

Université de Montréal

**Influence du statut calcique et en vitamine D sur l'homéostasie calcique.
Répercussion sur le calcium intracellulaire et sur l'os.**

par

Geneviève Mailhot

Département de nutrition

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

En Nutrition

Juillet 2003

©Geneviève Mailhot, 2003



QU
145
U58
2004
V.002

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

SOMMAIRE

Dans notre société canadienne, la déficience marginale en vitamine D (D) est particulièrement prévalente durant les mois d'hiver où les heures d'ensoleillement sont réduites. En réponse à cet état de déficience, certains sous-groupes peuvent développer une hypocalcémie chronique (D-Ca-) ainsi qu'une hyperparathyroïdie secondaire, ce qui peut subséquemment affecter la réalisation de multiples fonctions biologiques. Ces travaux de doctorat ont pour but général de vérifier l'impact du statut nutritionnel en calcium et en D sur l'homéostasie cellulaire de calcium et sur le métabolisme osseux. A l'aide d'un modèle animal de déficience nutritionnelle en D et en calcium, nous avons montré au sein de deux types cellulaires distincts, l'hépatocyte et l'ostéoblaste, qu'un état D-Ca- est associé à une altération de plusieurs paramètres de la voie de signalisation calcique. De plus, il a été démontré que la correction de l'hypocalcémie chronique par une supplémentation de calcium alimentaire permet de normaliser partiellement, et selon une cinétique de réplétion graduelle, les perturbations de l'homéostasie calcique cellulaire initiées par l'hypocalcémie. L'emploi d'une forte dose de calcium alimentaire administrée dans le but de corriger l'hypocalcémie entraîne néanmoins certaines perturbations au sein du métabolisme osseux. Ainsi, ce mode de réplétion calcique normalise la calcémie et la calciurie, corrige l'hyperparathyroïdie secondaire mais entraîne parallèlement une hypophosphatémie et l'apparition d'un rachitisme qui perturbe la réplétion calcique normale des réserves osseuses, ce qui affecte subséquemment la résistance des animaux dans une situation de privation calcique. En effet, la réintroduction rapide de la diète initiale déficiente en calcium entraîne le décès de la totalité des animaux supplémentés avec une forte dose de calcium alimentaire après seulement trois à cinq jours. L'emploi d'une plus faible dose de calcium alimentaire ou encore l'ajout de D_3 ou de $1,25(OH)_2D_3$ prévient l'apparition du rachitisme, entraîne une meilleure réplétion des réserves osseuses et permet la survie des animaux à long terme. Ainsi, ces travaux nous ont permis de démontrer que la correction complète d'un état D-Ca- nécessite une combinaison optimale des apports nutritionnels de calcium, de phosphore et de D. L'observation initiale que les femelles D-Ca- peuvent mener à terme une gestation et allaiter et qu'elles présentent une meilleure survie lors de l'instauration initiale d'un état D-Ca- nous laisse présumer qu'outre le statut calcique extracellulaire et le statut nutritionnel en D, le statut hormonal sexuel est aussi un élément qui exerce une influence sur l'homéostasie calcique. Ainsi, lorsque soumises à un protocole

de réplétion calcique, 1) la croissance des femelles n'est pas stimulée, 2) elles présentent une hypophosphatémie moins sévère que les mâles suivant les trois premiers jours et 3) elles démontrent une meilleure accréation minérale osseuse. De plus, on observe une survie globale supérieure chez les femelles durant la phase de redéplétion calcique. Ces résultats soulignent l'influence soit des hormones sexuelles ou d'autres facteurs, sur le métabolisme phosphocalcique et osseux. L'accroissement de l'apport calcique dans le but de corriger l'hypocalcémie chronique permet de mieux répondre aux besoins calciques et phosphatémiques de la femelle D-Ca-. Ainsi, les réserves osseuses sont adéquatement réplétées pour subvenir aux besoins de l'organisme en période de privation ou encore lorsque les besoins sont accrus. Ces travaux nous permettent ainsi de conclure que le statut calcique extracellulaire de même que le système endocrinien de la vitamine D sont des régulateurs importants et interdépendants du métabolisme calcique cellulaire et de l'homéostasie osseuse. Toutefois, ils interagissent de concert avec plusieurs autres facteurs modulant ces deux systèmes

Mots-clés : Déficience nutritionnelle en vitamine D, hypocalcémie chronique, calcium intracellulaire, signalisation calcique, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, supplémentation de calcium, supplémentation de vitamine D, rachitisme, densitométrie osseuse.

