

# Clinical Pharmacology Update

## Mise à jour en pharmacologie clinique

### Pharmacogenetics: It's not just about ivermectin in collies

#### Pharmacogénétique : Au-delà de l'ivermectin et des colleys

Patricia Dowling

**W**hen considering the use of macrocyclic lactones such as ivermectin or moxidectin in dogs, veterinarians have followed the adage, “white feet, don't treat.” This refers to the known sensitivity of Scotch collies (both rough and smooth) to neurotoxicity when administered these drugs at higher than label doses. But the adage has also been applied to many other herding breeds and has prevented veterinarians from using these drugs in situations where they would have been ideal. The neurotoxicity was attributed to a leaky “blood-brain barrier” in susceptible dogs. Recent developments in the molecular mechanisms of this phenomenon have opened a new frontier in the area of pharmacogenetics — drug disposition determined by the animal's genotype. So “white feet, don't treat” is no longer the practice standard; now it is “white feet, test to see if you can treat.”

This story started serendipitously in the 1990s with some genetically deficient mice. The mice were multidrug resistant (*mdr*) knockout mice. The *mdr* gene codes for a P-glycoprotein. Compared with wild-type mice, *mdr* knockout mice have altered central nervous system (CNS) penetration, enhanced oral absorption, and altered excretion (both urinary and biliary) of some P-glycoprotein substrate drugs. Thinking that this would cause some significant problems for the knockout mice, researchers were disappointed to find that the mice were healthy, fertile, and lived a normal life span. They had no abnormalities in anatomy, nor were there any abnormalities in any physiologic parameters. The researchers sadly concluded that under normal laboratory conditions, P-glycoprotein was not essential for basic functions. So the knockout mice languished in the laboratory, until the room they were housed in developed a mite infestation. Laboratory protocol for mite infestation included a topical spray of ivermectin. The next day, nearly all the knockout mice in the room were dead, but the wild-type mice were perfectly healthy. The knockout mice had brain concentrations of ivermectin 100 times higher than did the wild-type mice. This accidental discovery led the way to hundreds of studies on the role of the P-glycoprotein drug transporter system (1).

Recognizing that the collies and other herding breeds that were sensitive to ivermectin were similar to the *mdr* knockout mice, Dr. Katrina Mealey at Washington State University, College of Veterinary Medicine, demonstrated that a deletion

**L**orsque l'utilisation des lactones macrocycliques telles que l'ivermectin ou le moxidectin chez les chiens est envisagée, les vétérinaires se fient à l'adage «pieds blancs, pas de traitement». Ceci est en référence à la sensibilité connue des colleys écossais (aussi bien celui à poil court qu'à poil long) aux problèmes de neurotoxicité lorsque ces médicaments sont administrés à des doses plus élevées que celles recommandées. Cet adage a également été appliqué à plusieurs autres races de chien de troupeau et a empêché les vétérinaires d'utiliser ce médicament dans des situations où ils auraient été des médicaments de choix. Chez les chiens susceptibles, la neurotoxicité a été attribuée à une barrière hémato-méningée perméable. Des avancées récentes pour expliquer les mécanismes moléculaires de ce phénomène ont ouvert de nouveaux horizons dans le domaine de la pharmacogénétique — la disposition à un médicament déterminée par le génotype de l'animal. Donc, plutôt que l'approche «pieds blancs, pas de traitement» on opte pour l'approche «pieds blancs, testons pour vérifier si on peut traiter».

