Cellule Musculaire Lisse

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

EER : Epuration Extra-Rénale

EI : Etalon interne

FGF23 : Fibroblast Growth Factor 23

FRENCH : FGF23 Reduction : Efficacy of a New phosphate binder in CHronic kidney disease

HCl : Acide Chlorhydrique

HDL : High Density Lipoprotein

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IAA : 3-Indole Acide Acétique

IMC : Indice de Masse Corporelle

IQ : Interquartile(s)

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

IS : Indoxyle Sulfate

KDIGO : Kidney Disease Improving Global Outcomes

KDOQI : Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

LC-MS : Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

LDL : Low Density Lipoprotein

LPP : Liaison aux Protéines Plasmatiques

MDRD : Modification of Diet in Renal Disease

MeOH : Méthanol

MRC : Maladie Rénale Chronique

MT : Mitochondriale

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NKF : National Kidney Foundation

PAD : Pression Artérielle Diastolique

PAS : Pression Artérielle Systolique

p-Crésol : para-Crésol **pCS** : para-

Crésyl Sulfate

PTH : Hormone Parathyroïdienne

QSP : Quantité Suffisante Pour

TPFA : Tampon Formiate d'Ammonium

TU : Toxine(s) Urémique(s)

USA : United States of America

UV : Ultra-Violet

Liste des Figures

FIGURE 1. SYNTHÈSE, MÉTABOLISME ET EFFETS DES TU D'INTERET SUR L'ORGANISME (ADAPTE DEPUIS RAMEZANI <i>ET AL.</i> AM J KIDNEY DIS. 2016)	10
FIGURE 2. LE CARBONATE DE SEVELAMER (49,50)	12
FIGURE 3. EFFETS PLEIOTROPES AVÈRES ET POTENTIELS DU SEVELAMER DANS LA MRC (ADAPTE DEPUIS MASSY ET MAIZEL, NEPHROL THER. 2014).....	13
FIGURE 4. CHROMATOGRAMME DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE PAR HPLC	17
FIGURE 5. EFFET DU FILTRE SUR LA RETENTION DES TU ET PRECURSEURS	21
FIGURE 6. EFFET DE LA SOLUTION DE SEVELAMER SUR LE PHOSPHORE INORGANIQUE	22
FIGURE 7. EFFET DU CARBONATE DE SEVELAMER SUR LES PRECURSEURS DES TU	23
FIGURE 8. EFFET DU CARBONATE DE SEVELAMER SUR LE PCS	24
FIGURE 9. EFFET DU CARBONATE DE SEVELAMER SUR L'IAA	25
FIGURE 10. EFFET DU CARBONATE DE SEVELAMER SUR L'IS	26
FIGURE 11. ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS SÉRIQUES EN PHOSPHATE ET TU APRES 12 SEMAINES DE TRAITEMENT	29
FIGURE 12. MÉCANISME DE CHELATION DU CARBONATE DE SEVELAMER DE L'IS, DU PCS ET DE L'IAA	32

Liste des Tableaux

TABLEAU 1. LES STADES DE LA MALADIE RENALE CHRONIQUE SELON LES CRITERES KDOQI (1)	5
TABLEAU 2. CONCENTRATIONS SERIQUES DES TU D'INTERET EN FONCTION DU STADE DE MRC (17)	8
TABLEAU 3. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES TU ET DE LEURS PRECURSEURS (60)	16
TABLEAU 4. PH DES ECHANTILLONS	20
TABLEAU 5. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION FRENCH A L'INCLUSION	27
TABLEAU 6. EVOLUTION DANS LE TEMPS DU PHOSPHATE ET DES TU PENDANT LA PERIODE D'ETUDE	28

A- Introduction

1- La maladie rénale chronique

La maladie rénale chronique (MRC), ou insuffisance rénale chronique (IRC), est la conséquence d'une réduction permanente et progressive des fonctions rénales (excrétrices, endocrines et métaboliques) due à une destruction progressive et irréversible du nombre de néphrons qui constituent l'unité fonctionnelle du rein. Le débit de filtration glomérulaire (DFG) permet d'en faire le diagnostic et d'en estimer la sévérité. Ainsi, la National Kidney Foundation (NKF) et la fondation Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO), dans un travail commun, ont élaboré un guide de recommandations pour le diagnostic, l'évaluation et la classification des différents stades de la MRC nommé Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI). La MRC se définit alors par la manifestation depuis plus de trois mois de marqueurs d'atteintes rénales ou d'un DFG inférieur à 60mL/min/1.73m² (Tableau 1) (1).

Tableau 1. Les stades de la maladie rénale chronique selon les critères KDOQI (1)

Stade (KDOQI)	Définition	DFG ⁽¹⁾ (mL/min/1.73m ²)
Stade 1	Maladie rénale ⁽²⁾	> 90
Stade 2	IRC légère	Entre 60 et 89
Stade 3a	IRC légère à modérée	Entre 45 et 59
Stade 3b	IRC modérée à sévère	Entre 30 et 44
Stade 4	IRC sévère	Entre 15 et 29
Stade 5	IRC terminale	< 15

(1) DFG selon la formule Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) (2) persistance > 3 mois de marqueurs d'atteinte rénale : protéinurie, microalbuminurie, hématurie, leucocyturie, anomalies morphologiques à l'échographie. KDOQI, Kidney Disease Outcomes Quality Initiative ; DFG, Débit de Filtration Glomérulaire ; IRC, Insuffisance Rénale Chronique.

Son mécanisme physiopathologique en fait une maladie silencieuse pendant de nombreuses années, avec des signes cliniques qui apparaissent tardivement, c'est-à-dire à un stade avancé, ayant pour conséquence un diagnostic tardif. Il est donc difficile d'estimer la population atteinte par cette pathologie, cependant le Réseau d'Epidémiologie et d'Information en Néphrologie rapporte qu'en 2015, en France, 8 à 15% de la population en souffrirait et 5 à 10% de la population française souffrirait d'une maladie rénale pouvant conduire à une insuffisance rénale (2,3). La prévalence de cette maladie augmente avec l'âge et le nombre de patients concernés augmente de 2% chaque année (2,3). Les causes en sont le vieillissement de la population, le diabète et l'hypertension – dont une estimation les incrimine dans 50% des cas d'insuffisance rénale sévère – ainsi que l'amélioration de la survie des patients transplantés et

dialysés (3). En 2015, en France, c'est environ 82 300 patients qui sont traités pour insuffisance rénale chronique terminale soit par dialyse (56%), soit par greffe (44%) (2).

Comme énoncé précédemment, le rein permet l'élimination des déchets, le maintien de l'homéostasie et assure une fonction endocrine. La perte de ces fonctions va entraîner de nombreuses complications. Parmi celles-ci, les complications cardiovasculaires sont les plus fréquentes. En effet, la MRC représente un facteur de risque cardiovasculaire majeur capable de multiplier la morbi-mortalité cardiovasculaire par un facteur variant de 4.9 à 19 selon les publications (4). Ainsi, la MRC est un enjeu majeur de santé publique, avec un taux de mortalité de 10.6% (7730 décès en 2015), la compréhension de ses mécanismes physiopathologiques et de ses conséquences sont importants dans la prise en charge de la maladie afin d'en contenir les complications (2). Pour expliquer ce risque augmenté dans la MRC, les facteurs de risque dits traditionnels (tel que l'hypertension, le tabac, la dyslipidémie...) ne suffisent pas. Un certain nombre de facteurs de risque dits « non traditionnels » ont été identifiés, c'est le cas des toxines urémiques (TU).

2- Les toxines urémiques

La MRC va donc entraîner de nombreux désordres cliniques et biologiques. Ils sont regroupés sous le terme de syndrome urémique, syndrome toxique caractérisé par la rétention de métabolites toxiques associée à des changements de la composition des fluides corporels et un excès ou une carence en diverses hormones (5). Parmi ces désordres, on retrouve l'accumulation de bon nombre de molécules, métabolites toxiques, appelés toxines urémiques ou solutés urémiques (6).

Ces toxines répondent à une définition stricte basée sur le postulat de Koch. Ainsi les prérequis à l'identification d'une TU sont (6) :

- La toxine doit être identifiée et caractérisée chimiquement ;
- Une analyse quantitative est possible dans les fluides biologiques ;
- La concentration de cette toxine est élevée dans ces fluides chez des animaux ou sujets urémiques ;
- Il existe une relation entre la concentration de la toxine dans les fluides biologiques et une manifestation ou plus du syndrome urémique ;

- Une diminution de la concentration de la toxine dans les fluides biologiques entraîne une amélioration des manifestations du syndrome urémique ;
- L'administration de la toxine à des concentrations similaires à celles observées dans le syndrome urémique entraîne des manifestations urémiques chez des sujets sains (animaux ou êtres humains).

Cette définition a permis l'identification de 156 TU que l'on peut différencier en fonction de leur taille et de leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques (7). On retrouve alors les petites molécules hydrosolubles de taille inférieure à 500 Da, les molécules de taille moyenne, supérieure à 500 Da et les molécules liées aux protéines plasmatiques. Un autre système de classification est proposé en fonction de leur lieu de synthèse (intestinal ou non) afin d'appréhender les différentes approches thérapeutiques pour en faire diminuer les concentrations élevées dans la MRC (8).

Les TU faisant partie des petites molécules hydrosolubles, TU de bas poids moléculaire, sont pour la plupart d'origine alimentaire et sont des molécules qui sont facilement éliminées par les différentes méthodes d'épuration extra-rénale (EER) de par leur faible capacité à se lier aux protéines plasmatiques (9). On peut citer l'urée, dont la clairance et le volume de distribution sont d'ailleurs utilisés pour évaluer l'efficacité des techniques d'EER. En effet, la toxicité de cette molécule a été montrée *in vitro*, elle est capable d'induire l'apoptose des cellules musculaires lisses (CML), d'induire du stress oxydatif et une dysfonction des adipocytes, mais également *in vivo* par la promotion de l'inflammation, la destruction de la barrière épithéliale intestinale et l'augmentation de la morbidité cardiovasculaire (10).

Les TU appartenant aux molécules de taille moyenne sont principalement d'origine endogène. Contrairement aux TU de bas poids moléculaires et à celles liées aux protéines plasmatiques leur concentration élevée dans la MRC ne dépend pas uniquement de leur rétention mais aussi de leur sécrétion endocrine et paracrine dans le but de corriger les désordres entraînés par l'état urémique (5,9). Ces molécules peuvent être éliminées par certaines méthodes d'EER avec membrane à haut flux, cependant, elles ne permettent pas une correction totale de leur concentration (11,12). Le prototype de cette classe de TU est la β 2microglobuline qui est à l'origine de l'amylose des patients en IRC terminale et dont une concentration sanguine élevée est associée à un risque de mortalité plus important chez des patients urémiques (13,14).

Les TU liées aux protéines plasmatiques forment quant à elle une famille plus petite que les précédentes, ne comptant qu'une vingtaine de molécules identifiées (9). D'origine alimentaire pour la plupart, elles représentent un obstacle aux techniques d'EER actuelles, car leur liaison aux protéines plasmatiques en fait des molécules difficilement éliminables (6,15). C'est parmi cette famille de TU que l'on va retrouver trois des douze TU classées comme ayant le plus d'effets délétères selon un score établi en fonction des preuves expérimentales de leur toxicité et de preuves cliniques recensées dans la littérature de 1967 à 2017 : l'indoxyle sulfate (IS), le 3-indole acide acétique (IAA) et le p-crésyl sulfate (pCS) (9). De plus, l'IAA, l'IS et le pCS sont fortement liés aux protéines plasmatiques, respectivement 82%, 89% et 91%, ce qui en fait des molécules extrêmement difficiles à éliminer par les techniques d'EER (9,16). Les concentrations en TU dans les liquides biologiques sont par définition augmentées chez des sujets urémiques, c'est en effet le cas des toxines citées précédemment au niveau sanguin (Tableau 2) (17).

Tableau 2. Concentrations sériques des TU d'intérêt en fonction du stade de MRC (17)

Toxines	Stade MRC (KDOQI)			
	2	3	4	5
pCS (µg/mL)				
Libre	0.28 ± 0.32	0.3 ± 0.3	0.8 ± 0.8	0.19 ± 0.12
Total	5.9 ± 3.3	10.3 ± 6.7	16.8 ± 13.4	29.1 ± 16.7
IS (µg/mL)				
Libre	0.32 ± 0.05	0.3 ± 0.04	4.6 ± 2.8	9.2 ± 6.5
Total	1.5 ± 0.6	2.6 ± 1.4	4.6 ± 2.8	9.2 ± 6.5
IAA (µg/mL)				
Libre	0.23 ± 0.02	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.07	0.3 ± 0.09
Total	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.4	1.4 ± 8.9
Les données sont exprimées en moyennes ± l'écart type. MRC, Maladie Rénale Chronique ; KDOQI, Kidney Disease Outcomes Quality Initiative ; pCS, p-Crésyl Sulfate ; IS, Indoxyle Sulfate ; IAA, Indole Acide Acétique.				

Le pCS est issu du métabolisme hépatique du p-crésol, lui-même synthétisé par le microbiote intestinal à partir de la tyrosine (18) (Figure 1). *In vitro* le pCS stimule la libération de marqueurs de dommages endothéliaux sur des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines et est capable d'induire du stress oxydatif sur ces mêmes cellules ainsi que sur des CML vasculaires humaines et sur des cellules épithéliales tubulaires rénales humaines (19–21). *In vivo*, chez la souris ayant subi l'ablation d'un rein, l'injection de pCS induit une fibrose rénale (22). Sa concentration sanguine élevée est associée, dans les études cliniques, à une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire (15,23–25).

L'IS est quant à lui issu du métabolisme hépatique de l'indole, produit de la fermentation du tryptophane par les bactéries intestinales (18) (Figure 1). L'IS, comme le pCS, est capable d'induire du stress oxydatif sur les CML et cellule épithéliales tubulaires rénales humaines, entraînant la progression de la MRC (26). Chez le rat hypertendu, l'administration d'IS est capable d'aggraver la fibrose cardiaque par la production de stress oxydatif (27). Il est également inducteur d'inflammation et de calcifications vasculaires (28).

Ainsi, l'IS est lui aussi associé à la morbi-mortalité cardiovasculaire (15,24,29,30).

L'IAA, également issu de l'indole ne subit pas de métabolisme hépatique. En effet, sa synthèse se fait directement au niveau intestinal depuis le microbiote (18) (Figure 1). Tout comme ses homologues, il est associé à la progression des maladies cardiovasculaires par l'induction de mécanismes pro-inflammatoires (31,32). Chez le rat en IRC, des concentrations sériques élevées en IS ont également accéléré la progression de la MRC, notamment par l'induction de stress oxydatif (33,34).

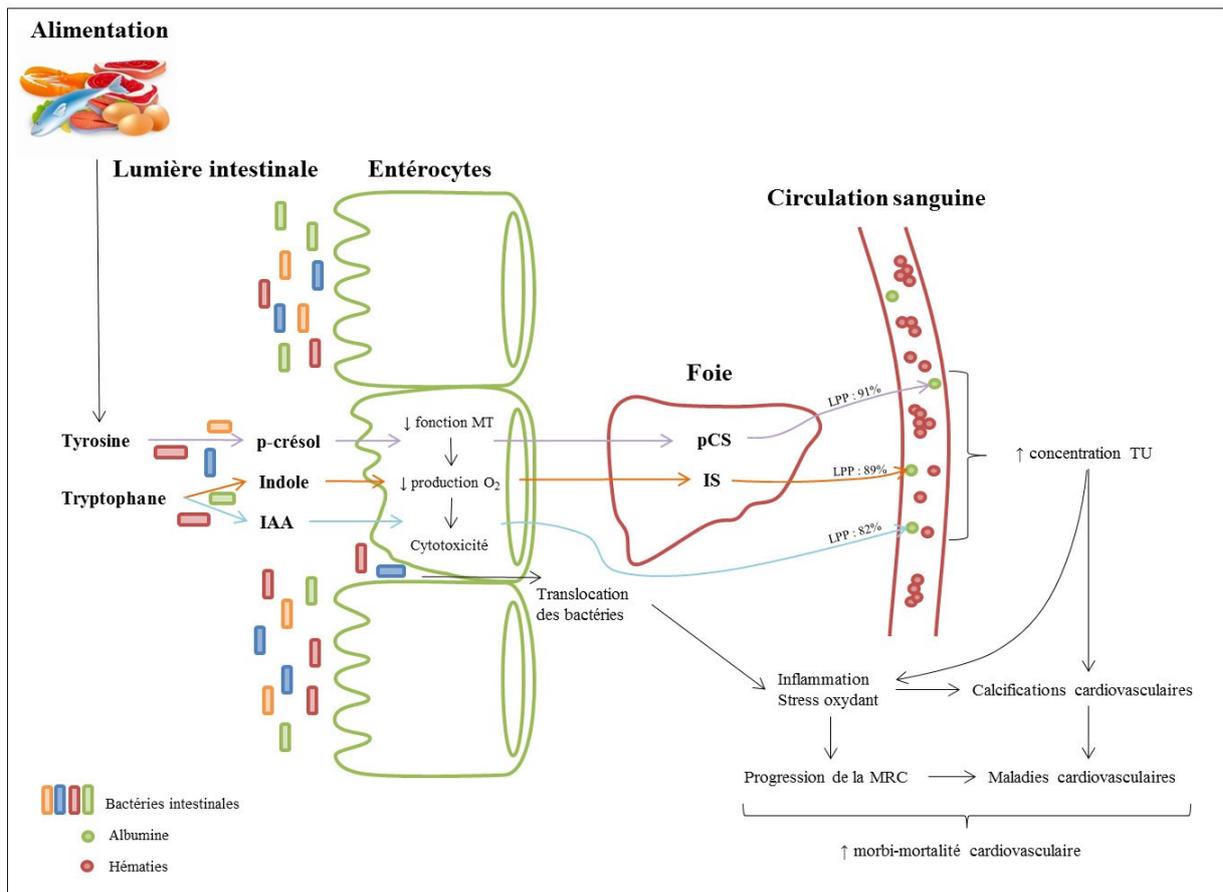


Figure 1. Synthèse, métabolisme et effets des TU d'intérêt sur l'organisme (adapté depuis Ramezani *et al.* Am J Kidney Dis. 2016)

Synthèse du pCS, de l'IS et de l'IAA depuis les acides aminés contenus dans l'alimentation après fermentation par les bactéries intestinales, absorption et métabolisme hépatique (pCS et IS), avant de se retrouver dans la circulation sanguine liées aux protéines plasmatiques. IAA, Indole Acide Acétique ; pCS, p-Crésyl Sulfate ; IS, Indoxyle Sulfate ; LPP, Liaison aux Protéines Plasmatiques ; MT, mitochondriale.

Ces toxines représentent donc une cible thérapeutique d'intérêt de par l'impact négatif qu'elles ont sur la MRC mais également grâce à leur lieu et mécanisme de synthèse. Ainsi, de nombreuses hypothèses sont émises pour moduler leurs concentrations : agir sur la liaison aux protéines plasmatiques afin d'améliorer la clairance des TU par les techniques d'EER ; agir sur leur métabolisme et leurs transporteurs (hépatiques ou rénaux) afin d'en diminuer la production ou d'en augmenter l'excrétion ; modifier les conditions de dialyse (augmenter la taille des membranes, augmenter le flux de sang/dialysat, augmenter la durée et fréquence) (35–37).

L'utilisation de pré et probiotiques permettrait également de moduler la synthèse de ces TU par le microbiote intestinal (35). Chez la souris souffrant de MRC, l'administration

d'arabinoxylane, un prébiotique (oligosaccharide) utilisé dans le but de prévenir la synthèse intestinale de p-crésol en favorisant la croissance des bifidobactéries au détriment des bactéries fermentatives entraîne une diminution de la concentration sérique en pCS après 4 semaines d'administration par rapport à des souris MRC témoins (38). Les études cliniques chez des patients hémodialysés ou atteint d'IRC non dialysés (stades 3 et 4) sont nombreuses et répertorient des résultats divergeant. Ces résultats divergent tant au niveau de l'efficacité de l'administration de prébiotiques sur les concentrations sériques des TU que sur l'efficacité de ces prébiotiques sur chaque TU (39–41).

Enfin, l'utilisation d'adsorbants, chélateurs intestinaux, tels que l'AST-120 ou le sevelamer permettrait de diminuer l'absorption de ces TU au niveau intestinal. L'AST-120 ou Kremezin® est un médicament utilisé dans les pays asiatiques (Japon, Corée, Taïwan et Philippines) pour le traitement des symptômes urémiques et la prolongation du délai de dialyse chez les patients atteints de néphropathies chroniques (42,43). Il permet l'adsorption des TU et de leurs précurseurs dans le tractus gastro-intestinal et entraîne ainsi leur excrétion dans les fèces, permettant la diminution de leur concentration sanguine et la prévention des effets néfastes associés à ces TU (43–45). Il faut cependant relever que l'impact clinique de cette molécule requiert de plus amples évaluations. En effet, malgré de nombreuses études cliniques prospectives randomisées, certaines ne permettent pas d'observer une diminution significative de la progression de la MRC, l'observance et les concentrations sériques en TU n'avaient cependant pas été mesurées (46–48).