ABSTRACT

Vitamin D (D) deficiency is particularly prevalent among Canadian populations during the short days of the winter season when sunlight exposure is dramatically reduced. Certain subgroups of the general population might be at higher risk to develop chronic hypocalcemia (D-Ca-) and secondary hyperparathyroidism, two manifestations linked to D deficiency that may lead to alterations of several biological functions. It has been previously shown that chronic hypocalcemia related to D deficiency is associated with perturbations of calcium-dependent functions. These experiments were aimed to investigate the role of extracellular calcium status and D endocrine system on the intracellular calcium homeostasis and bone metabolism using an animal model of chronic hypocalcemia secondary to nutritional D deficiency. Previous studies in hepatocytes, have demonstrated D-Ca- is associated with perturbations of cellular calcium homeostasis. All these alterations have been shown to completely reverse upon dietary calcium supplementation with gradual kinetics of repletion. Similar findings were found in cultured osteoblasts obtained from hypocalcemic and normocalcemic animals as well as in the osteoblastic cell line *ROS 17/2.8*. This suggests that cellular calcium homeostasis is strongly influenced by changes in extracellular calcium status. Furthermore, we investigated the long term effects of; a) high (Ca^{+3}), b) low ($\text{Ca}^{+0.5}$) calcium supplementation, c) D_3 and d) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on calcium and bone metabolism using a repletion-redepletion protocol as experimental paradigm. All repletion protocols, except $\text{Ca}^{+0.5}$, normalized serum (Se) Ca^{2+} , parathyroid hormone (PTH) and urinary calcium concentrations however Ca^{+3} rats exhibited growth retardation and hypophosphatemia. Upon reintroduction of the initial calcium deficient diet, Se calcium rapidly fell in Ca^{+3} treated rats and all died from hypocalcemic tetany within three to five days of redepletion. Investigation of bone metabolism in this group revealed an impairment in bone mineral accretion and development of rickets most likely occurring secondary to hypophosphatemia. It is postulated that the incapacity of the bone Ca^{2+} reservoir to provide sufficient calcium to sustain Se Ca^{2+} during calcium deprivation may be the cause of death in these animals. The use of D_3 or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ improves bone mineral accretion and prevents the apparition of rickets leading to complete survival of the animals upon redepletion. We finally concluded that sex hormonal status might be an additional factor affecting calcium homeostasis regulation. Following preliminary observations that D-Ca- females were more resistant to the initial instauration of a D deficiency state than

males and were still capable of becoming pregnant, carrying, delivering and lactating pups, we compared the influence of high calcium repletion on calcium and phosphate homeostasis and on bone metabolism using the repletion/redepletion protocol. Both sexes exhibited similar normalization of circulating calcium levels but females were less severely hypophosphatemic than males after three days of repletion although they reached male values after seven days of repletion. Upon calcium supplementation, Ca^{+3} females demonstrated a lack of growth stimulation over D-Ca- females and showed better survival than males following reintroduction of the initial calcium deficient diet. These results underlie that correction of D-Ca- in females by dietary calcium alone met calcium and phosphate needs better in females than males which helped them maintain normal bone metabolism. Bone reservoir is thus able to provide calcium to sustain calcium requirements during a period of calcium deprivation or increasing demands. We conclude that extracellular calcium status and D endocrine system are, along with other factors, important and interrelated regulators of the cellular calcium signaling pathway and bone homeostasis.

Keywords : D deficiency, chronic hypocalcemia, intracellular calcium, calcium signaling pathway, $1,25(OH)_2D_3$, calcium supplementation, D_3 supplementation, rickets, bone densitometry.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xviii
REMERCIEMENTS	xix
DEDICACE	xx
CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
1.1. <i>PHYSIOLOGIE DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE</i>	1
GÉNÉRALITÉS	1
RÉGULATION DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE	2
<i>I-Régulation hormonale</i>	2
1. <i>Parathormone</i>	2
2. <i>PTH-related protein</i>	5
3. <i>1.25(OH)₂D</i>	6
4. <i>Calcitonine</i>	6
5. <i>Autres hormones</i>	7
a) <i>Prolactine</i>	7
b) <i>Estrogènes</i>	7
<i>II- Le récepteur à calcium</i>	8
<i>Description, localisation et fonctions physiologiques</i>	8
FONCTIONS DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE	10
1.2. <i>PHYSIOLOGIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE</i>	11
GÉNÉRALITÉS	11
COMPARTIMENTS CELLULAIRES DE CALCIUM	12
<i>I-Membrane plasmique</i>	12