Cette histoire a débuté de manière fortuite dans les années 1990 avec des souris déficientes génétiquement. Ces souris avaient été rendues résistantes à plusieurs médicaments (*mdr*) par inactivation génique. Le gène *mdr* code pour une glycoprotéine-P. Comparativement aux souris de type sauvage, les souris au gène *mdr* inactivé présentent des altérations dans la pénétration au niveau du système nerveux central (CNS), une absorption orale augmentée, et une excrétion modifiée (autant urinaire que biliaire) de certains médicaments qui sont des substrats de la glycoprotéine-P. En croyant que ceci causerait des problèmes significatifs pour les souris génétiquement déficientes, les chercheurs furent déçus de trouver que les souris étaient en santé, fécondes et ont eu une durée de vie normale. Aucune anomalie ne fut notée au point de vue anatomique ou dans les paramètres physiologiques. Les chercheurs conclurent que, dans des conditions normales de laboratoire, la glycoprotéine-P n'était pas essentielle pour les fonctions de base. Ces souris génétiquement déficientes languirent dans le laboratoire jusqu'au jour où la pièce dans laquelle elles étaient logées fut infestée par des mites. Dans une telle situation, le protocole de laboratoire incluait une application topique par vaporisation d'ivermectin. Le jour suivant, presque toutes les souris génétiquement déficientes dans

---

Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, Saskatoon, Saskatchewan S7N 5B4.

---

Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, Saskatoon, Saskatchewan S7N 5B4.

mutation of the *mdr* gene was present in ivermectin-sensitive collies (2). The deletion mutation produces a frame shift that generates a premature stop codon in the *mdr* gene, resulting in a severely truncated, nonfunctional P-glycoprotein. P-glycoprotein is a large protein that functions as a transmembrane efflux pump; transporting chemicals from the inside the cell to outside the cell. It is normally expressed in the apical border of intestinal epithelial cells, brain capillary endothelial cells, biliary canalicular cells, renal proximal tubular epithelial cells, placenta, and testes. Adenosine triphosphate (ATP) hydrolysis provides the energy for active drug transport, so the transporter can function against steep concentration gradients. P-glycoprotein transports a wide variety of drugs with diverse chemical structures, including chemotherapy drugs, immunosuppressants, antiparasitic agents, HIV-1 protease inhibitors, and corticosteroids (Table 1). How the P-glycoprotein transporter can recognize and transport such structurally diverse compounds is not known. Whether or not a drug will be a P-glycoprotein substrate cannot be based simply on its chemical structure. Many P-glycoprotein substrates are natural compounds, or synthetic derivatives of natural compounds, so this seems to be an evolutionary advantage as a protective mechanism to decrease exposure to toxic xenobiotics. Microbial pathogens and cancer cells make use of it for drug resistance (3).

P-glycoprotein does not have intrinsic metabolic functions, but it is an important component of intestinal drug metabolism. Cytochrome P450 3A (CYP 3A) is the major phase 1 drug metabolizing enzyme family in mammals. Cytochrome P450 3A and P-glycoprotein are expressed at high levels in the villus tip of enterocytes in the gastrointestinal tract. They work in concert to prevent oral absorption of many drugs, as substrates of P-glycoprotein are often also substrates for CYP 3A. When a substrate drug is present in the intestinal tract, it is absorbed by passive processes into the enterocyte. Once inside the enterocyte, 3 things can happen: the drug may be metabolized by CYP 3A, the drug may enter the systemic circulation, or the drug may be extruded by P-glycoprotein back into the intestinal lumen, where it may enter another enterocyte at a more distal site along the digestive tract, thus allowing further access to CYP 3A. So non-P-glycoprotein substrate drugs pass through the enterocyte only once, while P-glycoprotein substrate drugs may continuously cycle between the enterocyte and the intestinal lumen, resulting in either repeated access of CYP 3A to the drug molecule or fecal excretion of the drug because of repeated P-glycoprotein efflux. Because so many drugs are substrates for both P-glycoprotein and CYP 3A, it is difficult to discern the individual contributions of each protein to reduced oral drug absorption.

The P-glycoprotein system can be knowingly manipulated. For example, ketoconazole inhibits P-glycoprotein efflux activity and CYP 3A metabolic activity; when administered concurrently with cyclosporin, it increases the oral bioavailability of cyclosporine. Concurrent administration of P-glycoprotein substrate drugs and inhibitor drugs must be done very carefully, or toxicity can occur. But this effect may be utilized for effective oral administration of drugs that normally would have poor bioavailability.

la pièce étaient mortes alors que les souris de type sauvage étaient en pleine forme. Les souris génétiquement déficientes avaient des concentrations d'ivermectin au cerveau qui étaient 100 fois supérieures à celles des souris de type sauvage. Cette découverte accidentelle a mené à des centaines d'études sur le rôle de la glycoprotéine-P comme transporteur de médicaments (1).