3- Le carbonate de sevelamer

Le carbonate de sevelamer est un médicament utilisé depuis 2009, dans le cadre de son autorisation de mise sur le marché (AMM), dans l'hyperphosphatémie chez l'adulte hémodialysé ou atteint d'IRC non dialysé, dont les taux de phosphates sériques sont supérieurs à 1.78mmol/L (49). C'est un chélateur intestinal de phosphates, non absorbé par l'organisme. Polymère poly-allylaminé, sa structure chimique que l'on peut apprécier en Figure 2.a, va permettre la chélation des phosphates intestinaux chargés négativement grâce à ses groupements amines par échanges d'ions et par la formation de ponts hydrogènes (Figure 2.b) (50).

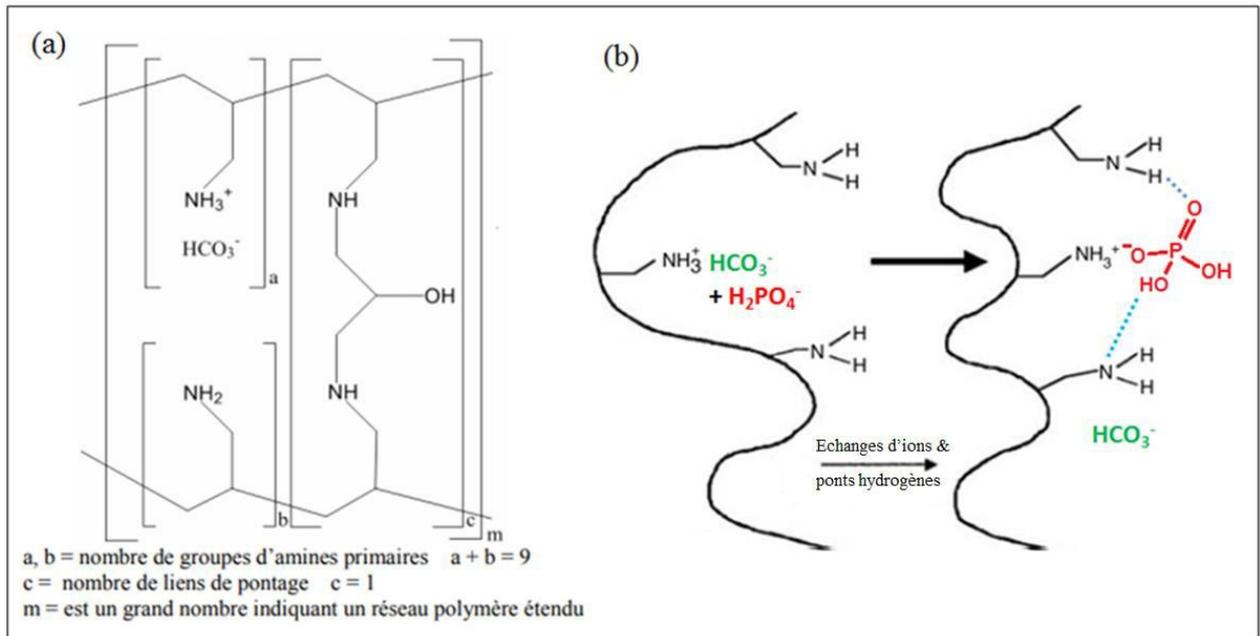


Figure 2. Le carbonate de sevelamer (49,50)

(a) Structure chimique et (b) Mécanisme d'action du carbonate de sevelamer adapté de Extract from the Clinical Evaluation Report for Sevelamer carbonate, 2014.

Les études cliniques ont montré l'efficacité ainsi que la non-infériorité d'un traitement par carbonate de sevelamer par rapport à un traitement par hydrochloride de sevelamer commercialisé dans le cadre de son AMM depuis 2001, dans le contrôle de l'hyperphosphatémie chez l'adulte hémodialysé (51,52). Son efficacité a également été montrée dans la réduction des taux de phosphates sériques chez l'adulte en hyperphosphatémie, non dialysé, contrairement à la forme hydrochloride (53,54).

En association ou non aux méthodes d'EER, la place du carbonate de sevelamer dans la prise en charge de la MRC est majeure dans le contrôle de l'hyperphosphatémie (55). En effet, les niveaux élevés de phosphates sériques que l'on rencontre dans la MRC à un stade avancé sont associés à la progression de la maladie et à l'apparition de comorbidités cardiovasculaires et osseuses telles que les calcifications vasculaires et l'ostéodystrophie rénale (56).

Enfin, le sevelamer ne semble pas agir uniquement sur les taux de phosphates sériques, on retrouve dans la littérature sa capacité à avoir de nombreux effets sur l'organisme, il est qualifié d'agent pléiotrope (15,57) (Figure 3). Le sevelamer permet par exemple la chélation des acides biliaires entraînant ainsi la diminution des taux de LDL cholestérol (15,57,58). Certaines études font référence à sa capacité à complexer l'acide urique, TU de bas poids moléculaire, cependant les résultats restent controversés à ce sujet (15,57,58). Parmi ses

nombreux effets, on retrouve une association avec la diminution de la progression des calcifications coronaires et aortiques des sujets dialysés via l'augmentation des concentrations en fétuine A, inhibiteurs des calcifications vasculaires (15,57,58). On note également des effets bénéfiques sur l'inflammation par la diminution des marqueurs de l'inflammation comme la protéine C réactive (CRP) ou les produits avancés de la glycation (AGE) ; sur la fonction endothéliale via la diminution de la production de stress oxydatif ; et sur le remodelage osseux via le contrôle des taux de phosphates, d'hormone parathyroïdienne (PTH), du fibroblast growth factor 23 (FGF23) et de Klotho (15,57,58). Pour terminer, une étude pilote suggère que le sevelamer serait également capable de diminuer les concentrations sériques de certaines TU issues du microbiote intestinal tel que le pCS (59). Cependant, cette étude comportait un faible nombre de sujets, était non interventionnelle et non comparative.

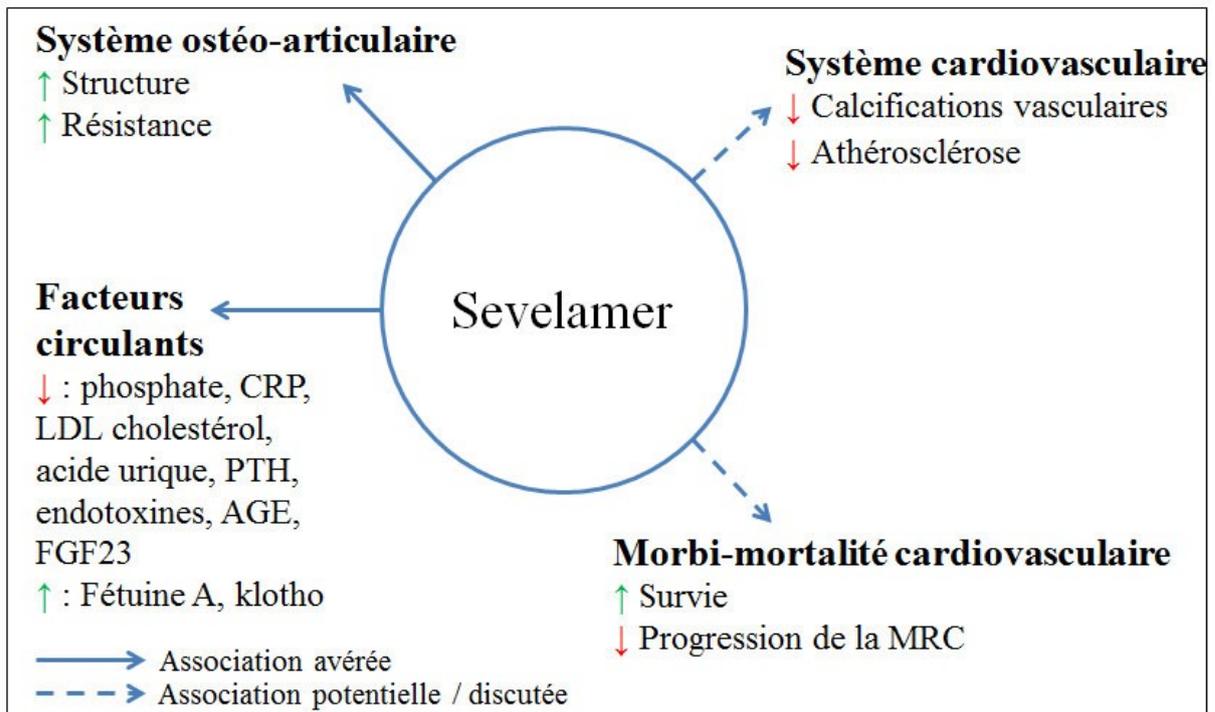


Figure 3. Effets pléiotropes avérés et potentiels du sevelamer dans la MRC (adapté depuis Massy et Maizel, Nephrol Ther. 2014)

CRP, Protéine C Réactive ; LDL, Low Density Lipoprotein ; PTH, Hormone Parathyroïdienne ; AGE, Produits Avancés de la Glycation ; FGF23, Fibroblast Growth Factor 23 ; MRC, Maladie Rénale Chronique.

B- Hypothèse et Objectifs

Compte tenu des informations citées précédemment, l'hypothèse menant à la réalisation de ce travail est que le carbonate de sevelamer serait capable de complexer certaines toxines

urémiques et leurs précurseurs et ainsi d'en diminuer les concentrations sériques chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique.

Les objectifs de ce travail sont donc : d'évaluer l'effet *in vitro* du carbonate de sevelamer sur trois toxines urémiques issues du microbiote intestinal (IS, IAA, pCS), ainsi que sur leurs précurseurs (indole et p-crésol) et d'évaluer l'impact d'un traitement par carbonate de sevelamer sur les concentrations sériques de ces mêmes TU (IAA, IS, pCS) chez des patients en insuffisance rénale chronique de stade 3b et 4 (définis selon les critères KDOQI).

C- Matériels et Méthodes

1- Produits chimiques et réactifs

L'IAA et l'IS ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), le pCS auprès de TCI Europe (Paris, France). Les précurseurs des TU, l'indole et le p-crésol ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich. L'étalon interne (EI) utilisé pour le dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) est l'étofylline (7-(β -hydroxyethyl)theophylline) obtenu auprès de Sigma Aldrich.

L'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH) $\geq 99.8\%$ ont été achetés à VWR Chemicals (Fontenay-sous-bois, France), le tampon phosphate salin de Dulbecco (DPBS) modifié, sans chlorure de calcium ni chlorure de magnésium, à Sigma Aldrich. Le tampon formiate d'ammonium (TPFA), pH 3, 0.1M, est reconstitué au Centre de Biologie Humaine (CBH) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Amiens-Picardie à partir de formiate d'ammonium de chez Fisher Scientific (Illkirsh, France), d'acide formique de chez VWR Chemicals et d'eau osmosée obtenue au CBH. Les solutions d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1N et d'acide chlorhydrique (HCl) 1N et 2N sont respectivement reconstituées à partir de NaOH 2N Titripur® de chez Sigma Aldrich et d'HCl 25% de chez VWR Chemicals dans de l'eau milli-Q. L'eau ultra pure, milli-Q, est obtenue au CBH à partir d'un système de purification depuis l'eau de ville.

Le carbonate de sevelamer utilisé est obtenu à partir d'un sachet de poudre pour solution buvable dont le nom de commercialisation est Renvela®, commercialisé par le laboratoire Sanofi-Aventis (Gentilly, France).

2- Effet du carbonate de sevelamer *in vitro*

a) Préparation des échantillons et des standards

Les solutions mères d'IAA, IS, pCS, indole et p-crésol sont préparées dans du MeOH (IAA, IS, p-crésol) ou de l'eau milli-Q (indole, pCS) à une concentration de 1mg/L. Une solution fille contenant les 5 toxines et précurseurs à 100µg/mL dans du DPBS est obtenue à partir des solutions mères. Le carbonate de sevelamer est dilué dans du DPBS pour obtenir une solution à 30mg/mL.

Au total, 4 échantillons et 2 contrôles sont préparés à partir de la solution fille et de la solution de carbonate de sevelamer dans du DPBS (n=3 pour IS et pCS ; n=4 pour IAA, p-crésol et indole) ; 2 échantillons à 1µg/mL en toxines et précurseurs, à 3 et 15mg/mL en carbonate de sevelamer ; 2 échantillons à 100µg/mL en toxines et précurseurs, à 3 et 15mg/mL en carbonate de sevelamer ; 2 contrôles à 1 et 100µg/mL en toxines et précurseurs.

La gamme étalon est composée de 6 standards à 0, 0.5, 2, 5, 15 et 25µg/mL en toxines et précurseurs dans du DPBS, préparée à partir de la solution fille.

Les échantillons, contrôles et standards sont incubés 2h à 37°C en agitation rotative lente (9RPM). Après incubation, 500µL des échantillons et contrôles sont transférés dans des tubes-filtres (Amicon) de 0.5mL et de poids moléculaire nominal limite 30kDa pour centrifugation (10000G pendant 10min). 150µL des filtrats sont ensuite récupérés pour analyse.

b) Influence du pH sur l'effet du carbonate de sevelamer

Afin de tester l'influence du pH sur l'effet du carbonate de sevelamer, des échantillons, contrôles et standards sont préparés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment à des pH finaux de 6 ± 0.5 (n=3 pour pCS, IAA et indole ; n=4 pour IS et p-crésol) et 8 ± 0.5 (n=3).

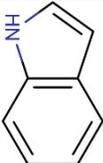
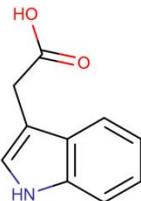
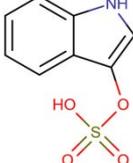
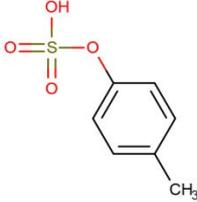
L'ajustement de pH des échantillons, contrôles et standards se fait par l'ajout de petits volumes de solution d'HCl 1 ou 2N et de NaOH 1N déterminés au préalable avec contrôle au pH-mètre.

c) Méthode de dosage – instrumentation

Le dosage des TU et précurseurs se fait au sein du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU Amiens-Picardie, par chromatographie liquide haute performance (HPLC

– Separation Module 2695, Waters, Milford Massachusetts, USA) avec une détection dans l’ultra-violet (UV – photodiode array detector 2996, Waters, Milford Massachusetts, USA) à 270nm, adaptée aux longueurs d’onde d’absorption maximale des molécules étudiées (Tableau 3). L’élution se fait en phase inverse compte tenu des propriétés de nos molécules (Tableau 3), avec une colonne apolaire dC18 Atlantis de 3µm de granulométrie, 3.9mm de diamètre intérieur et 100mm de longueur (Waters, Milford Massachusetts, USA) et une précolonne dC18 Atlantis (granulométrie : 3µm ; diamètre intérieur : 3.9mm ; longueur : 5mm ; Waters, Milford Massachusetts, USA).

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques des TU et de leurs précurseurs (60)

	Indole	IAA	IS	p-Crésol	pCS
Formule chimique	C ₈ H ₇ N	C ₁₀ H ₉ NO ₂	C ₈ H ₇ NO ₄ S	C ₇ H ₈ O	C ₇ H ₈ O ₄ S
Structure chimique					
Poids moléculaire (Da)	117.15	175.19	213.21	108.14	188.19
logP	2.1	1.4	1.3	1.9	1.3
pKa	-2.4	4.7	-1.8	10.3	-2
Longueurs d’onde d’absorption maximum (nm)	270	279	278	278	265
IAA, Indole Acide Acétique ; IS, Indoxyle Sulfate ; pCS, p-Crésyl Sulfate.					

La phase mobile polaire est en gradient d’élution à 0.8mL/min, constituée d’ACN (solvant A) et de TPFA (solvant B) selon les modalités suivantes : 10% (en volume) de A de 0 à 1min ; augmentation progressive à 20% de A de 1 à 4min ; augmentation progressive à 30% de A de 4 à 8min ; augmentation progressive à 60% de A de 8 à 10min ; augmentation progressive à 70% de A de 10 à 11min ; 70% de A de 11 à 12min ; diminution progressive à 50% de A de 12 à 13min ; diminution progressive à 10% de A de 13 à 14min ; 10% de A de 14 à 15min. Avant le dosage, la colonne est conditionnée par de l’eau osmosée pendant 2min puis

équilibrée à 10% de A et 90% de B pendant 20min. Après le dosage, la colonne est rincée par un mélange d'eau osmosée/ACN (V50/50) pendant 31min. Le volume d'injection est de 30 μ L. Le logiciel d'acquisition des données est Empower Pro 2002 (Waters Corporation).

Les courbes de calibration des toxines et précurseurs étaient linéaires de 0.5 μ g/mL à 50 μ g/mL avec un coefficient de régression (r^2) d'au moins 0.996. Les coefficients de variation et les biais de répétabilité et de fidélité intermédiaire étaient inférieurs à 15%. La Figure 4 montre un chromatogramme représentatif de cette méthode.

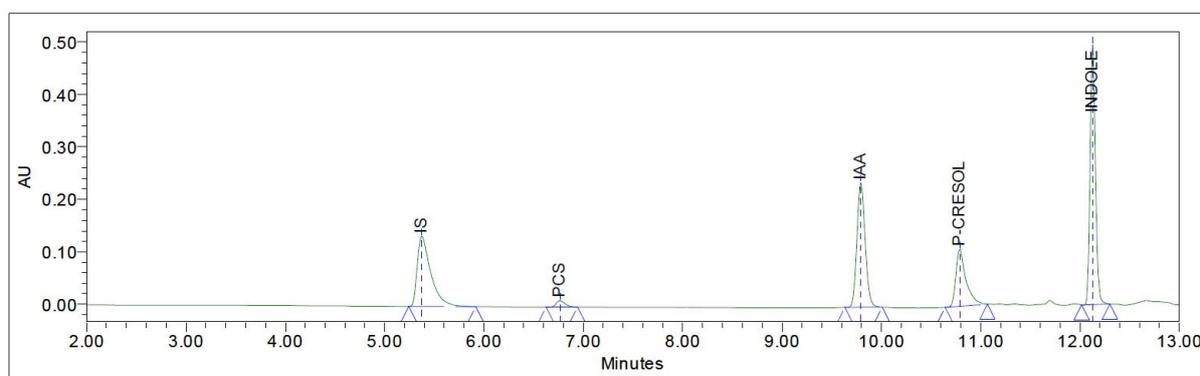


Figure 4. Chromatogramme de la technique de dosage par HPLC

Elution des TU et précurseurs à 25 μ g/mL selon la méthode de dosage utilisée. AU, Arbitrary Unit ; IS, Indoxyle Sulfate ; PCS, p-Crésyl Sulfate ; IAA, Indole Acide Acétique.

d) Dosage du phosphore inorganique

Le dosage du phosphore inorganique est réalisé au Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS) au sein du Laboratoire Mécanismes Physiopathologiques et Conséquences des Calcifications Cardiovasculaires (MP3CV, EA-7517), sur RX Daytona+ (Randox Laboratories, Crumlin, Irlande) selon les recommandations et la méthode de dosage UV décrites par le fournisseur. Le logiciel d'acquisition des données est RX séries (Randox Laboratories).

Le dosage est réalisé sur les échantillons et contrôles à pH non contrôlé (n=2), à pH 6 (n=5) et à pH 8 (n=5).

3- Effet du carbonate de sevelamer, étude clinique

a) Collection et préparation des échantillons

Etude FRENCH

Les échantillons utilisés pour le dosage de l'effet clinique du carbonate de sevelamer sont issus de la population de l'étude clinique FRENCH (FGF23 Reduction : Efficacy of a

New phosphate binder in CHronic kidney disease). FRENCH est une étude interventionnelle, multicentrique, randomisée en double aveugle, *versus* placebo dont l'un des objectifs secondaires est l'évaluation de l'impact d'un traitement par carbonate de sevelamer sur les concentrations sériques de différentes TU chez des patients en insuffisance rénale chronique non dialysés (61). La population FRENCH est composée de 78 sujets adultes en IRC de stade 3b et 4 (définis selon les critères KDOQI), normophosphatémiques (compris entre 1mmol/L et 1.78mmol/L). Les sujets ont été randomisés dans deux groupes, placebo ou sevelamer et ont reçu 4.8g de carbonate de sevelamer (ou placebo) trois fois par jour pendant 12 semaines. La collection des échantillons sanguins pour le dosage des TU a été faite à la visite 1, jour de la randomisation et à la visite 5, après les 12 semaines de traitement. Les échantillons ont été prélevés sur tubes secs, centrifugés pour récupération du sérum, aliquotés et conservés au congélateur -80°C.

Extraction des toxines urémiques et préparation des échantillons

L'extraction des TU se fait selon la méthode validée et mise au point précédemment au CHU Amiens-Picardie (62). Un volume de MeOH – contenant l'EI (étofylline) – deux fois supérieur à celui de l'échantillon est ajouté afin de précipiter les protéines et rendre le surnageant limpide après centrifugation. Le surnageant est ensuite prélevé et évaporé par courant d'azote à 30°C puis repris dans du TPFA pour dosage.

b) Méthode de dosage

Tout comme l'extraction des TU, les méthodes de dosage et de préparation des gammes étalons sont celles validées et mises au point précédemment par le CHU AmiensPicardie (62).