Reconnaissant que les colleys et autres races de chien de troupeau qui étaient sensibles à l'ivermectin semblaient similaires aux souris génétiquement déficientes, la D<sup>re</sup> Katrina Mealey du *College of Veterinary Medicine* de *Washington State University* a démontré qu'une mutation par délétion du gène *mdr* était présente chez les colleys sensibles à l'ivermectin (2). La mutation par délétion entraîna une mutation de changement de phase qui généra un codon stop prématuré dans le gène *mdr* ce qui résulta en une glycoprotéine-P sévèrement tronquée non fonctionnelle.

La glycoprotéine-P est une grosse protéine qui fonctionne comme une pompe à efflux transmembranaire transportant des molécules de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur. Elle est normalement rencontrée à la bordure apicale des cellules épithéliales de l'intestin, chez les cellules endothéliales des capillaires du cerveau, les cellules des canalicules biliaires, les cellules épithéliales des tubules rénaux proximaux, du placenta et des testicules. L'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) fournit l'énergie nécessaire pour le transport actif des drogues permettant ainsi au transporteur de fonctionner malgré un fort gradient de concentration. La glycoprotéine-P transporte un large éventail de drogues possédant des structures chimiques diverses, telles que des agents de chimiothérapie, des immunosuppresseurs, des antiparasitaires, des inhibiteurs de protéase du HIV-1 et des corticostéroïdes (Tableau 1). On ignore comment la glycoprotéine-P peut reconnaître et transporter une telle diversité de produits ayant des structures chimiques différentes. La seule structure chimique d'une substance ne permet pas de dire si un composé sera ou non un substrat de la glycoprotéine-P. Étant donné que plusieurs substrats de la glycoprotéine-P sont des composés naturels ou des dérivés synthétiques de composés naturels, on peut penser qu'il s'agirait d'un avantage évolutif agissant comme un mécanisme de protection pour réduire les risques d'exposition à des produits xénobiotiques toxiques. Les agents pathogènes microbiens et les cellules cancéreuses font usage de ce mécanisme pour résister à certaines drogues (3).

La glycoprotéine-P ne possède pas de fonction métabolique intrinsèque mais est une composante importante du métabolisme des drogues au niveau intestinal. Chez les mammifères, le cytochrome P450 3A (CYP 3A) est la principale famille d'enzyme pour métaboliser les drogues. Le cytochrome P450 3A et la glycoprotéine-P sont exprimés en grande quantité chez les entérocytes de l'extrémité des villosités du tractus intestinal. Étant donné que les substrats de la glycoprotéine-P sont souvent des substrats de CYP 3A, ils agissent conjointement afin de prévenir l'absorption orale de plusieurs drogues. Lorsqu'une drogue est présente dans le tractus intestinal elle est absorbée de manière passive dans les entérocytes. Une fois à l'intérieur, trois possibilités existent : la drogue peut être métabolisée par CYP 3A, la drogue peut atteindre la circulation systémique, ou la drogue peut être rejetée dans la lumière intestinale par la glycoprotéine-P où elle pourra être internalisée par un autre entérocyte situé en aval dans le tractus digestif et avoir la possibilité de venir de