Instrumentation

Le dosage se fait par HPLC avec le même appareillage (appareil HPLC, détecteur UV, longueur d'onde d'absorption, colonne, pré-colonne et logiciel d'acquisition) que pour le dosage des TU décrit précédemment. L'élution se fait également en phase inverse. La phase mobile polaire est en gradient d'élution à 0.8mL/min, constituée d'ACN (solvant A) et de

TPFA (solvant B) selon les modalités suivantes : 10% (en volume) de A de 0 à 1min ; augmentation progressive à 20% de A de 1 à 4min ; augmentation progressive à 30% de A de 4 à 8min ; diminution progressive à 10% de A de 8 à 10min. Avant et après le dosage, la colonne est respectivement conditionnée et rincée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour l'expérimentation *in vitro*. Le volume d'injection est de 30 μ L.

Préparation des gammes étalons

Les solutions mères d'IAA, d'IS et de pCS sont préparées dans du MeOH (IAA et IS) ou de l'eau milli-Q (pCS) à une concentration de 1mg/L. Une solution fille contenant les 3 toxines à 100 μ g/mL dans du sérum de porc est obtenue à partir de ces solutions mères.

La gamme étalon est composée de 6 standards à 0, 0.5, 2, 5, 25 et 50 μ g/mL en toxines dans du sérum de porc, préparée à partir de la solution fille. Les standards sont ensuite traités de la même manière que les échantillons (2V de MeOH contenant l'EI, centrifugation, récupération du surnageant, évaporation par courant d'azote, reprise dans TPFA et dosage).

4- Analyse statistique

Pour la partie *in vitro*, les tests utilisés pour comparer les différents groupes ont été un test d'analyse de la variance pour les groupes dont la distribution le permettait, autrement, le choix s'est porté sur un test de Kruskal Wallis suivis respectivement par un test post-hoc de Tukey et un test post-hoc de Dunn non corrigé. Pour la partie clinique, les patients ont été stratifiés en fonction du traitement qu'ils ont reçu. Les comparaisons intergroupes ont été effectuées avec un test du Khi-deux pour les variables qualitatives et un test t de Student (distribution normale) ou test de Mann-Whitney pour les variables continues. Le seuil de significativité a été fixé pour un $p \leq 0.05$. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 7.

D- Résultats

1- Effet du carbonate de sevelamer *in vitro*

Mesure du pH après incubation avec le sevelamer

Le pH des échantillons après incubation et filtration (filtrat) était de 8 ± 0.5 (dans la condition sans sevelamer), 10 ± 0.5 (dans la condition 3mg/mL de sevelamer) et 12 ± 0.5 (dans la condition 15mg/mL de sevelamer) (Tableau 4).

Tableau 4. pH des échantillons

	0mg/mL en sevelamer	3mg/mL en sevelamer	15mg/mL en sevelamer
pH	8±0.5	10±0.5	12±0.5
Les données sont exprimées en moyennes ± l'écart type.			

Effet du filtre sur les toxines et précurseurs

Afin de vérifier que les toxines et précurseurs ne soient pas retenus par le filtre dans nos conditions expérimentales, les résultats des dosages du filtrat des échantillons à 1 et 10µg/mL sans sevelamer ont été récupérés et rapportés à la concentration théorique initiale (Figure 5). Quelles que soient les conditions de pH et les concentrations en toxines et précurseurs, il n'existait pas de différence significative entre les valeurs obtenues et les concentrations théoriques initiales en toxines et précurseurs.

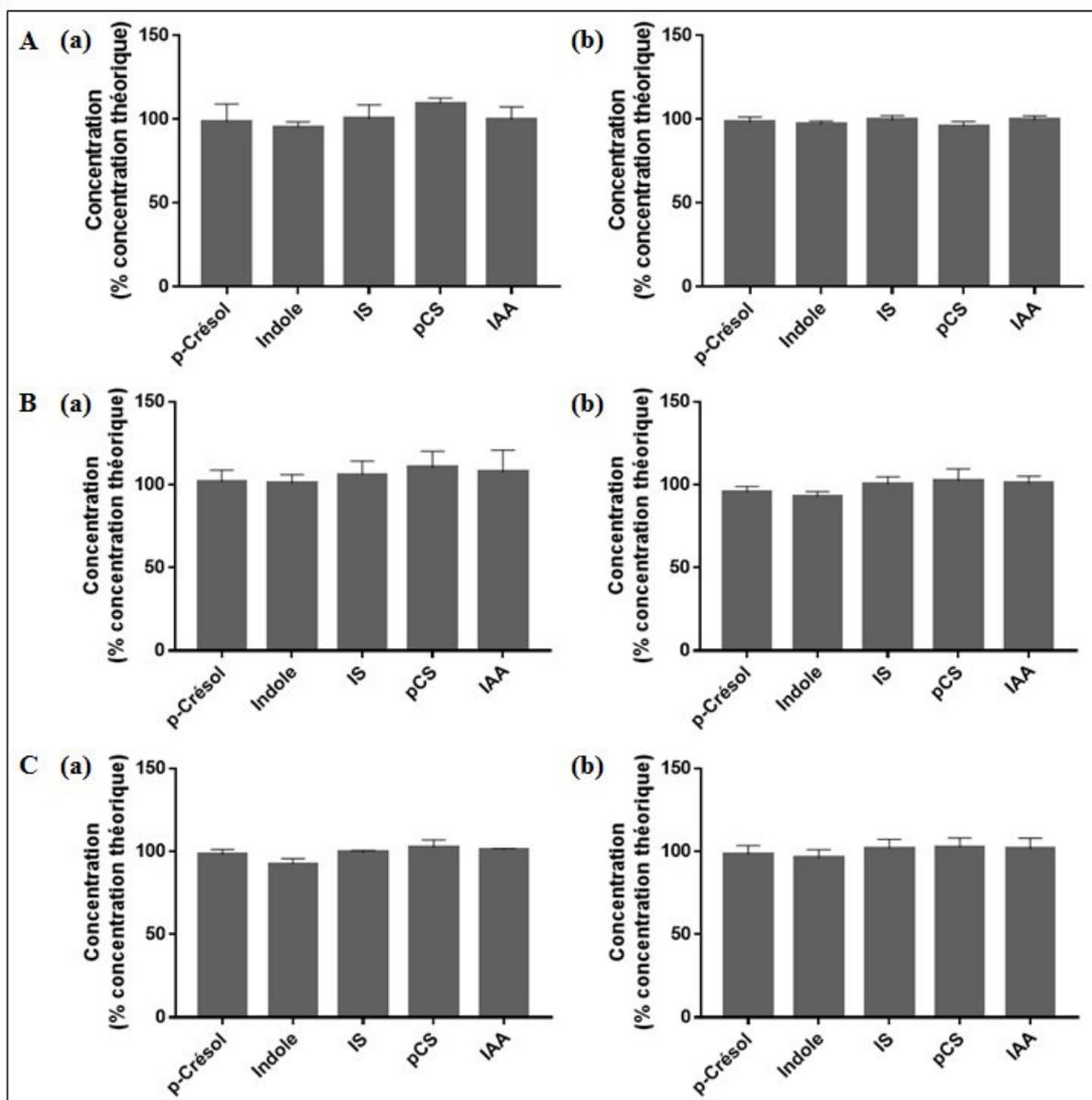


Figure 5. Effet du filtre sur la rétention des TU et précurseurs

Concentration (en % de concentration théorique) des TU et précurseurs à (A) pH non contrôlé, (B) pH 8 et (C) pH 6 après centrifugation des échantillons dans les tubes filtres sans sevelamer à (a) 1 μ g/mL et (b) 10 μ g/mL en TU et précurseurs. IS, Indoxyle Sulfate ; pCS, p-Crésyl Sulfate ; IAA, Indole Acide Acétique.

Effet du carbonate de sevelamer sur le phosphore inorganique

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier que la solution de carbonate de sevelamer était active dans nos conditions expérimentales afin d'avoir un contrôle positif. Le phosphore inorganique restant dans les filtrats a été dosé et rapporté à la concentration initiale théorique (9-10mmol/L) présente dans les échantillons (Figure 6). A pH non contrôlé, la faible quantité d'échantillon (n=2) n'a pas permis la réalisation de test statistique mais on observe une tendance à la diminution de la concentration en phosphore inorganique en présence de

sevelamer (-14% à 3mg/mL ; -22% à 15mg/mL) par rapport aux témoins, sans sevelamer. A pH 8, les concentrations en phosphore inorganique sont significativement réduites de 73% avec 15mg/mL de sevelamer comparativement à l'absence de sevelamer ($p=0.0145$). Une tendance à la diminution (-20%) est observée en présence de 3mg/mL de sevelamer par rapport aux conditions sans sevelamer. A pH 6, on observe une diminution significative de la concentration en phosphore inorganique en présence de sevelamer (-79% à 3mg/mL et -94% à 15mg/mL) par rapport aux conditions témoins ($p=0.0016$ et $p<0.0001$). On peut également observer une diminution plus importante (bien que non significative) de la concentration en phosphore inorganique à 15mg/mL en sevelamer qu'à 3mg/mL en sevelamer quelles que soient les conditions de pH. Enfin, en présence de sevelamer on remarque une diminution de la concentration en phosphore inorganique plus importante à pH 6 qu'à pH 8 ($p=0.1010$ à 3mg/mL en sevelamer et $p=0.0958$ à 15mg/mL).

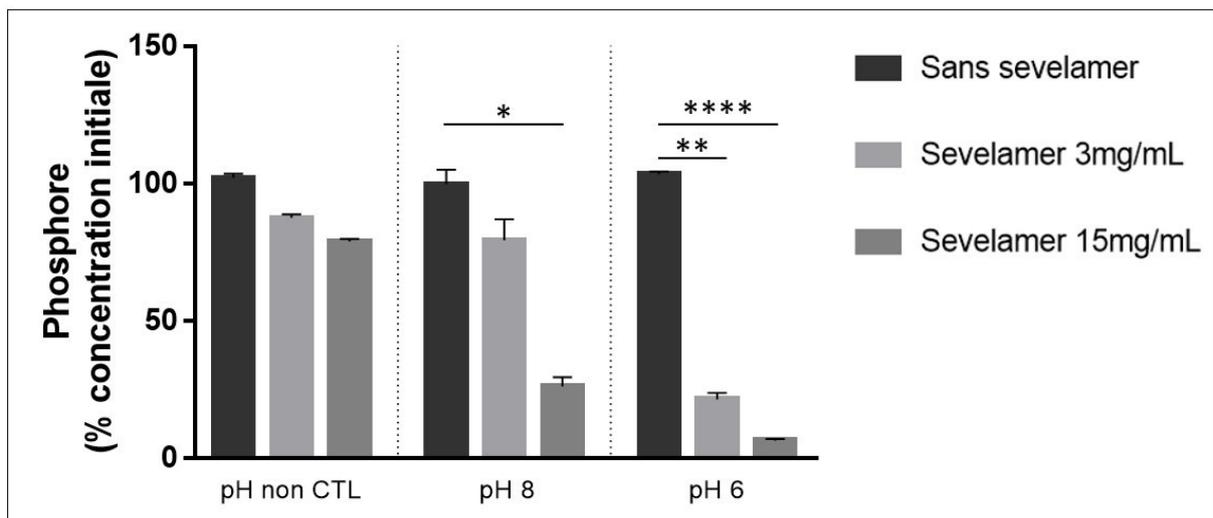


Figure 6. Effet de la solution de sevelamer sur le phosphore inorganique

Effet de la solution de sevelamer à différentes concentrations (0, 3 et 15mg/mL) sur le phosphore inorganique dans les différentes conditions de pH étudiées (pH non contrôlé, pH 8 et pH 6). CTL, contrôlé. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.

Effet du carbonate de sevelamer sur les précurseurs des TU

Aucune différence significative n'a été observée sur les précurseurs des TU que sont l'indole (Figure 7.A) et le p-crésol F (Figure 7.B), quelles que soient les conditions de pH, de concentrations initiales en précurseurs et de concentration en carbonate de sevelamer.

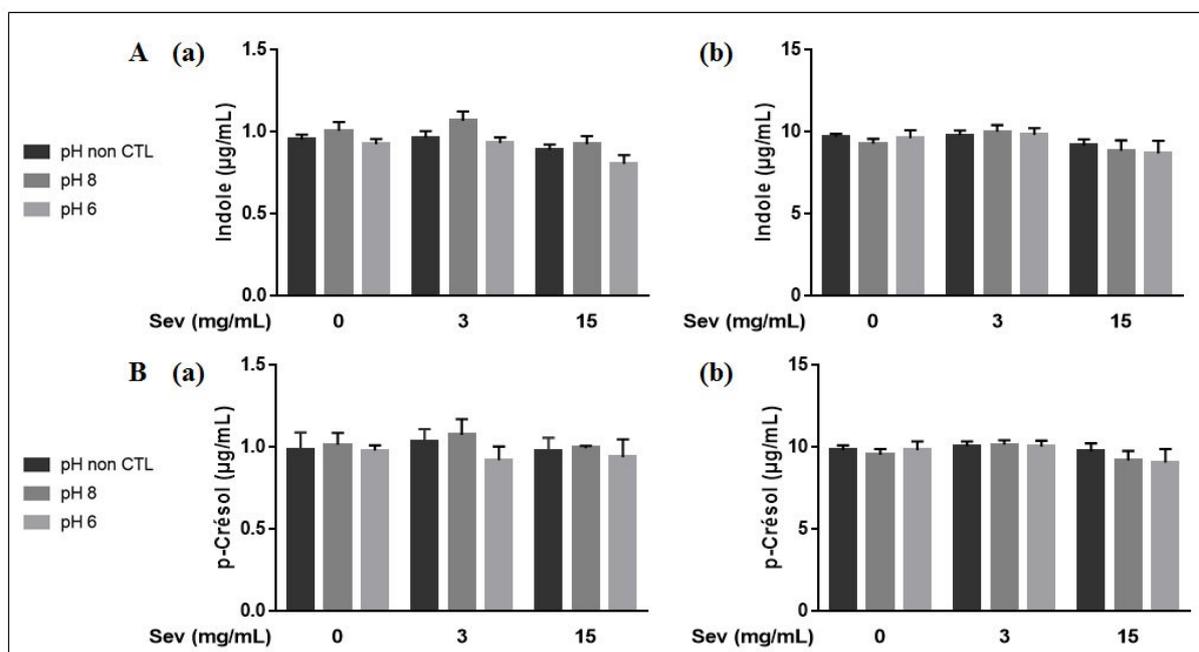


Figure 7. Effet du carbonate de sevelamer sur les précurseurs des TU

Effet du carbonate de sevelamer à différentes concentrations (0, 3 et 15mg/mL) dans les conditions de pH étudiées (pH non contrôlé, pH 8 et pH 6) sur A : l'indole à (a) 1µg/mL et (b) 10µg/mL et B : le p-crésol à (a) 1µg/mL et (b) 10µg/mL. Sev, Sevelamer ; CTL, contrôlé.

Effet du carbonate de sevelamer sur les TU

Effet sur le pCS

Sur le filtrat des échantillons à 1µg/mL en pCS, aucune différence significative n'a été retrouvée, quelles que soient les conditions de pH et les concentrations en sevelamer (Figure 8.a). Cependant à 10µg/mL en pCS (Figure 8.b), à pH 8, nous constatons que les concentrations en pCS dans le filtrat sont significativement réduites de 23% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer comparativement à l'absence de sevelamer ($7.92 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ vs $10.24 \pm 0.71 \mu\text{g/mL}$, $p=0.0332$) et de 25% comparativement à 3mg/ml de sevelamer ($7.92 \pm 0.47 \mu\text{g/mL}$ vs $10.50 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$, $p=0.0135$). De la même manière, à pH 6, les concentrations en pCS dans le filtrat sont réduites significativement de 26% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer par rapport aux conditions sans sevelamer ($7.65 \pm 0.86 \mu\text{g/mL}$ vs

10.27±0.59µg/mL, p=0.0029) et de 22% par rapport aux conditions à 3mg/mL en sevelamer (7.65±0.86µg/mL vs 9.84±0.81µg/mL, p=0.0165).

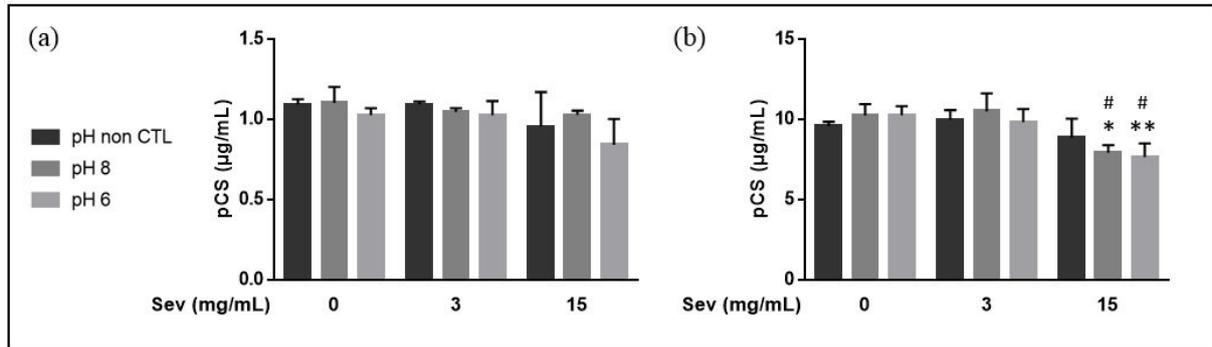


Figure 8. Effet du carbonate de sevelamer sur le pCS

Effet du carbonate de sevelamer à différentes concentrations (0, 3 et 15mg/mL) dans les conditions de pH étudiées (pH non contrôlé, pH 8 et pH 6) sur le pCS à (a) 1µg/mL et (b) 10µg/mL. Sev, sevelamer ; CTL, contrôlé ; pCS, p-Crésyl Sulfate. * p<0.05 vs Sev 0mg/mL aux mêmes conditions de pH, ** p<0.01 vs Sev 0mg/mL aux mêmes conditions de pH, # p<0.05 vs Sev 3mg/mL aux mêmes conditions de pH. Effet sur l'IAA

A 1µg/mL en IAA (Figure 9.a), à pH 8 uniquement, les concentrations en IAA sont significativement réduites de 8% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer comparativement à l'absence de sevelamer (0.89±0.13µg/mL vs 1.08±0.13µg/mL, p=0.0367) et de 9% comparativement à 3mg/mL de sevelamer (0.89±0.13µg/mL vs 1.10±0.07µg/mL, p=0.0061).

Cependant, à 10µg/mL en IAA (Figure 9.b), à pH non contrôlé, nous constatons que les concentrations en IAA dans le filtrat sont significativement réduites de 13% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer comparativement à 3mg/mL de sevelamer (8.88±0.48µg/mL vs 10.16±0.62µg/mL, p=0.0237). A pH 8, les concentrations en IAA dans le filtrat sont réduites significativement de 26% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer par rapport aux conditions sans sevelamer (7.41±0.27µg/mL vs 10.07±0.45µg/mL, p<0.0001) et de 27% par rapport aux conditions à 3mg/mL en sevelamer (7.41±0.27µg/mL vs 10.19±0.45µg/mL, p<0.0001). De la même manière, à pH 6, les concentrations en IAA dans le filtrat sont également significativement diminuées de 39% après incubation avec 15mg/mL comparativement à l'absence de sevelamer (6.17±0.58µg/mL vs 10.14±0.65µg/mL, p<0.0001) et de 35% comparativement à 3mg/mL en sevelamer (6.17±0.58µg/mL vs 9.50±0.38µg/mL, p<0.0001).

Enfin, on peut remarquer qu'à 15mg/mL en sevelamer, à 10µg/mL en concentration initiale en toxine (Figure 9.b), les concentrations en IAA dans le filtrat baissent de manière significative à pH 6 comparé aux conditions à pH non contrôlée (p<0.0001). De la même

manière, une diminution significative s'observe à pH 8 par rapport aux conditions à pH non contrôlé ($p=0.0154$).