**Table/Tableau 1.** Currently known P-glycoprotein substrate drugs/Substrats médicamenteux connus de la glycoprotéine-P

Chemotherapeutics Agents chimiothérapeutiques	Cardiac Drugs Médicaments cardiaques
Doxorubicin Doxorubicine	Digoxin
Mitoxantrone	Diltiazem
Mitoxantrone	Diltiazem
Paclitaxel	Losartan
Paclitaxel	Losartan
Vinblastine	Quinidine
Vinblastine	Quinidine
Vincristine	Verapamil
Vincristine	Verapamil
Antimicrobials/Antifungals Antimicrobiens/Antifongiques	Steroids Stéroïdes
Doxycycline	Aldosterone
Doxycycline	Aldosterone
Erythromycin	Cortisol
Erythromycine	Cortisol
Itraconazole	Dexamethasone
Itraconazole	Dexaméthasone
Ketoconazole	Estradiol
Kétoconazole	Estradiol
Rifampin	Hydrocortisone
Rifampin	Hydrocortisone
Tetracycline	Methylprednisolone
Tétracycline	Méthylprednisolone
Immunosuppressants Agents immunosuppresseurs	Miscellaneous Divers
Cyclosporin A	Amitriptyline
Cyclosporin A	Amitriptyline
Tacrolimus	Butorphanol
Tacrolimus	Butorphanol
Antiemetics Antiémétiques	Ivermectin
Domperidone	Ivermectin
Domperidone	Morphine
Ondansetron	Morphine
Ondansetron	Moxidectin
H1-antihistamines Anti-histaminiques H1	Moxidectin
Fexofenadine	Phenothiazines Phénothiazines
Fexofenadine	Phénytoin
Terfenadine	Phénytoin
Terfenadine	Selamectin
H2-antihistamines/Antihistaminiques H2	Selamectin
Cimetidine/Ciméditine	
Ranitidine/Ranitidine	

P-glycoprotein is also expressed on renal tubular cells and bile canalicular cells. It appears to play a role in drug excretion. Decreased renal or biliary excretion may be involved in the susceptibility of collies and related breeds to toxicity from chemotherapy drugs, such as doxorubicin and vincristine, and digoxin (4,5).

The blood-brain barrier limits the passage of drugs into the CNS. P-glycoprotein is normally expressed on brain capillary endothelial cells and functions as part of the blood-brain barrier to pump drugs out of the CNS. Dogs with the gene deletion have increased brain concentrations of drugs including ivermectin, moxidectin, loperamide, and corticosteroids. Once the gene defect was understood, a retrospective study from the Illinois Poison Control Center revealed that collies were over represented for cases of loperamide CNS toxicity when given “normal” doses (6). In normal dogs, loperamide does not cross the blood-brain barrier and even in heterozygote dogs, normal doses of loperamide do not cause toxicity. The blood-brain

**Table/Tableau 2.** Breeds Known to Have the MDR-1 Gene Deletion/Races reconnues pour avoir la déficience du gène MDR-1

Australian shepherds/Berger australien
Miniature Australian shepherds/Berger australien miniature
Collies/Colley
English shepherds/Berger anglais
Longhaired whippets/Whippet à poil long
McNabs/McNab
Old English sheepdogs/Berger anglais ancestral
Shetland sheepdogs/Berger de Shetland
Silken windhounds/Silken windhound
White German shepherd dogs/Berger blanc suisse

nouveau en contact avec CYP 3A. Ainsi, les drogues n'étant pas des substrats pour la glycoprotéine-P ne passe qu'une seule fois dans les entérocytes, alors que les drogues qui sont des substrats pour la glycoprotéine-P peuvent être continuellement véhiculées entre les entérocytes et la lumière intestinale. Ceci résulte soit en un accès répété de CYP 3A à la drogue ou à l'excrétion fécale de la drogue due à l'efflux répété par la glycoprotéine-P. Étant donné que plusieurs drogues sont des substrats pour la glycoprotéine-P et le CYP 3A, il est difficile d'établir la contribution individuelle de chaque protéine à la réduction de l'absorption orale de drogue.

Le système de transport par la glycoprotéine-P peut être sciemment manipulé. Par exemple, le kétoconazole inhibe l'activité d'efflux de la glycoprotéine-P et l'activité métabolique de CYP 3A; lorsque administré de façon concourante avec la cyclosporine, il augmente la biodisponibilité orale de cette dernière. L'administration concourante de drogues qui sont des substrats pour la glycoprotéine-P et de médicaments inhibiteurs doit se faire de façon prudente car une toxicité peut survenir. Toutefois, cet effet peut être utilisé pour une administration orale efficace de médicaments qui autrement auraient une faible biodisponibilité.