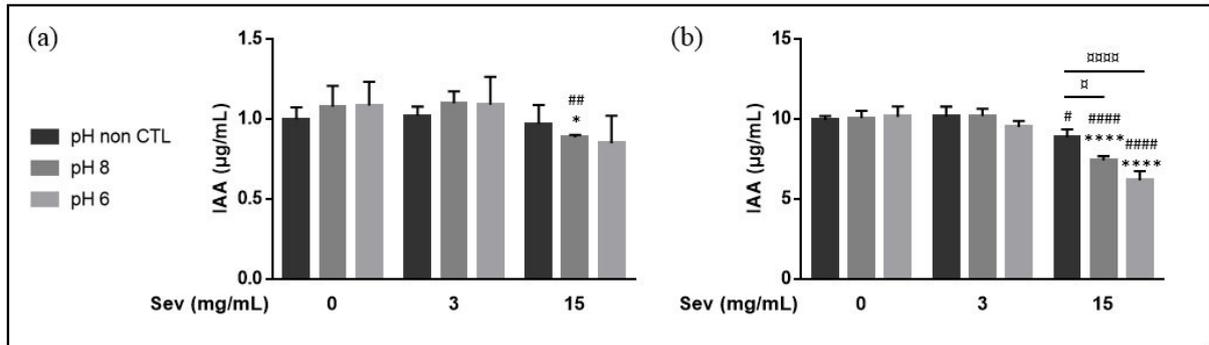


Figure 9. Effet du carbonate de sevelamer sur l'IAA

Effet du carbonate de sevelamer à différentes concentrations (0, 3 et 15mg/mL) dans les conditions de pH étudiées (pH non contrôlé, pH 8 et pH 6) sur l'IAA à (a) 1µg/mL et (b) 10µg/. Sev, sevelamer ; CTL, contrôlé ; IAA, Indole Acide Acétique. **** $p < 0.0001$ vs Sev 0mg/mL aux mêmes conditions de pH, # $p < 0.05$ vs Sev 3mg/mL aux mêmes conditions de pH, ##### $p < 0.0001$ vs Sev 3mg/mL aux mêmes conditions de pH, □ $p < 0.05$, □□□□ $p < 0.0001$.

Effet sur l'IS

A 1µg/mL en IS (Figure 10.a), à pH non contrôlé, les concentrations en IS dans le filtrat sont significativement réduites de 43% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer comparativement à l'absence de sevelamer ($0.57 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ vs $1.00 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$) et de 34% comparativement à 3mg/ml de sevelamer ($0.57 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$ vs $0.87 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$). De la même manière, à pH 8, les concentrations en IS dans le filtrat sont réduites significativement de 54% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer par rapport aux conditions sans sevelamer ($0.49 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ vs $1.06 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$) et de 50% par rapport aux conditions à 3mg/mL en sevelamer ($0.49 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ vs $0.98 \pm 0.07 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$). A pH 6, les concentrations en IS dans le filtrat sont également significativement diminuées de 51% après incubation avec 15mg/mL comparativement à l'absence de sevelamer ($0.49 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ vs $0.99 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$) et de 45% comparativement à 3mg/mL en sevelamer ($0.49 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ vs $0.89 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.0001$).

A 10µg/mL en IS (Figure 10.b), à pH non contrôlé, les concentrations en IS dans le filtrat sont significativement réduites de 44% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer comparativement à l'absence de sevelamer ($5.59 \pm 0.44 \mu\text{g/mL}$ vs $9.95 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$, $p = 0.0367$). A pH 8, les concentrations en IS dans le filtrat sont réduites significativement de 60% après incubation avec 15mg/mL de sevelamer par rapport aux conditions sans sevelamer ($3.99 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$ vs $10.04 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}$, $p = 0.0035$) et de 57% par rapport aux conditions à 3mg/mL en sevelamer ($3.99 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$ vs $9.20 \pm 0.98 \mu\text{g/mL}$, $p = 0.0413$). De la même manière,

à pH 6, les concentrations en IS dans le filtrat sont également significativement diminuées de 58% après incubation avec 15mg/mL comparativement à l'absence de sevelamer ($4.29 \pm 0.79 \mu\text{g/mL}$ vs $10.20 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$, $p=0.0006$) et de 52% comparativement à 3mg/mL en sevelamer ($4.29 \pm 0.79 \mu\text{g/mL}$ vs $9.01 \pm 0.58 \mu\text{g/mL}$, $p=0.0491$).

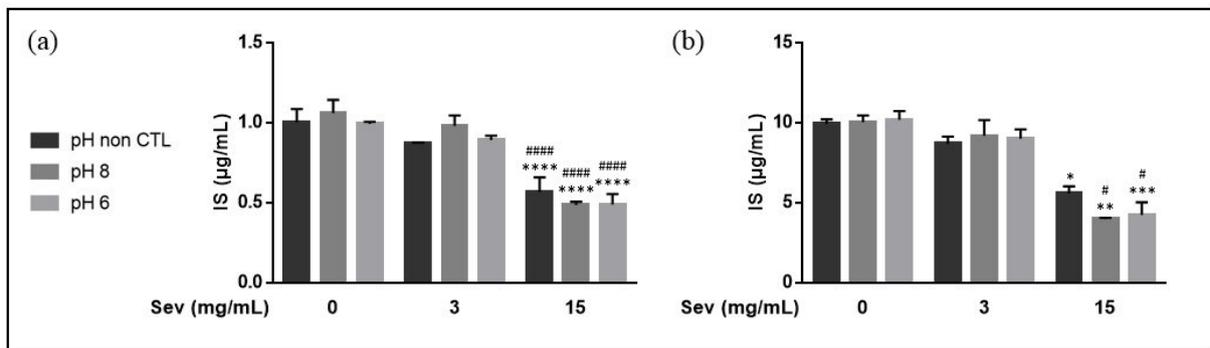


Figure 10. Effet du carbonate de sevelamer sur l'IS

Effet du carbonate de sevelamer à différentes concentrations (0, 3 et 15mg/mL) dans les conditions de pH étudiées (pH non contrôlé, pH 8 et pH 6) sur l'IS à (a) $1 \mu\text{g/mL}$ et (b) $10 \mu\text{g/mL}$. Sev, sevelamer ; CTL, contrôlé ; IS, Indoxyle Sulfate. * $p < 0.05$ vs Sev 0mg/mL aux mêmes conditions de pH, ** $p < 0.01$ vs Sev 0mg/mL aux mêmes conditions de pH, *** $p < 0.001$ vs Sev 0mg/mL aux mêmes conditions de pH, **** $p < 0.0001$ vs Sev 0mg/mL aux mêmes conditions de pH, # $p < 0.05$ vs Sev 3mg/mL aux mêmes conditions de pH, ##### $p < 0.0001$ vs Sev 3mg/mL aux mêmes conditions de pH.

2- Dosage des toxines urémiques dans la population FRENCH

Les caractéristiques des 78 patients à l'inclusion (visite 1) sont répertoriées dans le Tableau 5. L'âge moyen des patients était de 63 ± 13 ans, 55 (71%) étaient des hommes, le DFG moyen était de $27 \pm 9 \text{ mL/min/1.73m}^2$, la concentration moyenne sérique en phosphate était de $1.24 \pm 0.17 \text{ mmol/L}$, la concentration sérique médiane en IS était de 3.57 (interquartiles (IQ), 1.32 ; 6.31) $\mu\text{g/mL}$, en pCS de 10.65 (IQ, 6.05 ; 17.69) $\mu\text{g/mL}$ et en IAA de 1.02 (IQ, 0.58 ; 1.44) $\mu\text{g/mL}$. Les dosages des TU ont été effectués sur 71 sujets (34 du groupe placebo et 37 du groupe sevelamer), en effet certains sujets n'ont pas pu bénéficier des dosages pour des raisons techniques. A l'inclusion, il n'existait pas de différence significative entre les patients inclus dans le groupe placebo et ceux du groupe sevelamer.

Tableau 5. Caractéristiques de la population FRENCH à l'inclusion

	Total n=78	Placebo n=39	Sevelamer n=39	p
Age (années)	63 ± 13	63 ± 14	63 ± 13	0.918
Sexe masculin, n (%)	55 (70.5%)	28 (71.8%)	27 (69.2%)	0.804
IMC (kg/m ²)	28 ± 5	28 ± 5	28 ± 5	0.969
DFG MDRD (mL/min/1.73m ²)	27.0 ± 9.1	28.1 ± 9.9	25.4 ± 8.1	0.193
PAS (mmHg)	142 ± 20	143 ± 20	141 ± 20	0.656
PAD (mmHg)	79 ± 10	80 ± 10	78 ± 10	0.528
Phosphate (mmol/L)	1.24 ± 0.17	1.25 ± 0.16	1.23 ± 0.18	0.705
Calcium (mmol/L)	2.34 ± 0.11	2.33 ± 0.11	2.35 ± 0.11	0.486
Potassium (mmol/L)	4.8 ± 0.6	4.8 ± 0.6	4.73 ± 0.6	0.647
Créatinine (µmol/L)	234 ± 76	227 ± 75	241 ± 79	0.379
Urée (mmol/l)	18 ± 7	17 ± 6	18 ± 7	0.545
Albumine (g/L)	41.7 ± 3.4	41.5 ± 3.7	41.9 ± 3.1	0.645
Glucose (mmol/L)	5.4 (4.9 ; 6.7)	5.4 (4.9 ; 6.5)	5.4 (4.8 ; 6.8)	0.912
PTH intacte (pg/mL)	97 (61 ; 127)	103 (71 ; 141)	91 (58 ; 123)	0.169
CRP (mg/L)	3 (2 ; 8)	3 (2 ; 4)	5 (3 ; 10)	0.075
Triglycérides (mmol/L)	1.5 (1.1 ; 2.3)	1.7 (1.1 ; 2.9)	1.5 (1.0 ; 1.8)	0.301
Cholestérol total (mmol/l)	4.7 ± 1.1	4.7 ± 1.0	4.7 ± 1.2	0.522
HDL cholesterol (mmol/L)	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.5	0.547
LDL cholesterol (mmol/L)	2.5 ± 1.0	2.4 ± 1.0	2.6 ± 1.0	0.430
Hémoglobine (g/dL)	12.6 ± 1.4	12.5 ± 1.3	12.7 ± 1.5	0.407
Indoxyle sulfate (µg/mL)*	3.57 (1.32 ; 6.31)	3.45 (1.07 ; 5.61)	4.26 (1.77 ; 7.35)	
0.119 p-crésyl sulfate (µg/mL)*	10.65 (6.05 ; 17.69)	10.34 (5.12 ; 21.00)	11.34 (7.82 ; 16.44)	
0.681 3-indole acide acétique (µg/mL)*	1.02 (0.58 ; 1.44)	0.96 (0.59 ; 1.47)	1.08 (0.57 ; 1.44)	
0.812				

Les données sont exprimées en moyennes ± l'écart type pour les variables suivant une distribution normale, en médiane (rangs interquartiles) pour les variables ne suivant pas une distribution normale. IMC, Indice de Masse Corporelle ; DFG, Débit de Filtration Glomérulaire ; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease ; PAS, Pression Artérielle Systolique ; PAD, Pression Artérielle Diastolique ; CRP, Protéine C réactive ; HDL, High Density Lipoprotein ; LDL, Low Density Lipoprotein. * : placebo, n=34 ; sevelamer, n=37.

Après 12 semaines de traitement, à DFG constant, le groupe sevelamer et le groupe placebo ne différaient pas de manière significative dans l'évolution des concentrations de phosphate ($p=0.204$), de pCS ($p=0.302$), d'IS ($p=0.308$) et d'IAA ($p=0.053$) comme on peut le voir en Figure 11. Ces paramètres n'ont pas été modifiés de manière significative dans aucun des groupes, cependant pour l'IAA, la différence était à la limite de la significativité.

Tableau 6. Evolution dans le temps du phosphate et des TU pendant la période d'étude

Toxines	Visite 1 (V1)	Visite 5 (V5)	V5-V1
Phosphate (mmol/L)			
Placebo	1.25 ± 0.16	1.26 ± 0.19	0.01 ± 0.16
Sevelamer	1.23 ± 0.18	1.20 ± 0.19	-0.04 ± 0.20
pCS (µg/mL)			
Placebo	10.34 (5.12 ; 21.00)	11.69 (7.97 ; 25.37)	1.97 (-1.33 ; 7.89)
Sevelamer	11.34 (7.82 ; 16.44)	11.17 (8.89 ; 16.13)	-0.12 (-2.70 ; 4.30)
IS (µg/mL)			
Placebo	3.45 (1.07 ; 5.61)	3.46 (1.65 ; 9.99)	0.38 (-0.36 ; 4.39)
Sevelamer	4.26 (1.77 ; 7.35)	3.84 (2.10 ; 7.49)	0.26 (-0.85 ; 2.20)
IAA (µg/mL)			
Placebo	0.96 (0.59 ; 1.47)	0.99 (0.58 ; 1.65)	0.05 (-0.07 ; 0.16)
Sevelamer	1.08 (0.57 ; 1.44)	0.92 (0.57 ; 1.44)	-0.06 (-0.12 ; 0.05)
Les données sont exprimées en moyennes ± l'écart type pour le phosphate et en médiane (rangs interquartiles) pour le pCS, l'ISA et l'IAA. pCS, p-Crésyl Sulfate ; IS, Indoxyle Sulfate ; IAA, Indole Acide Acétique.			

En effet, pour le phosphate, dans le groupe placebo, la moyenne d'évolution des concentrations était de 0.01 ± 0.16 mmol/L pour une concentration moyenne de 1.26 ± 0.19 mmol/L à la fin de l'étude. Dans le groupe sevelamer, la moyenne d'évolution des concentrations était de -0.04 ± 0.20 mmol/L pour une concentration moyenne de 1.20 ± 0.19 mmol/L après 12 semaines de traitement (Tableau 6, Figure 11.a).

Pour le pCS dans le groupe placebo, la médiane d'évolution des concentrations était de 1.97 (IQ, -1.33 ; 7.89) µg/mL pour une concentration médiane de 11.69 (IQ, 7.97 ; 25.37) µg/mL à la fin de l'étude. Dans le groupe sevelamer, la médiane d'évolution des concentrations était de -0.12 (IQ, -2.70 ; 4.30) µg/mL pour une concentration médiane de 11.17 (IQ, 8.89 ; 16.13) µg/mL après 12 semaines de traitement (Tableau 6, Figure 11.b).

Pour l'IAA, dans le groupe placebo, la médiane d'évolution des concentrations était de 0.05 (IQ, -0.07 ; 0.16) $\mu\text{g/mL}$ pour une concentration médiane de 0.99 (IQ, 0.58 ; 1.65) $\mu\text{g/mL}$ à la fin de l'étude. Dans le groupe sevelamer, la médiane d'évolution des concentrations était de -0.06 (IQ, -0.12 ; 0.05) $\mu\text{g/mL}$ pour une concentration médiane de 0.92 (IQ, 0.57 ; 1.44) $\mu\text{g/mL}$ après 12 semaines de traitement (Tableau 6, Figure 11.c).

Enfin, pour l'IS, dans le groupe placebo, la médiane d'évolution des concentrations était de 0.38 (IQ, -0.36 ; 4.39) $\mu\text{g/mL}$ pour une concentration médiane de 3.46 (IQ, 1.65 ; 9.99) $\mu\text{g/mL}$ à la fin de l'étude. Dans le groupe sevelamer, la médiane d'évolution des concentrations était de 0.26 (IQ, -0.85 ; 2.20) $\mu\text{g/mL}$ pour une concentration médiane de 3.84 (IQ, 2.10 ; 7.49) $\mu\text{g/mL}$ après 12 semaines de traitement (Tableau 6, Figure 11.d).

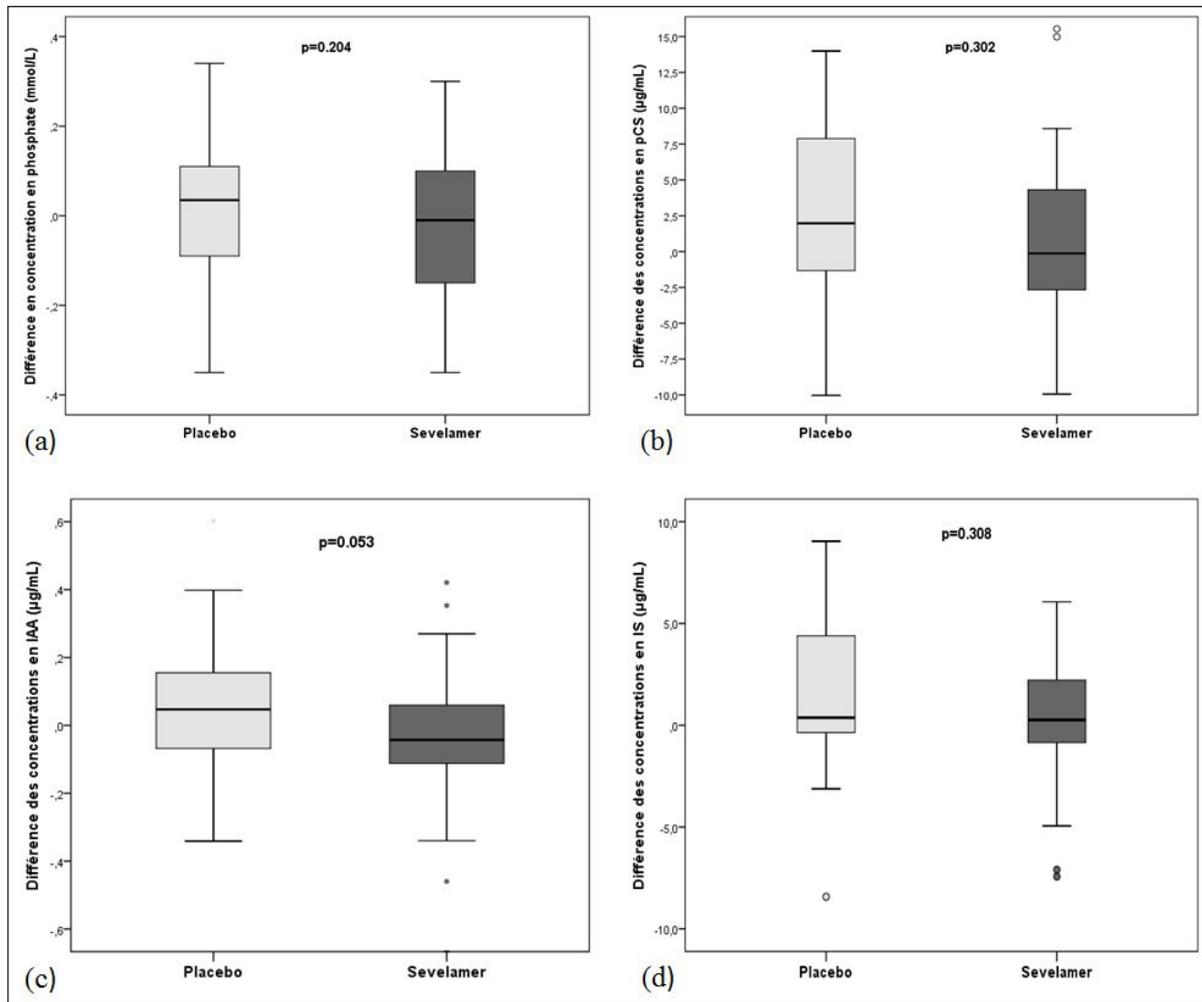


Figure 11. Evolution des concentrations sériques en phosphate et TU après 12 semaines de traitement
 Evolution des concentrations en (a) phosphate, (b) pCS, (c) IAA et (d) IS après 12 semaines de traitement par carbonate de sevelamer ou placebo. pCS, p-Crésyl Sulfate ; IAA, Indole Acide Acétique ; IS, Indoxyle Sulfate.

E- Discussion

Ce travail comportant une partie *in vitro* et une partie clinique a permis d'évaluer l'impact du carbonate de sevelamer sur la chélation de trois TU que sont le pCS, l'IS et l'IAA.

L'évaluation *in vitro* a montré un effet du carbonate de sevelamer sur les trois toxines, mais pas sur l'indole et le p-crésol, les précurseurs. Ces résultats n'ont pas été confirmés dans une étude clinique même si une tendance a été retrouvée pour l'IAA.

Dans un premier temps, pour ce qui est de la partie *in vitro*, nous avons créé des conditions expérimentales optimales, c'est-à-dire que nous avons vérifié que les filtres utilisés ne retenaient pas les TU et leurs précurseurs. Puis, dans un souci de contrôle du pH des conditions expérimentales, nous avons décidé de réaliser l'expérience aux pH 6 et 8, qui sont les extrémités des pH physiologiques que l'on retrouve au niveau intestinal (63,64). Enfin, nous avons vérifié l'activité de notre solution de carbonate de sevelamer sur le phosphate, car pour rappel, le carbonate de sevelamer est un médicament à mécanisme d'action local, utilisé en thérapeutique afin de chélater les phosphates intestinaux (49).

Dans la littérature, une seule étude a évalué l'effet *in vitro* du sevelamer, sur certaines TU et leurs précurseurs, ces résultats ont été uniquement rapportés en poster (65). Dans ces travaux De Smet *et al.* étudient l'effet de l'hydrochloride de sevelamer (à 2.5mg/mL) à différents pH (4, 7 et 8) sur le tryptophane, l'indole, le p-crésol, l'IS et le phosphate et en concluent que l'hydrochloride de sevelamer permet la chélation de l'indole, du p-crésol, de l'IS et du phosphate quelles que soient les conditions de pH (65). A l'inverse, nous n'avons pas démontré d'effet du carbonate de sevelamer sur les précurseurs, l'indole et le p-crésol. Cependant, De Smet *et al.* travaillaient avec des concentrations en indole près de 40 à 400 fois plus élevées que les nôtres, tandis que les concentrations en p-crésol étaient de 7µg/mL, concentration qui n'est pas si différente des nôtres (1 et 10µg/mL).