La glycoprotéine-P est également présente chez les cellules des tubules rénaux et des cellules des canalicules biliaires où elle semble jouer un rôle dans l'excrétion de drogues. Une excrétion rénale ou biliaire diminuée pourrait être impliquée dans la susceptibilité des colleys et autres races de chiens de troupeau à une toxicité aux médicaments pour la chimiothérapie, tels que la doxorubicine et la vincristine, ainsi que la digoxine (4,5).

La barrière hémato-méningée limite le passage de médicaments dans le CNS. La glycoprotéine-P est normalement exprimée sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins du cerveau et fonctionne comme une composante de la barrière hémato-méningée pour expulser des drogues du CNS. Des chiens ayant une délétion du gène ont des concentrations augmentées de drogues telles que ivermectin, moxidectin, loperamide et corticostéroïdes. Lorsque le défaut génétique fut élucidé, une étude rétrospective effectuée par le «*Illinois Poison Control Center*» a révélé que les colleys étaient surreprésentés dans les cas de toxicité du CNS associé au loperamide administré à un dosage normal (6). Chez les chiens normaux, le loperamide ne traverse pas la barrière hémato-méningée et même chez les chiens hétérozygotes, une dose normale de loperamide ne cause pas de toxicité. La barrière hémato-méningée de chiens homozygotes est également plus perméable aux hormones stéroïdiennes exogènes et endogènes. Les colleys sont souvent considérés comme des chiens peu avantagés et il y a des évidences que les chiens homozygotes présentent une suppression continue de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

barrier of homozygous dogs is also more permeable to exogenous and endogenous steroid hormones. Collies are often considered to be "poor doers" and there is evidence that homozygous dogs have continuous suppression of the hypothalamic-pituitary axis. According to Dr. Mealey, such "atypical Addisonian" dogs require exogenous corticosteroid supplementation when stressed or ill.

Genetic studies have documented the *mdr* gene deletion in 10 breeds (7) (Table 2). The gene deletion is widespread in collies, with 30% being homozygous and 40% being heterozygous. Its frequency is much lower in other herding breeds of collie lineage, such as the Shetland sheepdog (8.4% of dogs tested carried the mutation), Old English sheepdog (3.6%), and Australian sheepdog (16.6%). Because of different lineage, the gene deletion has not been found in Border collies, bearded collies, or Australian cattle dogs. The deletion also occurs in 2 sighthound breeds, the longhaired whippet and the silken windhound, with suspicion that the mutation was introduced with Shetland sheepdog crosses. It has also been identified recently in white German shepherd dogs. Dogs that are homozygous for the gene deletion readily show adverse effects from ivermectin and other P-glycoprotein substrate drugs at dosages that cause no adverse effects in normal dogs. Heterozygote dogs may show toxicity at increased doses of substrate drugs, such as daily ivermectin administration for the treatment of demodocosis. Rather than avoiding the use of ivermectin and other P-glycoprotein substrate drugs in collies and other affected breeds, the genotype of a dog can be determined before treatment. A

Selon la D<sup>re</sup> Mealey, ces chiens présentant un syndrome d'Addison atypique nécessitent un apport supplémentaire de corticostéroïde exogène lorsqu'ils sont stressés ou malades.