Parmi nos conditions expérimentales, les conditions optimales de chélation des TU par le carbonate de sevelamer étaient à forte concentration en TU (10µg/mL), sauf pour l'IS dont la concentration diminue également à 1µg/mL en présence de sevelamer. Ces mêmes résultats ont été retrouvés par De Smet *et al.* (65). De la même manière, une forte concentration en carbonate de sevelamer (15mg/mL) permet une chélation optimale. On peut également remarquer que les conditions de pH jouent un rôle dans la chélation de l'IAA. En effet, à pH 6 et/ou 8, la chélation de cette toxine est significativement plus importante qu'à pH non contrôlé

(pH=12 à 15mg/mL en sevelamer à pH non contrôlé). L'équipe de De Smet n'a pas précisé quels pH étaient optimums dans la chélation des composés étudiés (65). Ces résultats rejoignent les résultats obtenus pour le phosphate dont la chélation par le carbonate de sevelamer semble être plus importante à pH 6 qu'à pH 8 ($p=0.1010$ à 3mg/mL en sevelamer et $p=0.0958$ à 15mg/mL) et qu'à pH non contrôlé. Cela correspond également à ce que l'on peut retrouver dans la littérature (66). En effet, le pKa du carbonate de sevelamer étant de 9.5 (66) et sa forme dite « active » étant la forme protonée (NH_3^+), c'est à des pH inférieurs ou égaux à 8.5 que l'on trouvera près de 100% de forme protonée active de sevelamer, ce qui explique une chélation plus importante à pH 6 et 8 des TU et du phosphate par rapport à pH non contrôlé (pH=12). Si l'on tient également compte des pKa des TU et du phosphate cela explique que pour le phosphate ($pK_{a1}=2.15$; $pK_{a2}=7.2$; $pK_{a3}=12.3$) et l'IAA ($pK_a=4.7$) il existerait une chélation plus importante à pH 6 qu'à pH 8 contrairement à l'IS et au pCS qui sont des acides forts (pKa négatifs) (60).

Afin de tenter d'expliquer la chélation ou non de nos toxines et précurseurs, nous nous sommes intéressés aux structures chimiques de nos molécules (Figure 12). Il se pourrait ainsi que les groupements sulfates (R-HSO_4) de l'IS et du pCS se comportent de la même manière que le phosphate (HPO_4^{2-}) vis-à-vis du sevelamer. L'IAA quant à lui possède une fonction acide carboxylique (R-COOH), comme les acides biliaires qui sont également chélatés par le sevelamer (67). Nos précurseurs quant à eux ne possèdent aucun de ce type de groupement et sont constitués principalement (p-crésol) ou uniquement (indole) de cycles.

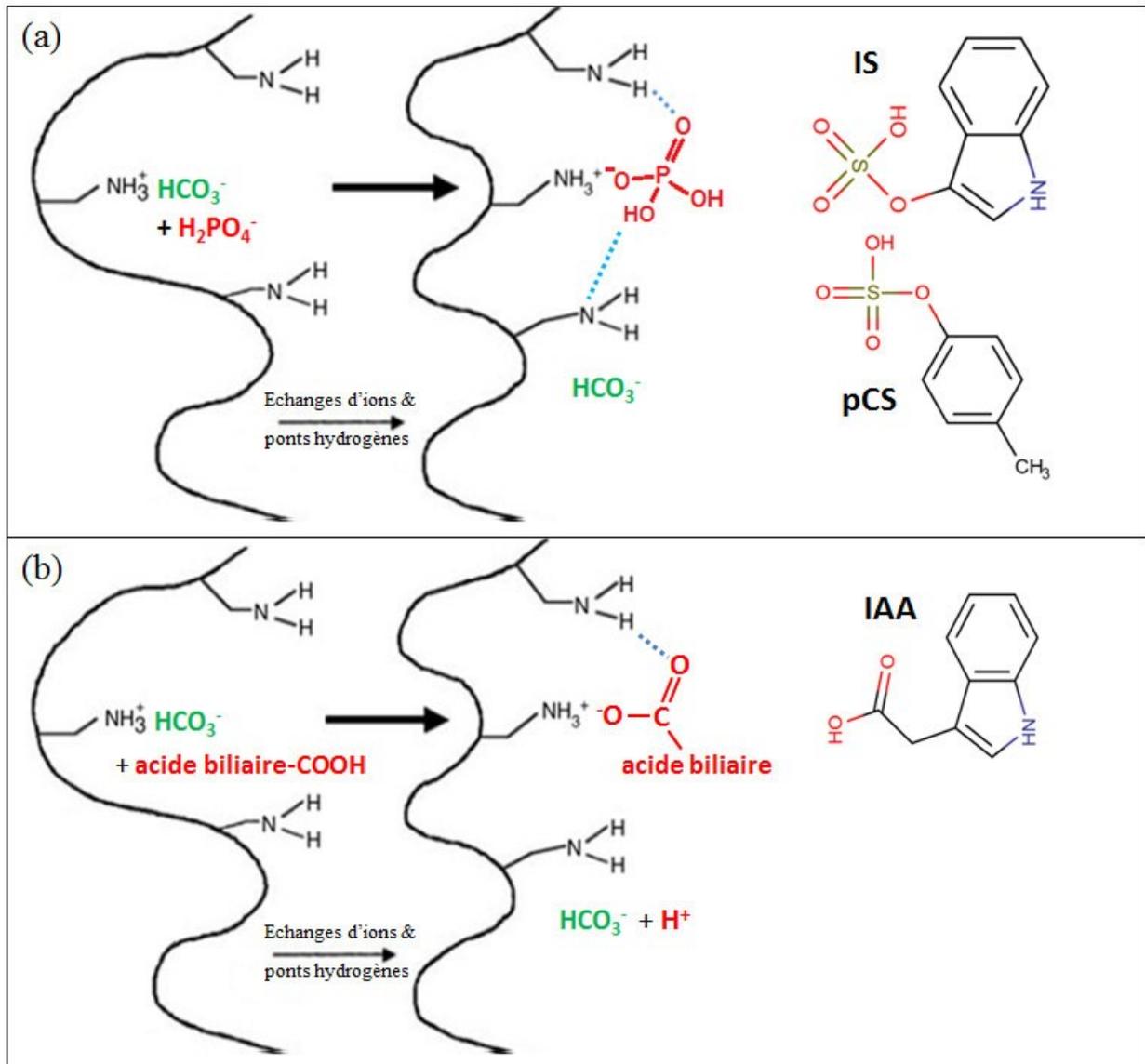


Figure 12. Mécanisme de chélation du carbonate de sevelamer de l'IS, du pCS et de l'IAA

Mécanisme de chélation du carbonate de sevelamer de (a) l'IS et du pCS et (b) de l'IAA. IS, Indoxyle Sulfate ; pCS, p-Crésyl Sulfate ; IAA, Indole Acide Acétique.

Les résultats de l'étude clinique – étude interventionnelle, multicentrique, randomisée en double aveugle, *versus* placebo – chez des patients en IRC de stade 3b et 4 (selon les critères KDOQI) n'ont pas montré de différence significative entre le groupe placebo et le groupe sevelamer après 12 semaines dans l'évolution des concentrations sériques de phosphate, de pCS, d'IS et d'IAA, même si ce dernier tend à diminuer. Cependant, cette diminution est à pondérer, en effet, il s'agit d'une baisse de concentration médiane en IAA de -0.06 (IQ, -0.12 ; 0.05) $\mu\text{g/mL}$ pour une concentration médiane initiale de 1.08 (IQ, 0.57 ; 1.44) $\mu\text{g/mL}$ soit une baisse d'un peu plus de 5% de la concentration initiale, *quid* de la relevance clinique ? Peut-être qu'à des stades plus avancés de MRC dans lesquels les concentrations sériques en IAA peuvent atteindre presque $10\mu\text{g/mL}$ (stade 5), l'effet du sevelamer pourrait être

plus important, tant sur le pourcentage de réduction des concentrations sériques que sur l'effet clinique. En effet, l'effet minime sur les concentrations d'IAA dans notre étude en comparaison avec les résultats expérimentaux *in vitro*, peut être dû au fait que les concentrations d'IAA chez ces patients à un stade modéré à sévère de la maladie ne sont pas suffisantes pour démontrer un effet plus marqué. Par rapport aux doses de sevelamer utilisées *in vitro*, il est difficile d'estimer si la concentration de sevelamer au niveau intestinal chez l'homme est la même – bien que nous ayons tenté d'utiliser des concentrations rationnelles, compte tenu de la posologie de ce médicament – or nous avons vu *in vitro* que ces effets étaient doses dépendants.

Une étude sur des souris urémiques n'a pas montrée de diminution significative des concentrations sériques d'IAA et d'IS après 8 semaines de traitement par sevelamer, la concentration sériques en phosphates était quant-à-elle diminuée à la fin de cette période (68). De rares études cliniques ont évalué l'impact potentiel du sevelamer sur certaines toxines urémiques et les résultats publiés semblent contradictoires. Dans une étude transversale et observationnelle non-comparative, Guida *et al.* se sont intéressés aux concentrations sériques de pCS de 57 patients en dialyse péritonéale (45 en hyperphosphatémie dont 29 étaient traités par hydrochloride de sevelamer et 16 recevaient un autre chélateur intestinal de phosphate ; 12 normophosphatémiques, n'étaient pas traités) (69). Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre le groupe sevelamer *vs* sans traitement et le groupe sevelamer *vs* autre chélateur intestinal de phosphate (69). Une autre étude observationnelle, noncomparative, de 2017 s'est intéressée à l'évolution des concentrations sériques d'IS et de pCS chez 5 patients hémodialysés pendant 12 semaines de traitement par hydrochloride de sevelamer et a ainsi montré une diminution significative de la concentration sérique en pCS à 3 mois mais aucune différence significative pour l'IS bien qu'à 3 mois elle présentait une tendance à la baisse (59). Cependant, le nombre de patients était très faible. La seule étude contrôlée retrouvée sur le sujet date de 2010, Brandenburg *et al.* dans une étude interventionnelle en cross-over (type A-B-A) ont inclus 57 patients hémodialysés qui ont reçu pendant 8 semaines de l'hydrochloride de sevelamer (période A) entre deux périodes de 8 semaines (périodes B) sous un autre chélateur intestinal de phosphate (70). Quarante et un patients ont complété l'étude et à l'issue des 8 semaines de sevelamer aucun changement des concentrations sériques n'avait été observé pour l'IAA et l'IS. Le pCS quant à lui voyait sa concentration augmenter de manière significative (70). Il faut noter que ces études étaient toutes réalisées chez des patients dialysés avec des effectifs peu importants, la méthodologie de ces études était critiquable puisqu'il ne s'agissait pas d'études randomisées en groupes parallèles contre placebo.

Le sevelamer n'a qu'une action locale au niveau intestinal et n'est pas absorbé par l'organisme, il ne peut interagir en théorie, à cet endroit, qu'avec les substances présentes au niveau intestinal. Or, il est supposé que ce sont l'indole et le p-crésol, les précurseurs et l'IAA (TU dont la synthèse se fait au niveau intestinal) que l'on retrouve à cet endroit, contrairement au pCS et à l'IS qui proviennent d'un métabolisme hépatique (18,49). Ainsi, le sevelamer ne devrait donc entraîner la diminution des concentrations sériques que de l'IAA puisque nous avons démontré *in vitro* que le carbonate de sevelamer n'avait pas d'action sur les précurseurs que sont le p-crésol et l'indole. En effet, dans l'étude FRENCH, il n'a pas été montré de diminution significative des concentrations en pCS et IS dans le groupe sevelamer, alors qu'une tendance était trouvée pour l'IAA. Dans la littérature seule l'étude de Bradenburg *et al.* évalue l'évolution des concentrations en IAA mais ne retrouve pas de résultat significatif. Cependant cette étude était peu robuste du fait de son caractère monocentrique, d'un nombre de sujet limité, d'un design non optimal et d'un comparateur actif. Lin *et al.* (59) suggèrent que le sevelamer serait capable de diminuer les concentrations sériques en pCS, cependant notre étude *in vitro* n'a pas montré d'efficacité du sevelamer à chélater son précurseur intestinal, le p-crésol. Bien qu'il n'existe aucune donnée sur la présence de pCS au niveau intestinal, une publication fait référence à la détoxification des phénols (comme le p-crésol) au niveau de l'intestin par des procédés de sulfatation (71). Ces données soutiennent ainsi la possibilité que le sevelamer pourrait agir sur la concentration sérique en pCS. Enfin, une autre hypothèse peut être émise s'il s'avère que le sevelamer ne chélate pas le p-crésol – précurseur du pCS – mais entraîne tout de même une diminution de sa concentration sérique comme le suggère Lin *et al.* (59), c'est l'existence d'un cycle entéro-hépatique de cette toxine.

Ce travail comporte cependant quelques limites, notamment en *in vitro*, le pCS à 1µg/mL est utilisé à une concentration proche de la limite inférieure de quantification de la méthode de dosage. De plus, la technologie HPLC-UV ne permet pas de s'affranchir d'interférences analytiques. Pour ce qui est de la partie étude clinique, bien que la méthodologie de l'étude soit robuste (interventionnelle, multicentrique, comparative *versus* placebo, randomisée, en double aveugle), il faut cependant relever que les patients étaient à des stades d'IRC pour lesquels les concentrations en TU sont faibles.

F- Conclusion et Perspectives

Nous avons montré qu'*in vitro* le carbonate de sevelamer était capable de chélater l'IAA, l'IS et le pCS, TU d'origine intestinale mais pas l'indole et le p-crésol, leur précurseur. L'étude clinique quant à elle n'a pas permis d'observer de changement significatif des concentrations de ces TU après 12 semaines de traitement par sevelamer chez des sujets en IRC de stades 3b et 4 (selon les critères KDOQI), bien que les concentrations en IAA tendent à diminuer. La capacité de ces TU à augmenter la morbi-mortalité cardiovasculaire et la progression de la MRC en fait des molécules d'intérêt dans la prise en charge de cette maladie. Compte tenu des limites de ce travail, il est prévu par la suite avec le Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie du CHU Amiens-Picardie, d'optimiser la méthode de dosage afin d'améliorer la sensibilité de la méthode, de diminuer la durée d'analyse et d'augmenter le nombre de TU analysables. Il serait également intéressant d'évaluer la capacité de chélation du sevelamer sur des concentrations en précurseurs plus importantes. Pour ce qui est de la partie clinique, un essai randomisé, multicentrique sur des patients en IRC terminale avec des concentrations sériques plus élevées en TU pourrait permettre d'évaluer l'impact d'un traitement par sevelamer dans ce contexte clinique. Enfin, des études chez l'animal nous permettraient de compléter ce travail, notamment pour tenter d'évaluer la présence et la concentration de ces toxines et précurseurs au niveau intestinal, ainsi que l'existence d'un cycle entéro-hépatique.

Bibliographie

1. Official Journal of the International Society of Nephrology. KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. 2013.
2. Agence de la Biomédecine. Rapport Annuel 2015, Réseau Epidémiologique et Information en Néphrologie. 2015.
3. Institut de Recherche et Documentation en Economie de la Santé. L'insuffisance rénale chronique et terminale (IRC/IRCT) : épidémiologie, coût et parcours de soins. 2018.
4. NICE Clinical Guideline n° 182. Chronic kidney disease. 2014.
5. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* mai 2003;63(5):1934-43.
6. Glasscock RJ. Uremic toxins: what are they? An integrated overview of pathobiology and classification. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found.* janv 2008;18(1):2-6.

7. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol JASN*. juill 2012;23(7):1258-70.
8. Meijers B, Glorieux G, Poesen R, Bakker SJL. Nonextracorporeal methods for decreasing uremic solute concentration: a future way to go? *Semin Nephrol*. mars 2014;34(2):228-43.
9. Vanholder R, Pletinck A, Schepers E, Glorieux G. Biochemical and Clinical Impact of Organic Uremic Retention Solutes: A Comprehensive Update. *Toxins*. 8 janv 2018;10(1).
10. Lau WL, Vaziri ND. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 1 janv 2017;131(1):3-12.
11. Morena M, Jaussent A, Chalabi L, Leray-Moragues H, Chenine L, Debure A, et al. Treatment tolerance and patient-reported outcomes favor online hemodiafiltration compared to high-flux hemodialysis in the elderly. *Kidney Int*. 2017;91(6):1495-509.
12. Locatelli F, Mastrangelo F, Redaelli B, Ronco C, Marcelli D, La Greca G, et al. Effects of different membranes and dialysis technologies on patient treatment tolerance and nutritional parameters. The Italian Cooperative Dialysis Study Group. *Kidney Int*. oct 1996;50(4):1293-302.
13. Liabeuf S, Lenglet A, Desjardins L, Neirynek N, Glorieux G, Lemke H-D, et al. Plasma beta-2 microglobulin is associated with cardiovascular disease in uremic patients. *Kidney Int*. déc 2012;82(12):1297-303.
14. Massy ZA, Liabeuf S. Middle-Molecule Uremic Toxins and Outcomes in Chronic Kidney Disease. *Contrib Nephrol*. 2017;191:8-17.
15. Massy ZA, Maizel J. Pleiotropic effects of sevelamer: a model of intestinal tract chelating agent. *Nephrol Ther*. nov 2014;10(6):441-50.
16. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins*. 2011;3(7):911-9.
17. Eloit S, Schepers E, Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, Biesen WV, et al. Estimated Glomerular Filtration Rate Is a Poor Predictor of Concentration for a Broad Range of Uremic Toxins. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. juin 2011;6(6):1266.
18. Ramezani A, Massy ZA, Meijers B, Evenepoel P, Vanholder R, Raj DS. Role of the Gut Microbiome in Uremia: A Potential Therapeutic Target. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. mars 2016;67(3):483-98.
19. Gross P, Massy ZA, Henaut L, Boudot C, Cagnard J, March C, et al. Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling. *J Cell Physiol*. déc 2015;230(12):2927-35.
20. Meijers BKI, Van Kerckhoven S, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, et al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. nov 2009;54(5):891-901.

21. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, et al. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* avr 2013;83(4):582-92.
22. Sun C-Y, Chang S-C, Wu M-S. Suppression of Klotho expression by protein-bound uremic toxins is associated with increased DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation. *Kidney Int.* avr 2012;81(7):640-50.
23. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, Meert N, Glorieux G, Schepers E, et al. Free p-cresylsulfate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* avr 2010;25(4):1183-91.
24. Lin C-J, Wu V, Wu P-C, Wu C-J. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PloS One.* 2015;10(7):e0132589.
25. Lin C-J, Pan C-F, Chuang C-K, Sun F-J, Wang D-J, Chen H-H, et al. P-cresyl sulfate is a valuable predictor of clinical outcomes in pre-ESRD patients. *BioMed Res Int.* 2014;2014:526932.
26. Niwa T. Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found.* sept 2010;20(5 Suppl):S2-6.
27. Yisireyili M, Shimizu H, Saito S, Enomoto A, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate promotes cardiac fibrosis with enhanced oxidative stress in hypertensive rats. *Life Sci.* 10 juill 2013;92(24-26):1180-5.
28. Chen J, Zhang X, Zhang H, Liu T, Zhang H, Teng J, et al. Indoxyl Sulfate Enhance the Hypermethylation of Klotho and Promote the Process of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Int J Biol Sci.* 2016;12(10):1236.
29. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Meert N, Glorieux G, Temmar M, et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* oct 2009;4(10):1551-8.
30. Leong SC, Sirich TL. Indoxyl Sulfate-Review of Toxicity and Therapeutic Strategies. *Toxins.* 30 2016;8(12).
31. Wu D, Nishimura N, Kuo V, Fiehn O, Shahbaz S, Van Winkle L, et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor induces vascular inflammation and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juin 2011;31(6):1260-7.
32. Dou L, Sallée M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, et al. The Cardiovascular Effect of the Uremic Solute Indole-3 Acetic Acid. *J Am Soc Nephrol JASN.* avr 2015;26(4):876.
33. Satoh M, Hayashi H, Watanabe M, Ueda K, Yamato H, Yoshioka T, et al. Uremic toxins overload accelerates renal damage in a rat model of chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol.* 2003;95(3):e111-118.

34. Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uraemic toxins induce proximal tubular injury via organic anion transporter 1-mediated uptake. *Br J Pharmacol.* janv 2002;135(2):555-63.
35. Vanholder RC, Eloot S, Glorieux GLRL. Future Avenues to Decrease Uremic Toxin Concentration. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* avr 2016;67(4):664-76.
36. Prokopienko AJ, Nolin TD. Microbiota-derived uremic retention solutes: perpetrators of altered nonrenal drug clearance in kidney disease. *Expert Rev Clin Pharmacol.* janv 2018;11(1):71-82.
37. Jansen J, Jankowski J, Gajjala PR, Wetzels JFM, Masereeuw R. Disposition and clinical implications of protein-bound uremic toxins. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 15 juill 2017;131(14):1631-47.
38. Koppe L, Pillon NJ, Vella RE, Croze ML, Pelletier CC, Chambert S, et al. p-Cresyl sulfate promotes insulin resistance associated with CKD. *J Am Soc Nephrol JASN.* janv 2013;24(1):88-99.
39. Ramos CI, Armani RG, Canziani MEF, Dalboni MA, Dolenga CJR, Nakao LS, et al. Effect of prebiotic (fructooligosaccharide) on uremic toxins of chronic kidney disease patients: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 22 juin 2018;
40. Salmean YA, Segal MS, Pali SP, Dahl WJ. Fiber supplementation lowers plasma p-cresol in chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found.* mai 2015;25(3):316-20.
41. Meijers BKI, De Preter V, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. p-Cresyl sulfate serum concentrations in haemodialysis patients are reduced by the prebiotic oligofructose-enriched inulin. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* janv 2010;25(1):219-24.
42. Fujii H, Nishijima F, Goto S, Sugano M, Yamato H, Kitazawa R, et al. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* juill 2009;24(7):2089-95.
43. Asai M, Kumakura S, Kikuchi M. Review of the efficacy of AST-120 (KREMEZIN®) on renal function in chronic kidney disease patients. *Ren Fail.* 2019;41(1):47.
44. Goto S, Yoshiya K, Kita T, Fujii H, Fukagawa M. Uremic toxins and oral adsorbents. *Ther Apher Dial Off Peer-Rev J Int Soc Apher Jpn Soc Apher Jpn Soc Dial Ther.* avr 2011;15(2):132-4.
45. Sato E, Saigusa D, Mishima E, Uchida T, Miura D, Morikawa-Ichinose T, et al. Impact of the Oral Adsorbent AST-120 on Organ-Specific Accumulation of Uremic Toxins: LC-MS/MS and MS Imaging Techniques. *Toxins* [Internet]. 28 déc 2017;10(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793106/>

46. Cha R-H, Kang SW, Park CW, Cha DR, Na KY, Kim SG, et al. A Randomized, Controlled Trial of Oral Intestinal Sorbent AST-120 on Renal Function Deterioration in Patients with Advanced Renal Dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 7 avr 2016;11(4):559-67.
47. Schulman G, Berl T, Beck GJ, Remuzzi G, Ritz E, Arita K, et al. Randomized PlaceboControlled EPPIC Trials of AST-120 in CKD. *J Am Soc Nephrol JASN*. juill 2015;26(7):1732-46.
48. Akizawa T, Asano Y, Morita S, Wakita T, Onishi Y, Fukuhara S, et al. Effect of a carbonaceous oral adsorbent on the progression of CKD: a multicenter, randomized, controlled trial. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. sept 2009;54(3):459-67.
49. Sanofi Aventis. Monographie de produit : RENVELA. 2017.
50. TGA Health Safety Regulation. Extract from the Clinical Evaluation Report for Sevelamer carbonate. 2014.
51. Delmez J, Block G, Robertson J, Chasan-Taber S, Blair A, Dillon M, et al. A randomized, double-blind, crossover design study of sevelamer hydrochloride and sevelamer carbonate in patients on hemodialysis. *Clin Nephrol*. déc 2007;68(6):386-91.
52. Fishbane S, Delmez J, Suki WN, Hariachar SK, Heaton J, Chasan-Taber S, et al. A randomized, parallel, open-label study to compare once-daily sevelamer carbonate powder dosing with thrice-daily sevelamer hydrochloride tablet dosing in CKD patients on hemodialysis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. févr 2010;55(2):307-15.
53. Abraham G, Kher V, Saxena S, Jayakumar M, Chafekar D, Pargaonkar P, et al. Sevelamer carbonate experience in Indian end stage renal disease patients. *Indian J Nephrol*. mai 2012;22(3):189-92.
54. Bezzaoucha S, Pichette V, Lafrance J-P, Bell R, Laurin L-P, Vallée M. The role of sevelamer carbonate in increasing serum bicarbonate in hyperphosphatemic predialysis patients who have metabolic acidosis. *Int J Clin Pharmacol Ther*. déc 2013;51(12):989-90.
55. Perry CM, Plosker GL. Sevelamer carbonate: a review in hyperphosphataemia in adults with chronic kidney disease. *Drugs*. mai 2014;74(7):771-92.
56. Ritz E. The clinical management of hyperphosphatemia. *J Nephrol*. juin 2005;18(3):221-8.
57. Rodríguez-Osorio L, Zambrano DP, Gracia-Iguacel C, Rojas-Rivera J, Ortiz A, Egido J, et al. Use of sevelamer in chronic kidney disease: beyond phosphorus control. *Nefrol Publicacion Of Soc Espanola Nefrol*. 2015;35(2):207-17.
58. Moysés RMA, Canziani MEF. Sevelamer and CKD-associated cardiovascular disease: going further, but far from there. *Kidney Int*. sept 2013;84(3):429-31.
59. Lin C-J, Pan C-F, Chuang C-K, Liu H-L, Huang S-F, Chen H-H, et al. Effects of Sevelamer Hydrochloride on Uremic Toxins Serum Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate in Hemodialysis Patients. *J Clin Med Res*. sept 2017;9(9):765-70.

60. The PubChem Project [Internet]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
61. FGF23 Reduction : Efficacy of a New Phosphate Binder in CHronic Kidney Disease [Internet]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01220843>
62. Romezin J. Développement d'une méthode de dosage des toxines urémiques par Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à une barrette de diodes. 2016.
63. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull.* juin 1999;46(3):183-96.
64. Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ, Hardcastle JD. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut.* août 1988;29(8):1035-41.
65. De Smet R, Thermote F, Lameire N, Vanholder R. Sevelamer Hydrochloride (Renagel®) Adsorbs the Uremic Compounds Indoxyl Sulfate, Indole and P-Cresol. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(505).
66. Yang Y, Mohammad A, Berendt RT, Carlin A, Khan MA, Faustino PJ. Evaluation of the In Vitro Efficacy of Sevelamer Hydrochloride and Sevelamer Carbonate. *J Pharm Sci.* févr 2016;105(2):864-75.
67. Braunlin W, Zhorov E, Guo A, Apruzzese W, Xu Q, Hook P, et al. Bile acid binding to sevelamer HCl. *Kidney Int.* août 2002;62(2):611-9.
68. Phan O, Ivanovski O, Nguyen-Khoa T, Mothu N, Angulo J, Westenfeld R, et al. Sevelamer prevents uremia-enhanced atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 1 nov 2005;112(18):2875-82.
69. Guida B, Cataldi M, Riccio E, Grumetto L, Pota A, Borrelli S, et al. Plasma p-cresol lowering effect of sevelamer in peritoneal dialysis patients: evidence from a CrossSectional Observational Study. *PloS One.* 2013;8(8):e73558.
70. Brandenburg VM, Schlieper G, Heussen N, Holzmann S, Busch B, Evenepoel P, et al. Serological cardiovascular and mortality risk predictors in dialysis patients receiving sevelamer: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* août 2010;25(8):2672-9.
71. Ramakrishna BS, Gee D, Weiss A, Pannall P, Roberts-Thomson IC, Roediger WE. Estimation of phenolic conjugation by colonic mucosa. *J Clin Pathol.* juin 1989;42(6):620-3.

Annexes

The Effect of Sevelamer on Serum Levels of Gut-Derived Uremic Toxins: Results from In Vitro Experiments and A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial

Youssef Bennis ^{1,2} , Yan Cluet ^{1,2}, Dimitri Titeca-Beauport ^{2,3} , Najeh El Esper ³, Pablo Ureña ⁴ , Sandra Bodeau ^{1,2} , Christian Combe ⁵, Bertrand Dussol ⁶, Denis Fouque ⁷ , Gabriel Choukroun ^{2,3} and Sophie Liabeuf ^{1,2,*} 



Received: 4 May 2019; Accepted: 10 May 2019; Published: 17 May 2019

Abstract: High serum levels of gut-derived uremic toxins, especially p-cresyl sulfate (pCS), indoxyl sulfate (IS) and indole acetic acid (IAA), have been linked to adverse outcomes in patients with chronic kidney disease (CKD). Sevelamer carbonate could represent an interesting option to limit the elevation of gut-derived uremic toxins. The aim of the present study was to evaluate the adsorptive effect of sevelamer carbonate on different gut-derived protein-bound uremic toxins or their precursors in vitro, and its impact on the serum levels of pCS, IS and IAA in patients with CKD stage 3b/4. For the in vitro experiments, IAA, p-cresol (precursor of pCS) and indole (precursor of IS), each at a final concentration of 1 or 10 µg/mL, were incubated in centrifugal 30 kDa filter devices with 3 or 15 mg/mL sevelamer carbonate in phosphate-buffered saline at a pH adjusted to 6 or 8. Then, samples were centrifuged and free uremic toxins in the filtrates were analyzed. As a control experiment, the adsorption of phosphate was also evaluated. Additionally, patients with stage 3b/4 CKD (defined as an eGFR between 15 and 45 mL/min per 1.73 m²) were included in a multicenter, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. The participants received either placebo or sevelamer carbonate (4.8 g) three times a day for 12 weeks. The concentrations of the toxins and their precursors were measured using a validated high-performance liquid chromatography method with a diode array detector. In vitro, regardless of the pH and concentration tested, sevelamer carbonate did not show adsorption of indole and p-cresol. Conversely, with 10 µg/mL IAA, use of a high concentration of sevelamer carbonate (15 mg/mL) resulted in a significant toxin adsorption both at pH 8 (mean reduction: 26.3 ± 3.4%) and pH 6 (mean reduction: 38.7 ± 1.7%). In patients with CKD stage 3b/4, a 12-week course of treatment with sevelamer carbonate was not associated with significant decreases in serum pCS, IS and IAA levels (median difference to baseline levels: −0.12, 0.26 and −0.06 µg/mL in the sevelamer group vs. 1.97, 0.38 and 0.05 µg/mL in the placebo group, respectively). Finally, in vitro, sevelamer carbonate was capable of chelating a gut-derived uremic toxin IAA but not p-cresol and indole, the precursors of pCS and IS in the gut. In a well-designed clinical study of patients with stage 3b/4 CKD, a 12-week

course of treatment with sevelamer carbonate was not associated with significant changes in the serum concentrations of pCS, IS and IAA.

Keywords: sevelamer; uremic toxins

Key Contribution: In vitro, sevelamer carbonate was capable of chelating a gut-derived uremic toxin IAA but not p-cresol and indole, the precursors of pCS and IS in the gut. In predialysis patients, sevelamer carbonate was not associated with significant changes in the serum concentrations of pCS, IS and IAA.

1. Introduction

Patients with late-stage chronic kidney disease (CKD) are permanently exposed to uremic toxins as a result of progressive nephron loss and dietary protein metabolites. These toxins also have a role in the development of uremia-related complications, such as cardiovascular and brain disorders. Uremic toxins can be classified into three classes as a function of their molecular weight: Small, water-soluble molecules (e.g., urea and creatinine), middle molecules (e.g., beta-2-microglobulin) and protein-bound uremic toxins [1]. Alternatively, toxins can be classified according to their origin (microbiota-derived or not) [2]. Indeed, the uremic toxins indoxyl sulfate (IS), indole acetic acid (IAA) and p-cresyl sulfate (pCS) emanate from the gut microbiota's metabolism of indole and p-cresol that are derived from tryptophan and tyrosine respectively. While IS and pCS are liver metabolites, IAA can be produced directly in the intestine before being absorbed [3]. IS, IAA and pCS are mainly cleared from the body by urinary excretion, but both biliary excretion and intestine secretion are possible and can be strengthened in the case of renal deficiency [4–6]. Moreover, the most part of p-cresol metabolites (and other phenolic compounds) excreted in the bile is known to undergo enterohepatic circulation [7].

These microbiota-derived compounds have emerged as a major subclass of protein-bound uremic toxins; they are thought to have a negative impact on the kidney, insulin resistance and might also be involved in the pathogenesis of vascular disease [8]. Indeed, high circulating levels of IS, IAA and pCS have been linked to an elevated incidence of cardiovascular events [9–12]. Due to the potential toxicity of high levels of uremic toxins, preventing the latter's accumulation might be a promising way of reducing the complications associated with CKD. This could potentially be achieved by reducing the production of toxins and/or by accelerating their elimination [13]. In Japan, the orally administered charcoal adsorbent AST-120 (Kremezin, Kureha Chemical Industry, Tokyo, Japan) has been used to adsorb uremic toxins [14], although its clinical impact requires further evaluation. The poly(allylamine) phosphate binder sevelamer carbonate is used to limit hyperphosphatemia in CKD patients. When taken with meals, the polymer binds dietary phosphate and prevents its absorption. Sevelamer carbonate is not absorbed from the gut, and thus has a solely local action. It is partially ionized in the bowel, and interacts with phosphate through ionic and hydrogen bonds. When bound to phosphate, other molecules (including uric acid [15], bile acids [16], vitamin C, vitamin K, folic acid [17], ciprofloxacin [18] and levothyroxine [19]) can also be adsorbed by sevelamer. Given the presence of indole, cresol and IAA in the gut, in the case of CKD, sevelamer may therefore constitute a valuable means of limiting the accumulation of gut-derived compounds. Only one abstract publication has reported on sevelamer hydrochloride's ability to adsorb the uremic toxins IS, indole and p-cresol in the intestinal lumen [20]. However, the few preclinical and clinical studies of sevelamer's effect on gut-derived uremic toxins has given inconclusive, conflicting results [20–22]. Furthermore, Brandenburg et al. observed a significant rise in serum p-cresol levels in dialyzed patients treated with the sevelamer group [21]. Given that these data have not been confirmed, we decided to evaluate sevelamer's effect on uremic toxins in pre-dialysis patients (i.e., when toxins levels were lower).

Hence, the objective of the present study was to evaluate i) the adsorption effect in vitro of sevelamer carbonate on one gut-derived protein-bound uremic toxins IAA and on the precursor of pCS named p-cresol and precursor of IS named indole and ii) the impact of sevelamer carbonate on uremic toxins levels in the serum of patients with CKD included in a multicenter, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, randomized clinical trial.

2. Results

2.1. The Impact of Sevelamer In Vitro

In the absence of sevelamer (and regardless of the pH and concentration tested), there were no significant differences in the concentration of p-Cresol, Indole and IAA in filtered versus non-filtered samples (Supplementary Figure S1).

After incubation with sevelamer, a significant decrease (relative to a control without sevelamer) in the filtrates' phosphorus concentration was observed at both pH 8 (mean \pm SD reduction: $20.7 \pm 7.6\%$ with 3 mg/mL sevelamer, and $74 \pm 3.5\%$ with 15 mg/mL sevelamer) and pH 6 (mean reduction: $78.7 \pm 2.4\%$ with 3 mg/mL, and $93.7 \pm 0.7\%$ with 15 mg/mL) (Supplementary Figure S2).

With regard to the precursors, neither 3 nor 15 mg/mL sevelamer had any effect on the filtrate concentration of p-cresol (Figure 1a,b) or indole (Figure 1c,d) at either of the initial precursor concentrations (1 or 10 μ g/mL) and at pH 8 or pH 6. With regard to IAA, 3 mg/mL of sevelamer did not show a significant effect

on the filtrate concentration of IAA (Figure 1e,f) at either of the initial toxin concentrations (1 or 10 µg/mL) and at pH 8 or pH 6. With 15 mg/mL of sevelamer and an initial toxin concentration of 1 µg/mL, there were low reductions (mean reduction: 11.5 ± 1.6% at pH 8 and 15 ± 17% at pH 6) in the initial concentration of IAA (Figure 1e). Conversely, with 15 mg/mL of sevelamer and an initial toxin concentration of 10 µg/mL, the concentration of IAA (Figure 1f) in the filtrates was significantly reduced (relative to a control without sevelamer) at both pH 8 (mean reduction: 26.3 ± 3.4%) and pH 6 (mean reduction: 38.7 ± 1.7%). At a starting concentration of 10 µg/mL, IAA was adsorbed more significantly by 15 mg/mL of sevelamer than by 3 mg/mL of sevelamer (Figure 1f), at both pH 8 (mean reduction: 27.2 ± 4.2%, respectively, relative to 3 mg/mL of sevelamer) and pH 6 (mean reduction: 34.2 ± 5.1% respectively, relative to 3 mg/mL sevelamer). In addition, the incubation of 10 µg/mL IAA with 15 mg/mL of sevelamer was associated with significantly higher adsorption at pH 6 than at pH 8 (mean reduction, relative to control without sevelamer: 38.7 ± 1.7% at pH 6, and 26.3 ± 3.4% at pH 8; Figure 1f).

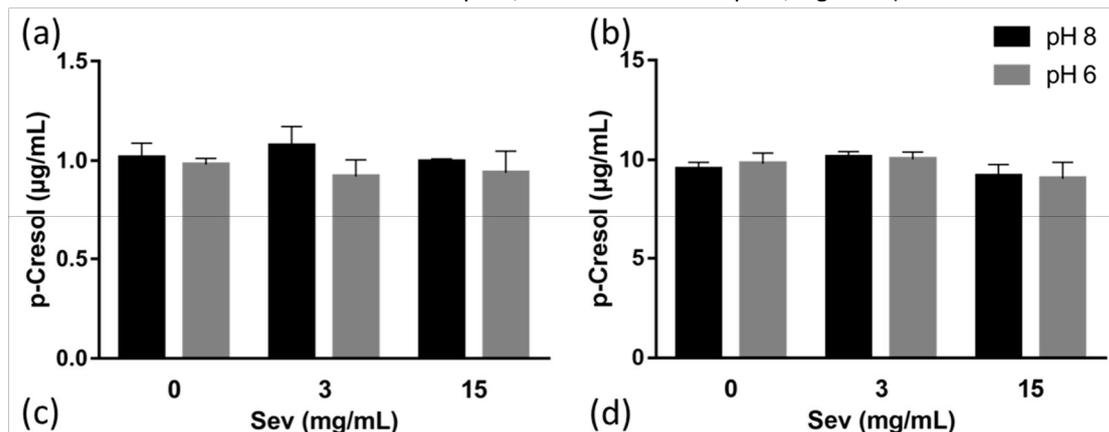


Figure 1. Cont.

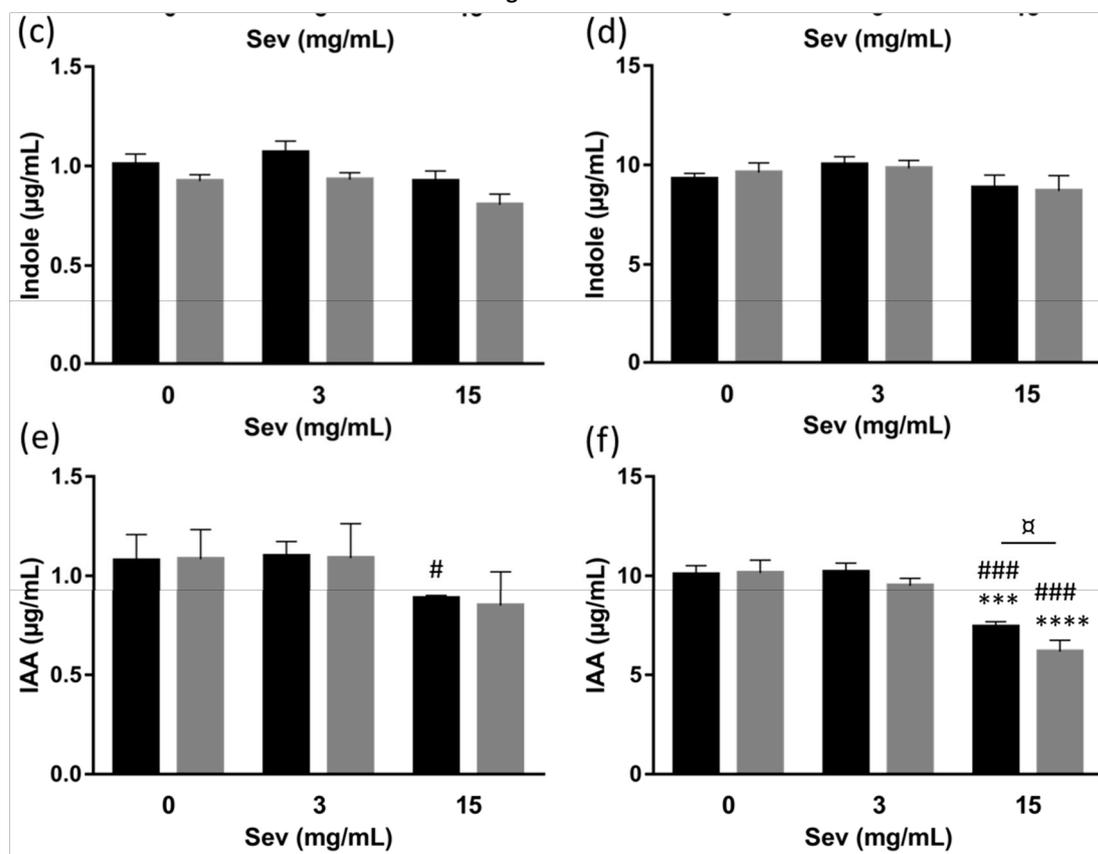


Figure 1. Sevelamer carbonate does not adsorb p-Cresol and Indole but significantly adsorbs IAA at a high concentration. Concentration in the filtrates of p-cresol (a,b); indole (c,d) and IAA (e,f) with 0, 3 or 15 mg/mL sevelamer carbonate, at pH 8 or 6, with 1 µg/mL (a, c and e) or 10 µg/mL (b, d and f) initial concentration. Data are expressed as the mean ± SD (n = 3–4). *** p < 0.001 vs. Sev 0 mg/mL same pH condition, **** p <

0.0001 vs. Sev 0 mg/mL same pH condition, # $p < 0.05$ vs. Sev 3 mg/mL same pH condition, ### $p < 0.0001$ vs. Sev 3 mg/mL same pH condition, $\alpha p < 0.05$. Abbreviations: IAA, indole acid acetic; Sev, Sevelamer.