Des études génétiques ont documenté la délétion dans le gène *mdr* chez 10 races (7) (Tableau 2). La délétion génétique est répandue chez les colleys, avec 30 % étant homozygote et 40 % étant hétérozygote. La fréquence est beaucoup plus faible chez les autres races de chien de troupeau de lignée colley, telles que le berger de Shetland (8,4 % des chiens éprouvés étaient porteurs de la mutation), le berger anglais (3,6 %) et le chien de berger australien (16,6 %). À cause de différentes lignées, la délétion génétique n'a pas été retrouvée chez les Border colleys, les colleys barbus ou les bouviers australiens. La délétion se rencontre également chez deux races de lévriers, le whippet à poil long et le Silken windhound, et il est soupçonné que la mutation a été introduite suite à des croisements avec des chiens bergers de Shetland. On l'a également identifié récemment chez le Berger allemand. Les chiens qui sont homozygotes pour la délétion génétique démontrent rapidement les effets d'une réaction indésirable à l'ivermectin et autres substrats médicamenteux de la glycoprotéine-P à des dosages qui ne causent pas de réaction indésirable chez les chiens normaux. Les chiens hétérozygotes peuvent montrer une toxicité lors d'une administration de doses plus élevées de substrats médicamenteux, telle qu'une administration quotidienne d'ivermectin pour le traitement d'une infection par *Demodex*. Plutôt que d'éviter l'utilisation d'ivermectin et autres substrats médicamenteux de la P-glycoprotéine chez les colleys et autres races affectées, le génotype d'un chien peut être déterminé avant le traitement. Un simple écouvillonnage de

simple cheek swab is all that is required and samples can be sent to:

Dr. Katrina Mealey  
Veterinary Clinical Pharmacology Laboratory  
College of Veterinary Medicine  
Washington State University, Pullman, WA 99164-6610  
(509) 335-2988 (phone)  
(509) 335-0880 (fax)  
www.vetmed.wsu.edu/depts-vcpl

## References

- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77:491-502.
- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001;11:727-733.
- Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* 2004;27:257-264.
- Henik RA, Kellum HB, Bentjen SA, Mealey KL. Digoxin and mexiletine sensitivity in a Collie with the MDR1 mutation. *J Vet Intern Med* 2006;20:415-417.
- Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *J Am Vet Med Assoc* 2003;223:1453-1455, 1434.
- Hugnet C, Cadore JL, Buronfosse F, et al. Loperamide poisoning in the dog. *Vet Hum Toxicol* 1996;38(1):31-33.
- Neff MW, Robertson KR, Wong AK, et al. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Delta*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11725-11730. ■

l'intérieur de la joue est tout ce qui est nécessaire et les échantillons peuvent être acheminés à :

D<sup>re</sup> Katrina Mealey  
Veterinary Clinical Pharmacology Laboratory  
College of Veterinary Medicine  
Washington State University, Pullman, WA 99164-6610  
(509) 335-2988 (téléphone)  
(509) 335-0880 (télécopieur)  
www.vetmed.wsu.edu/depts-vcpl

Traduit par D<sup>r</sup> Serge Messier

## Renvois

- SCHINKEL, A.H., J.J. SMIT, O. VAN TELLIGEN et al. «Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs», *Cell*, 1994, vol. 77, p. 491-502.
- MEALEY, K.L., S.A. BENTJEN, J.M. GAY ET G.H. CANTOR. «Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene», *Pharmacogenetics*, 2001, vol. 11, p. 727-733.
- MEALEY, K.L. «Therapeutic implications of the MDR-1 gene», *J Vet Pharmacol Ther*, 2004, vol. 27, p. 257-264.
- HENIK, R.A., H.B. KELLUM, S.A. BENTJEN et K.L. MEALEY. «Digoxin and mexiletine sensitivity in a Collie with the MDR1 mutation», *J Vet Intern Med*, 2006, vol. 20, p. 415-417.
- MEALEY, K.L., N.C. NORTHRUP et S.A. BENTJEN. «Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity», *J Am Vet Med Assoc*, 2003, vol. 223, p. 1453-1455, 1434.
- HUGNET, C., J.L. CADORE, F. BURONFOSSE et al. «Loperamide poisoning in the dog», *Vet Hum Toxicol*, 1996, vol. 38, no 1, p. 31-33.
- NEFF, M.W., K.R. ROBERTSON, A.K. WONG et al. «Breed distribution and history of canine *mdr1-1Delta*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage», *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, vol. 101, p. 11725-11730. ■