2.2. Impact of Sevelamer in Chronic Kidney Disease Patients

The baseline characteristics of randomized patients is summarized in Table 1; the sevelamer and placebo groups did not differ significantly. The mean \pm SD age was 63 ± 13 , 71% of the participants were male, the mean serum phosphorus level was 1.24 ± 0.17 mmol/L, and the mean eGFR was 27 ± 9 mL/min per 1.73 m^2 . The median (IQR) toxin level was 3.57 (1.32; 6.31) $\mu\text{g/mL}$ for IS, 10.65 (6.05; 17.69) $\mu\text{g/mL}$ for pCS and 1.02 (0.58; 1.44) $\mu\text{g/mL}$ for IAA.

Table 1. Baseline characteristics of the randomized study participants.

Variables	All <i>n</i> = 78	Placebo <i>n</i> = 39	Sevelamer <i>n</i> = 39	<i>p</i>
Age (years)	63 ± 13	63 ± 14	63 ± 13	0.918
Male gender, <i>n</i> (%)	55 (70.5%)	28 (71.8%)	27 (69.2%)	0.804
GFR MDRD (mL/min per 1.73 m^2)	27.0 ± 9.1	28.1 ± 9.9	25.4 ± 8.1	0.193
Serum phosphorus (mmol/L)	1.24 ± 0.17	1.25 ± 0.16	1.23 ± 0.18	0.705
Serum calcium (mmol/L)	2.34 ± 0.11	2.33 ± 0.11	2.35 ± 0.11	0.486
Serum creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	234 ± 76	227 ± 75	241 ± 79	0.379
Serum albumin (g/L)	41.7 ± 3.4	41.5 ± 3.7	41.9 ± 3.1	0.645
Serum intact PTH (pg/mL)	97 (61; 127)	103 (71; 141)	91 (58; 123)	0.169

Table 1. Cont.

Variables	All <i>n</i> = 78	Placebo <i>n</i> = 39	Sevelamer <i>n</i> = 39	<i>p</i>
Serum total cholesterol (mmol/L)	4.7 ± 1.1	4.7 ± 1.0	4.7 ± 1.2	0.522
Serum LDL cholesterol (mmol/L)	2.5 ± 1.0	2.4 ± 1.0	2.6 ± 1.0	0.430
Serum indoxyl sulfate ($\mu\text{g/mL}$) * 0.53 ± 0.29 $\mu\text{g/mL}$ in healthy adults # [23]	3.57 (1.32; 6.31)	3.45 (1.07; 5.61)	4.26 (1.77; 7.35)	0.119
Serum p-cresyl sulfate ($\mu\text{g/mL}$) * 1.9 ± 1.3 $\mu\text{g/mL}$ in healthy adults # [23]	10.65 (6.05; 17.69)	10.34 (5.12; 21.00)	11.34 (7.82; 16.44)	0.681
Serum indole acetic acid ($\mu\text{g/mL}$) * 0.5 ± 0.3 $\mu\text{g/mL}$ in healthy adults # [23]	1.02 (0.58; 1.44)	0.96 (0.59; 1.47)	1.08 (0.57; 1.44)	0.812

Data are quoted as the mean \pm SD for normally distributed variables, the median (interquartile range) for non-normally distributed variables, or the number (percentage) for qualitative variables. GFR MDRD: Glomerular filtration rate estimated using the Modification of Diet in Renal Disease equation; FGF23, fibroblast growth factor 23; RU, relative units; PTH, parathyroid hormone. * Available for 72 patients (placebo group: $n = 35$; sevelamer group: $n = 37$). # [23].

As reported in the original article, there were no statistically significant differences between the sevelamer and placebo group in the changes in serum levels of C-terminal FGF23, intact FGF23, α -klotho, and phosphate [24]. However, the urinary phosphate-to-creatinine ratio and total and LDL cholesterol levels fell significantly in the sevelamer group but remained stable in the placebo group. In the intention-to-treat population, the mean adherence rate was 88% in the placebo group and 86% in the sevelamer group [24].

Seventy two of the 78 randomized patients had a complete set of assay data for IAA, IS and pCS at inclusion and at the end-of-study visit. After 12 weeks of treatment, the placebo and sevelamer groups did not differ significantly (after correction for the eGFR) in the median change in serum levels of phosphorus ($p = 0.204$), pCS ($p = 0.302$), IS ($p = 0.308$) and IAA ($p = 0.053$) (Figure 2 and Table 2). The intergroup difference for IAA was closest to the significance threshold.

Table 2. Change over time in clinical biochemistry parameters during the study period.

Toxin	Visit 1 (V1)	Visit 5 (V5)	V5-V1
Phosphorus (mmol/L)			
Placebo	1.25 ± 0.16	1.26 ± 0.19	0.01 ± 0.16

Sevelamer	1.23 ± 0.18	1.20 ± 0.19	−0.04 ± 0.20
pCS (µg/mL) Placebo			
	10.34 (5.12; 21.00)	11.69 (7.97; 25.37)	1.97 (−1.33; 7.89)
Sevelamer	11.34 (7.82; 16.44)	11.17 (8.89; 16.13)	−0.12 (−2.70; 4.30)
IS (µg/mL) Placebo			
	3.45 (1.07; 5.61)	3.46 (1.65; 9.99)	0.38 (−0.36; 4.39)
Sevelamer	4.26 (1.77; 7.35)	3.84 (2.10; 7.49)	0.26 (−0.85; 2.20)
IAA (µg/mL) Placebo			
	0.96 (0.59; 1.47)	0.99 (0.58; 1.65)	0.05 (−0.07; 0.16)
Sevelamer	1.08 (0.57; 1.44)	0.92 (0.57; 1.44)	−0.06 (−0.12; 0.05)

Data are quoted as the mean ± SD for normally distributed variables, and the median (interquartile range) for non-normally distributed variables. pCS, p-cresyl sulfate; IS, indoxyl sulfate; IAA, indole acetic acid.

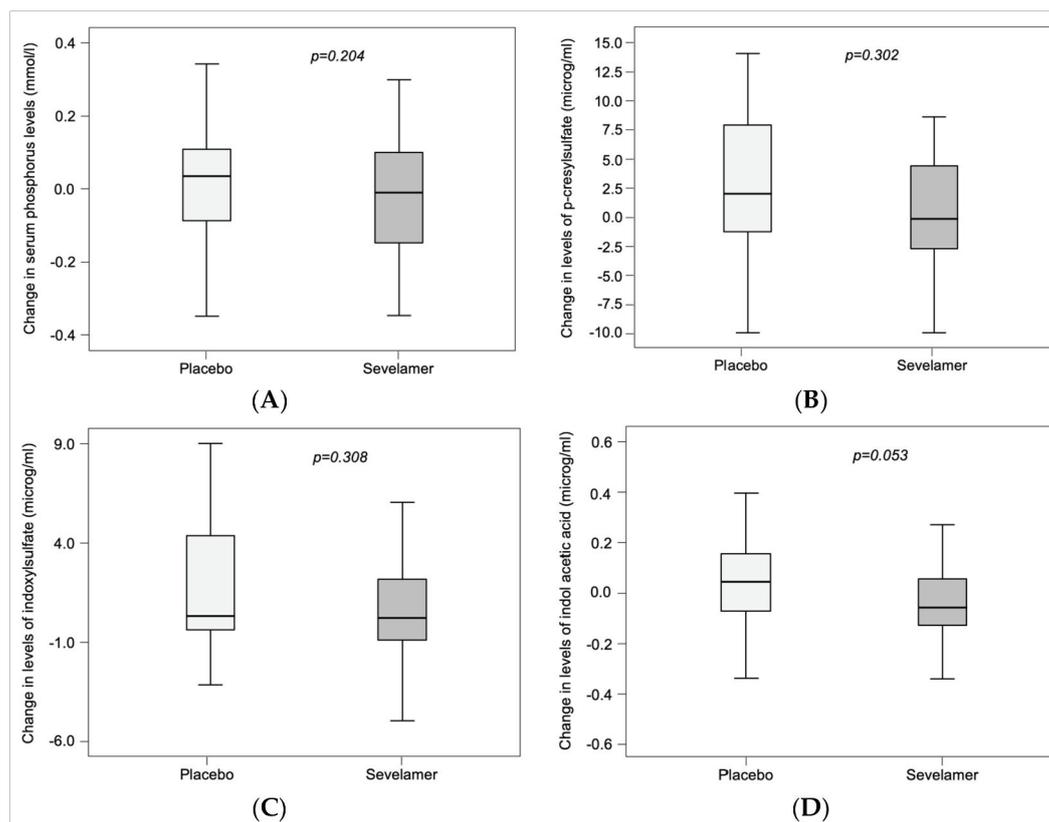


Figure 2. The absence of a significant sevelamer versus placebo difference in serum levels of phosphate and uremic toxins. Changes in serum levels of (A) phosphate, (B) p-cresylsulfate, (C) indoxyl sulfate and (D) serum indole acetic acid. Dots in Figure 2B,D represents outlier patients.

3. Discussion

Our combination of in vitro experiments and a clinical study was designed to investigate the ability of sevelamer carbonate to adsorb different gut-derived protein bound uremic toxins or their precursors in vitro, and its impact on the serum levels of pCS, IS and IAA in patients with CKD stage 3b/4. Our in vitro results showed that sevelamer carbonate was able to adsorb IAA but not p-Cresol and Indole, the gut precursors of pCS and IS. In a well-designed clinical study of patients with stage 3b/4 CKD, we did not observe a statistically significant sevelamer versus placebo difference in the change in concentrations of these uremic toxins over 12 weeks of treatment. However, there was a non-significant trend for the change in the IAA concentrations.

In the in vitro incubation experiments, we used a filtration device with a 30 kDa pore size; this retained the sevelamer polymer but not the uremic toxins and their precursors. Next, in order to control for a possible effect on pH, we carried out the experiments at pH 6 and pH 8, i.e., the physiological pH values in the intestine [25,26]. As a positive control, we confirmed the ability of a sevelamer carbonate solution to chelate phosphorus, as in the intestine. If we focused on chemical structures of tested molecules to explain in vitro results, IAA has a carboxylic acid function, such as bile acids, which are also chelated by sevelamer [16], however the precursors do not present any type of chemical group that could be chelated by sevelamer. The

in vitro effect of sevelamer on certain uremic toxins and their precursors has been reported in abstract form only [21]. Indeed, De Smet et al. studied the effect of 2.5 mg/mL sevelamer hydrochloride on levels of tryptophan, indole, p-cresol, IS and phosphate at pH 4, 7 and 8. They concluded that regardless of the pH value, sevelamer hydrochloride chelated indole, p-cresol, IS, and phosphate [21]. In contrast, we did not observe a significant effect of sevelamer carbonate on indole and p-cresol. However, De Smet et al. used sevelamer hydrochloride (rather than carbonate) and tested its adsorption effect on toxins in a phosphate-less medium, which was not relevant here. Moreover, the indole concentration they tested was 40 to 400-fold greater than those studied here, while their p-cresol concentration was 7 µg/mL, i.e., the same order of magnitude as the concentrations in our experiments (1 and 10 µg/mL) [21]. Under our experimental conditions, IAA was significantly adsorbed by sevelamer at the higher initial toxin concentration (10 µg/mL).

Similarly, significant adsorption of IAA was observed with a high concentration of sevelamer carbonate (15 mg/mL). Although the adsorption of phosphorus by sevelamer carbonate was significantly greater at pH 6 than at pH 8, which was consistent with a previous study showing a higher effect of sevelamer on phosphorus adsorption in an acid condition [27,28]. We did not observe other major differences between pH 6 and pH 8 with regard to sevelamer's adsorption of uremic toxins; indeed the difference was statistically significant but small for IAA.

The serum concentrations of pCS, IS and IAA measured at baseline from our multicenter, interventional, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical study of patients with stage 3b/4 CKD were consistent with the values previously reported in CKD stage 4 (pCS: 3.9 µg/mL; IS: 10.1 µg/mL and IAA: 1.0 µg/mL) [9,10,29]. However, this study did not reveal a significant sevelamer versus placebo difference in the change over time in serum concentrations of pCS, IS or IAA as well as phosphate, after 12 weeks of treatment. We hypothesized that the concentrations of toxins at baseline were not high enough for the effect of sevelamer over 1 year to be shown. Particularly, the initial median IAA concentration of 1.08 (IQ, 0.57; 1.44) µg/mL fell by 0.06 (IQ, -0.12, 0.05) µg/mL (i.e., by around 5%). The clinical relevance of this decrease is questionable even though it was nearly statistically significant ($p = 0.053$). Sevelamer's effect on percentage reduction in serum toxin concentrations and/or its clinical effect might be greater over a longer treatment period and in stage 5 CKD, where the serum IAA concentration can reach nearly 10 µg/mL. However, it is difficult to estimate the intestinal concentration of sevelamer in humans; this is probably an important parameter, given that sevelamer's effect was concentration-dependent in our in vitro experiments. It should be noted that the study participants showed good adherence to the treatment, as demonstrated by both pill counts and the decrease in LDL cholesterol levels after 12 weeks of sevelamer treatment [24]. Another hypothesis could be that the sevelamer did not work enough, indeed we failed to find a difference in serum level of phosphate between sevelamer and the placebo group.

In a previous study conducted in uremic apolipoprotein E-deficient mice, the serum concentration of IS and IAA had not significantly decreased after 8 weeks of a sevelamer-containing diet, on the contrary of the serum phosphorus concentration [30]. Additionally, only a few clinical studies have evaluated the impact of phosphate binders on uremic toxins, but the published results appear to be conflicting. In a non-comparative cross-sectional and observational study, Guida et al. measured the serum pCS concentration in 57 patients on peritoneal dialysis [22]. Among the 45 patients with hyperphosphatemia, 29 were treated with sevelamer hydrochloride and 16 received another phosphate binder. The 12 patients with normal phosphatemia were not treated. There was no significant difference in the serum pCS concentration between patients treated with sevelamer and non-treated patients, or between patients treated with sevelamer and those treated with another phosphate binder [22]. Another recent observational, non-comparative study evaluated the changes over time in serum IS and pCS concentrations in hemodialysis patients after 12 weeks of treatment with sevelamer hydrochloride; although the decrease was significant for pCS, only a non-significant trend was seen for IS [31]. However, the study population was very small ($n = 5$ patients). Brandenburg et al. included 57 hemodialysis patients in an interventional, controlled, cross-over study [21]. Forty-one patients completed the study. After 8 weeks of sevelamer hydrochloride treatment, no changes in serum concentrations were observed for IS and IAA; surprisingly, the serum level of pCS increased significantly [21]. It is important to note that these studies included small numbers of dialyzed patients and did not have a parallel-group and randomized designs. Very recently, a single-blind, placebo-controlled randomized clinical trial compared sevelamer with placebo in non-dialyzed patients with regard to plasma levels of p-cresol, which fell significantly in the sevelamer group only [32].

It should be noted that the circulating toxic form is pCS and not p-cresol, which is essentially generated *ex vivo* by the treatment of phenol-containing blood samples [33].

The present study's main strength was its comprehensive design; we tested our hypothesis by combining *in vitro* experiments with observations from a multicenter, double-blind, randomized clinical trial. The limitations were the limited experimental conditions, including different pH, additional uremic toxins concentrations and reaction times. For the clinical study, the main limitation was the absence of data on the study participants' diet and that, similar to what has been observed with phosphate, uremic toxins serum level as an outcome measure may have been too insensitive to capture changes in net gastrointestinal absorption. Finally, the study power seemed to be sufficient (near 80%) for IAA, which was the toxin with the least variability. However, a lack of power cannot be excluded for the other toxins with higher variability.

In conclusion, our *in vitro* results showed that sevelamer carbonate was capable of chelating the gut-derived uremic toxin IAA but not the IS and pCS gut precursors indole and p-cresol. In a well-designed clinical study of patients with stage 3b/4 CKD, a 12-week course of treatment with sevelamer carbonate was not associated with significant changes in the serum concentrations of the three toxins. There was a non-significant trend towards a decrease in the serum IAA concentration. In view of the known associations between uremic toxins and hard outcomes in CKD, further research on methods of decreasing toxin concentrations is essential.

4. Methods

4.1. The *In Vitro* Study

4.1.1. Chemicals

Indole, p-cresol, IS and IAA were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), and pCS was purchased from TCI Chemicals Europe (Paris, France). Stock solutions were prepared in methanol (for IAA and p-cresol) or reverse osmosis water (indole) at a concentration of 1 mg/mL and stored at -25 ± 5 °C. Working solutions were prepared by mixing and diluting the stock solutions in phosphate buffered saline (PBS, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Sevelamer carbonate was obtained from 2.4 g packets of Renvela® (Sanofi Aventis, Paris, France). The powder was dissolved in PBS to obtain a 30 mg/mL working solution.

4.1.2. Adsorption Experiments

Samples containing the IAA and two precursors (indole and p-cresol) at a final concentration of 1 or 10 µg/mL in PBS (pH adjusted to 6 or 8, as expected in the gut) were incubated in Amicon® Ultra-0.5 centrifugal 30 kDa filter devices (Merck-Millipore, Molsheim, France) with gentle agitation for 120 min at 37 °C in the presence or absence of sevelamer carbonate. Two concentrations of sevelamer carbonate were tested: 3 mg/mL was close to the concentrations used in literature reports on sevelamer's adsorption of uric acid [15], bile acids [11], vitamin C, vitamin K, and folic acid [12], and 15 mg/mL was approximately the concentration obtained when 4.8 g of sevelamer carbonate was dispersed in a volume of 320 mL, which corresponded to the average volume of small intestine fluid distributed into 6 "pockets" as measured in healthy volunteers after a meal [24]. Next, the samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min, and the filtrates were assayed for the uremic toxins. To check that the toxins and precursors were not bound to the filter under our experimental conditions, concentrations of IAA, indole and p-cresol in non-filtered solutions were also measured. Lastly, to confirm that sevelamer was able to adsorb phosphate under our experimental conditions, the inorganic phosphorus concentrations in filtrates after incubation were compared with those in the absence of sevelamer.

4.1.3. Analysis of Uremic Toxin Concentrations in Filtrates

The concentrations of toxins and precursors in filtrates were measured using a validated high-performance liquid chromatography (HPLC) method, with a diode array detector (DAD) set to 270 nm (Alliance®, Waters, Milford, MA, USA) using a 3 µm 3.9 mm × 150 mm Atlantis dC18 column (Waters, Milford, MA, USA) and a solvent gradient (acetonitrile/0.1 M ammonium formate buffer, pH 3) at a flow rate of 0.8 mL/min. The lower limit of quantification (LOQ) was 0.2 µg/mL for IAA, indole and p-cresol. The method gave linear results between the LOQ and 50 µg/mL (correlation coefficient: >0.999). The intraday and interday coefficients of variation were all below 15%, and the bias ranged from -12.9% to 7.1%. This method was validated according to the European Medicine Agency's guideline on bioanalytical method validation.

4.1.4. Analysis of The Inorganic Phosphorus Concentration in Filtrates

Inorganic phosphorus was assayed on an RX Daytona+ system (Randox Laboratories, Crumlin, UK), according to the manufacturer's instructions.

4.2. Clinical Study

4.2.1. Study Design

Ninety-six patients with stage 3b/4 CKD (defined as an eGFR between 15 and 45 mL/min per 1.73 m²) were included in the "FGF23 Reduction Efficacy of a New Phosphate Binder in Chronic Kidney Disease" (FRENCH) multicenter double-blind, placebo-controlled, parallel-group, randomized clinical trial between December 2010 and December 2012. After screening, 78 patients were randomized by 14 nephrology outpatient clinics in France (Appendix A). The study's objectives and procedures were approved by an independent investigational review board (CPP Nord Ouest II, Amiens, France; approval date 2 June 2010, ref 2010/19) and the French drug agency (Approval Date 30 July 2010, ref A100615-32). Each patient provided written informed consent to participate in the study. The study was registered at clinicaltrials.gov (NCT01220843) in October 2010. Details of the study population and the study design have been published elsewhere [25].

The FRENCH study's primary objective was to assess sevelamer carbonate's effect (relative to that of placebo) on the serum C-terminal FGF23 levels. The present report describes one of the study's secondary objectives: The evaluation of sevelamer carbonate's effect (relative to a placebo) on uremic toxin levels.

4.2.2. Sample Size Determination

The sample size of 80 patients was initially calculated on the FRENCH study's primary objective to detect a 30% reduction in median C-terminal FGF23 levels in the sevelamer carbonate group compared with the placebo group after 3 months [25]. Evaluation of the reduction in pCS, IS and IAA levels in the sevelamer carbonate group compared with the placebo group was a secondary objective of the FRENCH study and did not drive the sample size determination. However, the study power seemed to be sufficient (near 80%) for the detection of IAA (toxin with the least variability) differences.

4.2.3. Study Procedures

After a screening visit, participants completed a 1- to 2-week run-in period during which baseline blood and urine samples were collected. This was followed by a 12-week treatment period. At randomization, the study personnel and participants were blinded to the use of phosphate binder. The study participants took a dose of 4.8 g of sevelamer or placebo three times a day for 12 weeks. If the serum phosphate level fell below 0.8 mmol/L, the dose of treatment was halved. Adherence to study medication was monitored via pill counts.

4.2.4. Clinical and Laboratory Evaluations

All patients had an interview with a physician (to establish their personal medical history) and underwent a clinical examination. Age, gender, anthropometric data, and medication use were recorded. Fasting blood samples were collected after inclusion in the study and after 12 weeks of treatment.

4.2.5. Analysis of Uremic Toxins in Serum Samples

Proteins in standards, quality controls, and patient samples (200 µL of serum, in all cases) were precipitated with 400 µL methanol containing ethofylline as an internal standard. After centrifugation at 14,000× *g* for 10 min, 500 µL of supernatant was evaporated at 40 °C under nitrogen. Next, the dry residues were dissolved in 100 µL of pH 3 0.1 M ammonium formate buffer. Samples were assayed for pCS, IS and IAA using the validated HPLC-DAD method described above.

4.3. Statistical Analysis

In the in vitro study, intergroup comparisons were performed using an analysis of variance (for normally distributed data) or a Kruskal–Wallis test (for non-normally distributed data), followed respectively by a Tukey post hoc test or a non-corrected Dunnett's post hoc test.

In the clinical study, all patients with available data were analyzed. Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD), median (interquartile range [IQR], or the number (percentage)), as appropriate.

Patients were stratified by treatment group. Intergroup comparisons were performed with a chi-squared test (for categorical variables) or a t test or Mann–Whitney test (for continuous variables). We compared the changes in phosphorus and uremic toxin levels over time (i.e., between randomization and week 12) in the two treatment groups. The paired *t* test method was applied for the comparison of repeated measures.

The threshold for statistical significance was set to $p \leq 0.05$. All statistical analyses were performed using SPSS software (version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) for Windows (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) or GraphPad Prism (version 7.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6651/11/5/279/s1>, Figure S1: In the absence of sevelamer carbonate, the filter devices did not retain the toxins, Figure S2: Sevelamer carbonate effectively adsorbs phosphorus.

Author Contributions: Conceptualization, G.C., Y.B. and S.L.; methodology, G.C., Y.B. and S.L.; software, Y.B. and S.L.; validation, G.C., Y.B. and S.L.; formal analysis, Y.C., Y.B. and S.L.; investigation, Y.C., D.T.-B., S.B., P.U., C.C., N.E.E., B.D., D.F.; resources, G.C.; data curation, Y.B. and S.L.; writing—original draft preparation, Y.C., Y.B.; writing—review and editing, S.L., G.C., D.T.-B., S.B., P.U., C.C., N.E.E., B.D., D.F.; visualization, G.C.; supervision, G.C., Y.B. and S.L.; project administration, S.L.; funding acquisition, G.C.

Funding: This research was funded by GENZYME.

Acknowledgments: We would like to thank all nephrology departments recruiting patients, patients, pharmacology department in Amiens including K. Masmoudi, A.S Lemaire Hurtel and all the technical team.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Appendix A. List of FRENCH Collaborators

National coordination: Amiens University Hospital: Prof. Gabriel Choukroun (lead investigator, study coordinator), Dr Sophie Liabeuf, Dr Najeh El Esper, Dr Maité Jaureguy, Dr Caroline Lecaque, Prof. Ziad Massy, Prof. Jean-Marc Chillon, Dr Romuald Mentaverri, Dr Momar Diouf, Carl Picard, Jonathan Meynier, Marie-Laurence Lepilliez.

Local clinical centers: Bordeaux: Pr Christian Combe, Marine Douillet; Caen: Pr Jean-Philippe Ryckelynck, Mohamed Ouethrani; Marseille: Pr Bertrand Dussol, Laurent Samson; Saint Ouen: Pr Pablo Urena; Nancy: Pr Luc Frimat; Paris Necker: Pr Dominique Prié; Paris Pompidou: Pr Pascal Houllier, Pr Eric Thervet; Paris Tenon: Dr Courbebaisse; Saint Etienne: Dr Eric Alamartine; Nice: Pr Vincent Esnault, Dr Guillaume Alexandre Favre; Montpellier: Pr Bernard Canaud, Dr Leila Chenine Khoualef, Dr Héléne Leray Moragues, Dr Marion Morena; Lyon: Pr Denis Fouque; Lyon Tassin: Pr Guillaume Jean; Valenciennes: Pr Philippe Vanhille.

References

1. Vanholder, R.; De Smet, R.; Glorieux, G.; Argiles, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P.P.; Deppisch, R.; et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 1934–1943. [CrossRef]
2. Briskey, D.; Tucker, P.; Johnson, D.W.; Coombs, J.S. The role of the gastrointestinal tract and microbiota on uremic toxins and chronic kidney disease development. *Clin. Exp. Nephrol.* **2017**, *21*, 7–15. [CrossRef] [PubMed]
3. Koga, J.; Syono, K.; Ichikawa, T.; Adachi, T. Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1209*, 241–247. [CrossRef]
4. Williams, R.T.; Millburn, P.; Smith, R.L. The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1965**, *123*, 110–124. [CrossRef]
5. Morimoto, K.; Tominaga, Y.; Agatsuma, Y.; Miyamoto, M.; Kashiwagura, S.; Takahashi, A.; Sano, Y.; Yano, K.; Kakinuma, C.; Ogihara, T.; et al. Intestinal secretion of indoxyl sulfate as a possible compensatory excretion pathway in chronic kidney disease. *Biopharm. Drug Dispos.* **2018**, *39*, 328–334. [CrossRef] [PubMed]
6. Takada, T.; Yamamoto, T.; Matsuo, H.; Tan, J.K.; Ooyama, K.; Sakiyama, M.; Miyata, H.; Yamanashi, Y.; Toyoda, Y.; Higashino, T.; et al. Identification of ABCG2 as an exporter of uremic toxin indoxyl sulfate in mice and as a crucial factor influencing CKD progression. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11147. [CrossRef] [PubMed]
7. Deichmann, W.; Keplinger, M. Phenols and phenolic compounds. In *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 3rd ed.; Clayton, G.D., Clayton, F.E., Eds.; Wiley and Sons: Hoboken, NJ, USA, 1981; Volume 2A, pp. 2597–2601. ISBN 0-471-16042-3.

8. Vanholder, R.; Schepers, E.; Pletinck, A.; Nagler, E.V.; Glorieux, G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: A systematic review. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2014**, *25*, 1897–1907. [[CrossRef](#)]
9. Liabeuf, S.; Barreto, D.V.; Barreto, F.C.; Meert, N.; Glorieux, G.; Schepers, E.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25*, 1183–1191. [[CrossRef](#)]
10. Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic Kidney disease patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **2009**, *4*, 1551–1558. [[CrossRef](#)]
11. Liabeuf, S.; Glorieux, G.; Lenglet, A.; Diouf, M.; Schepers, E.; Desjardins, L.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z.A.; European Uremic Toxin (EUTox) Work Group. Does p-cresylglucuronide have the same impact on mortality as other protein-bound uremic toxins? *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dou, L.; Sallée, M.; Cerini, C.; Poitevin, S.; Gondouin, B.; Jourde-Chiche, N.; Fallague, K.; Brunet, P.; Calaf, R.; Dussol, B.; et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 876–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vanholder, R.C.; Eloit, S.; Glorieux, G.L.R.L. Future avenues to decrease uremic toxin concentration. *Am. J. Kidney Dis.* **2016**, *67*, 664–676. [[CrossRef](#)]
14. Fujii, H.; Nishijima, F.; Goto, S.; Sugano, M.; Yamato, H.; Kitazawa, R.; Kitazawa, S.; Fukagawa, M. Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 2089–2095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ohno, I.; Yamaguchi, Y.; Saikawa, H.; Uetake, D.; Hikita, M.; Okabe, H.; Ichida, K.; Hosoya, T. Sevelamer decreases serum uric acid concentration through adsorption of uric acid in maintenance hemodialysis patients. *Intern. Med.* **2009**, *48*, 415–420. [[CrossRef](#)]
16. Braunlin, W.; Zhorov, E.; Guo, A.; Apruzzese, W.; Xu, Q.; Hook, P.; Smisek, D.L.; Mandeville, W.H.; Holmes-Farley, S.R. Bile acid binding to sevelamer HCl. *Kidney Int.* **2002**, *62*, 611–619. [[CrossRef](#)]
17. Takagi, K.; Masuda, K.; Yamazaki, M.; Kiyohara, C.; Itoh, S.; Wasaki, M.; Inoue, H. Metal ion and vitamin adsorption profiles of phosphate binder ion-exchange resins. *Clin. Nephrol.* **2010**, *73*, 30–35. [[CrossRef](#)]
18. Kays, M.B.; Overholser, B.R.; Mueller, B.A.; Moe, S.M.; Sowinski, K.M. Effects of sevelamer hydrochloride and calcium acetate on the oral bioavailability of ciprofloxacin. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **2003**, *42*, 1253–1259. [[CrossRef](#)]
19. Arnadottir, M.; Johannesson, A.J. Phosphate binders and timing of levothyroxine administration. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. Eur. Ren. Assoc.* **2008**, *23*, 420. [[CrossRef](#)]
20. De Smet, R.; Thermote, F.; Lameyre, N.; Vanholder, R. Sevelamer hydrochloride (Renagel) adsorbs the uremic compounds indoxyl sulfate, indole and p-cresol. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 505.
21. Brandenburg, V.M.; Schlieper, G.; Heussen, N.; Holzmann, S.; Busch, B.; Evenepoel, P.; Vanholder, R.; Meijers, B.; Meert, N.; Fassbender, W.J.; et al. Serological cardiovascular and mortality risk predictors in dialysis patients receiving sevelamer: A prospective study. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. Eur. Ren. Assoc.* **2010**, *25*, 2672–2679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Guida, B.; Cataldi, M.; Riccio, E.; Grumetto, L.; Pota, A.; Borrelli, S.; Memoli, A.; Barbato, F.; Argentino, G.; Salerno, G.; et al. Plasma p-cresol lowering effect of sevelamer in peritoneal dialysis patients: Evidence from a cross-sectional observational study. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73558. [[CrossRef](#)]
23. Durantou, F.; Cohen, G.; De Smet, R.; Rodriguez, M.; Jankowski, J.; Vanholder, R.; Argiles, A.; European Uremic Toxin Work Group. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2012**, *23*, 1258–1270. [[CrossRef](#)]
24. Liabeuf, S.; Ryckelynck, J.-P.; El Esper, N.; Ureña, P.; Combe, C.; Dussol, B.; Fouque, D.; Vanhille, P.; Frimat, L.; Thervet, E.; et al. Randomized clinical trial of sevelamer carbonate on serum klotho and fibroblast growth factor 23 in CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **2017**, *12*, 1930–1940. [[CrossRef](#)]
25. Fallingborg, J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan. Med. Bull.* **1999**, *46*, 183–196.
26. Evans, D.F.; Pye, G.; Bramley, R.; Clark, A.G.; Dyson, T.J.; Hardcastle, J.D. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* **1988**, *29*, 1035–1041. [[CrossRef](#)]
27. Markopoulos, C.; Andreas, C.J.; Vertzoni, M.; Dressman, J.; Reppas, C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 173–182. [[CrossRef](#)]
28. Yang, Y.; Mohammad, A.; Berendt, R.T.; Carlin, A.; Khan, M.A.; Faustino, P.J. Evaluation of the in vitro efficacy of sevelamer hydrochloride and sevelamer carbonate. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 864–875. [[CrossRef](#)]

29. Chinnappa, S.; Tu, Y.-K.; Yeh, Y.C.; Glorieux, G.; Vanholder, R.; Mooney, A. Association between protein-bound uremic toxins and asymptomatic cardiac dysfunction in patients with chronic kidney disease. *Toxins* **2018**, *10*, 520. [CrossRef]
30. Phan, O.; Ivanovski, O.; Nguyen-Khoa, T.; Mothu, N.; Angulo, J.; Westenfeld, R.; Ketteler, M.; Meert, N.; Maizel, J.; Nikolov, I.G.; et al. Sevelamer prevents uremia-enhanced atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **2005**, *112*, 2875–2882. [CrossRef]
31. Lin, C.-J.; Pan, C.-F.; Chuang, C.-K.; Liu, H.-L.; Huang, S.-F.; Chen, H.-H.; Wu, C.-J. Effects of sevelamer hydrochloride on uremic toxins serum indoxyl sulfate and P-cresyl sulfate in hemodialysis patients. *J. Clin. Med. Res.* **2017**, *9*, 765–770. [CrossRef]
32. Riccio, E.; Sabbatini, M.; Bruzzese, D.; Grumetto, L.; Marchetiello, C.; Amicone, M.; Andreucci, M.; Guida, B.; Passaretti, D.; Russo, G.; et al. Plasma p-cresol lowering effect of sevelamer in non-dialysis CKD patients: Evidence from a randomized controlled trial. *Clin. Exp. Nephrol.* **2018**, *22*, 529–538. [CrossRef]
33. Vanholder, R.; Bammens, B.; de Loor, H.; Glorieux, G.; Meijers, B.; Schepers, E.; Massy, Z.; Evenepoel, P. Warning: The unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. Eur. Ren. Assoc.* **2011**, *26*, 1464–1467. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials: The Effect of Sevelamer on Serum Levels of Gut-Derived Uremic Toxins: Results from *in vitro* Experiments and A Multicenter, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial

Bennis Youssef, Cluet Yan, Titeca-Beauport Dimitri, El Esper Najeh, Pablo Ureña, Bodeau Sandra, Combe Christian, Dussol Bertrand, Fouque Denis, Choukroun Gabriel and Liabeuf Sophie

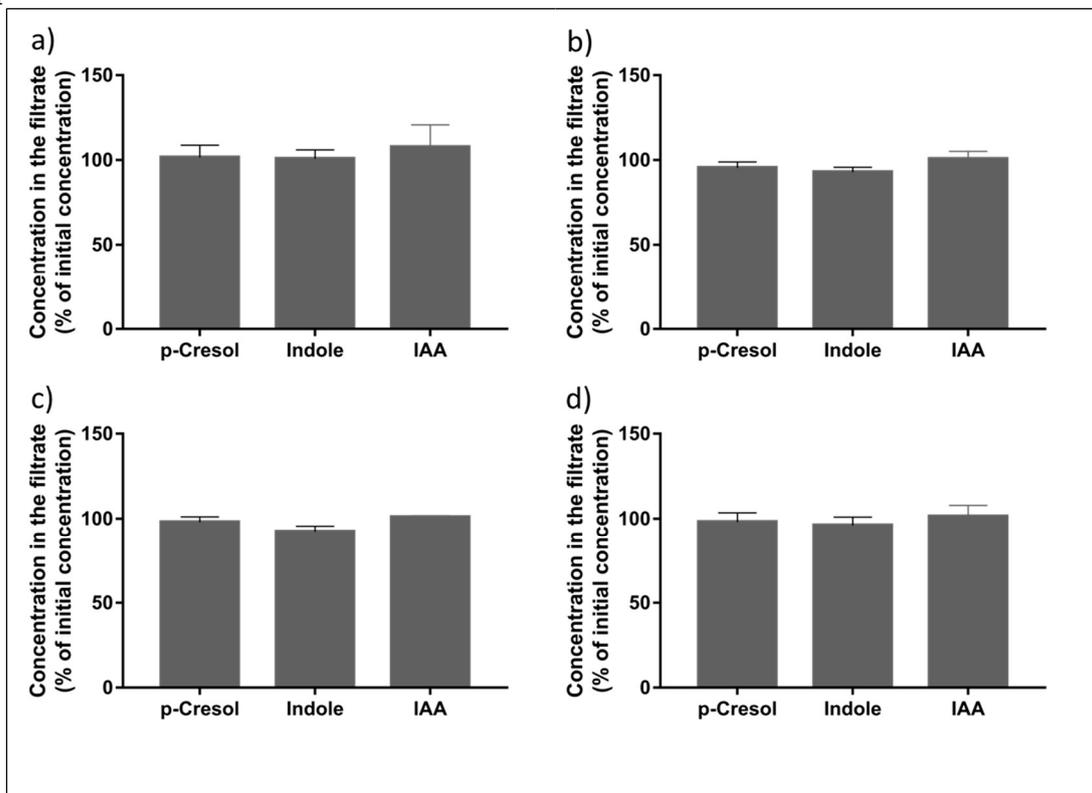


Figure S1. In the absence of sevelamer carbonate, the filter devices did not retain the toxins. The concentrations of indoxyl sulfate (IS) and p-cresyl sulfate (pCS) gut precursors (p-Cresol and Indole) and IAA in the filtrates were measured at pH 8 (a,b) and pH 6 (c,d) after centrifugation of samples, with initial concentrations of 1 µg/mL (a, c) and 10 µg/mL (b, d). Data are expressed as the mean ± SD value relative to the initial concentration (i.e. 100%) before centrifugation ($n = 3-4$). Abbreviation: IAA, indole acetic acid.

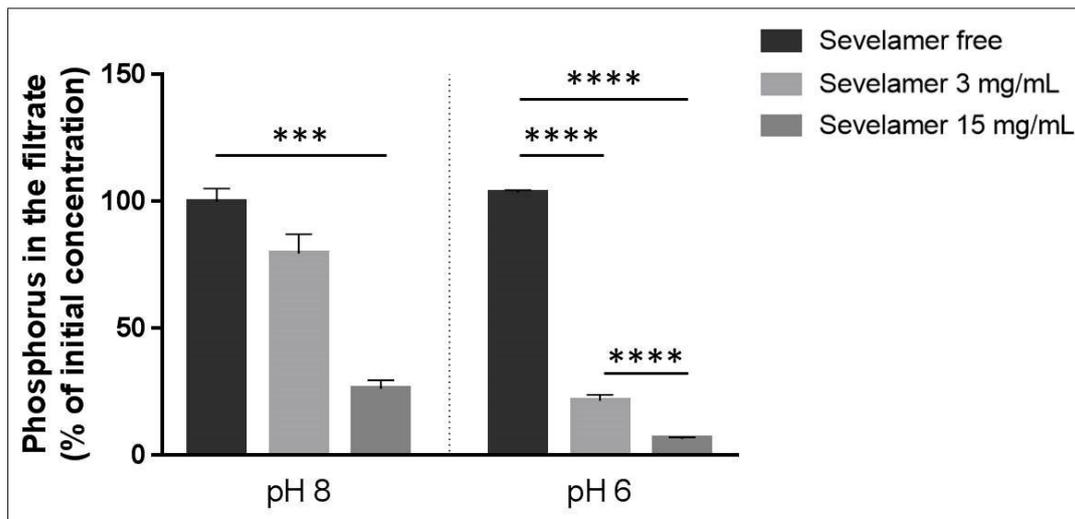


Figure S2. Sevelamer carbonate effectively adsorbs phosphorus. Phosphorus concentration in the filtrate after incubation with 0, 3 or 15 mg/mL sevelamer carbonate at pH 8 or 6. Data are expressed as the mean \pm SD, relative to the initial concentration before centrifugation ($n = 4-6$). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

CLUET Yan

Effet du carbonate de sevelamer sur certaines toxines urémiques issues du microbiote intestinal

Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie

Université de Picardie Jules Verne

2019

Mots clés: toxines urémiques, carbonate de sevelamer, maladie rénale chronique, insuffisance rénale chronique, chromatographie liquide haute performance

RESUME

L'augmentation des concentrations sériques en toxines urémiques (TU) d'origine intestinale telles que le p-crésyl sulfate (pCS), l'indoxyle sulfate (IS) et l'indole acide acétique (IAA) comme on peut le voir dans la maladie rénale chronique (MRC), est associée à une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire. Le sevelamer, chélateur de phosphates intestinaux utilisé dans la MRC à des stades avancés est également capable de diminuer les concentrations sériques en cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (LDL-cholestérol) par la chélation des acides biliaires. Certaines études pilotes suggèrent que le sevelamer serait capable de chélater les précurseurs des TU d'origine intestinale et ainsi d'en diminuer les concentrations sériques. L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer l'effet *in vitro* du carbonate de sevelamer sur les TU ainsi que sur leurs précurseurs et d'évaluer l'effet d'un traitement de 12 semaines par sevelamer *versus* placebo sur une population de 78 sujets en MRC de stades 3b et 4 sur leurs concentrations sériques en TU.

In vitro, aucun effet n'a été retrouvé sur l'indole et le p-crésol, les précurseurs des TU. Cependant l'IAA, le pCS et l'IS étaient chélatés par le carbonate de sevelamer à forte concentration. Par ailleurs, le carbonate de sevelamer n'avait pas d'effet sur les concentrations sériques de ces TU après 12 semaines de traitement chez des sujets en MRC de stades 3b et 4, bien qu'une tendance à la baisse était observée pour l'IAA.

JURY

Président : M. Gilles DUVERLIE – Pharmacien biologiste – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Directeur de thèse : Mme. Sophie LIABEUF-ESTEBANEZ – Pharmacien – Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Membres : M. Youssef BENNIS – Pharmacien biologiste – Maitre de Conférences des Universités –
Praticien Hospitalier

M. Bernard BABAUD – Médecin généraliste