1. Mécanismes qui contrôlent la sortie de calcium de la cellule	12
2. Mécanismes qui contrôlent l'entrée de calcium dans la cellule	13
a) Canaux voltage-dépendants (VOC)	14
b) Canaux voltage-indépendants	14
i) Les canaux modulés par la liaison d'un ligand extracellulaire ou par la production de signaux intracellulaires	14
ii) Les canaux activés lors de la déplétion des réserves intracellulaires de calcium ou entrée capacitative de calcium	15
iii) Entrée non-capacitative de calcium.....	16
iv) Les autres types de canaux : stretch-activated calcium channels, échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ inversé et autres canaux cationiques ...	16
3. Protéines membranaires de liaison du calcium	17
II- Cytoplasme	18
III- Organelles	18
1. Le réticulum endoplasmique et sarcoplasmique	18
a) Récepteurs couplés à l' IP_3 et les récepteurs à la ryanodine... ..	19
b) Sphingosine-1 phosphate (S-1-P)	20
c) Adénosine diphosphate ribose cyclique (ADPR _c).....	21
d) Coexistence de ces messagers au sein d'une même cellule ...	22
e) Pompe Ca^{2+} ATPase de la membrane du RE (SERCA)	22
f) Protéines de liaison du calcium	23
2. La mitochondrie	25
3. Le noyau	26
4. L'appareil de Golgi	28
5. Les organelles acidiques : les vésicules sécrétoires	28
LES FONCTIONS DU CALCIUM INTRACELLULAIRE : LE RÔLE DE SECOND MESSAGER CELLULAIRE	29
Le concept de signalisation calcique intracellulaire	29
1. Voies d'activation	31
a) La dépolarisation membranaire	31
b) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	31

2. Réponses calciques intracellulaires	32
3. Fin du signal calcique	34
L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE AU SEIN DU FOIE	36
<i>I- Le système cellulaire hépatique</i>	36
<i>II- La voie de signalisation du calcium intracellulaire et fonctions physiologiques associées</i>	38
L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE AU SEIN DE L'OS ET DU CARTILAGE	40
<i>I- Ostéoblastes</i>	40
<i>II- Ostéoclastes</i>	41
<i>III- Chondrocytes du cartilage de la plaque de croissance</i>	41
L'IMPLICATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE DANS LA SANTÉ HUMAINE : PERTURBATIONS DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE ...	42
<i>I- Perturbations de l'homéostasie du calcium : l'hypocalcémie chronique</i>	42
1. Causes de l'hypocalcémie chronique	42
2. Conséquences de l'hypocalcémie chronique	46
a) Système nerveux central	46
b) Système cardiovasculaire	46
c) Système reproducteur	46
d) Système endocrinien	47
e) Métabolisme osseux	47
i) Maladies osseuses métaboliques	47
<i>Le cas particulier du prématuré</i>	48
ii) Paramètres biomécaniques	50
iii) Paramètres histologiques	50
1.3 LE SYSTÈME ENDOCRINIEN DE LA VITAMINE D	51
GÉNÉRALITÉS	51
MÉTABOLISME GÉNÉRAL	51
<i>I- Synthèse cutanée et apport exogène de vitamine D</i>	51

<i>II- Hydroxylation en C-25</i>	52
<i>III- Hydroxylation en C-1α</i>	53
<i>IV- Hydroxylation en C-24</i>	54
<i>V- Excrétion</i>	55
MODES D'ACTION	55
<i>I- Récepteur nucléaire de la vitamine D</i>	55
<i>II- Récepteur membranaire de la vitamine D</i>	57
<i>Interrelation avec le calcium intracellulaire</i>	58
<i>Récepteur membranaire de la 24,25(OH)$_2$D</i>	59
<i>III- Fonctions traditionnelles</i>	59
1. <i>Effets sur l'intestin</i>	60
2. <i>Effets sur le rein</i>	61
3. <i>Effets sur l'os</i>	62
a) <i>Rôle dans le maintien de la calcémie</i>	62
b) <i>Rôle au sein de la physiologie osseuse</i>	63
i) <i>Minéralisation osseuse</i>	63
ii) <i>Fonctions cellulaires</i>	64
<i>IV- Fonctions non-traditionnelles</i>	65
1. <i>Effets sur la croissance, la réparation et la mort cellulaire</i>	65
2. <i>Effets sur le système endocrinien</i>	67
3. <i>Effets sur le système immunitaire</i>	67
4. <i>Effets sur le système nerveux central</i>	67
5. <i>Effets sur le système reproducteur</i>	68
6. <i>Effets sur le système musculaire</i>	68
ALTÉRATIONS DE L'HOMÉOSTASIE DU SYSTÈME ENDOCRINIEN DE LA VITAMINE D	69
<i>I- Chez l'homme</i>	69
1. <i>Déficiences nutritionnelles en vitamine D</i>	69
2. <i>Déficiences d'origine génétique</i>	70
<i>II- Chez l'animal</i>	71
1.4 PHYSIOLOGIE DU PHOSPHORE	72
GÉNÉRALITÉS	72

1.5 PHYSIOLOGIE DE L'OS	74
DESCRIPTION GÉNÉRALE	74
<i>I- Description macroscopique et microscopique</i>	74
<i>II- Le cartilage de la plaque de croissance et les populations cellulaires de l'os</i>	78
1. <i>Le cartilage de la plaque de croissance</i>	78
2. <i>Populations cellulaires de l'os</i>	78
a) <i>Les ostéocytes</i>	78
b) <i>Les cellules situées à la surface de l'os (bone lining cells)</i>	79
RÉGULATION DU MÉTABOLISME OSSEUX	79
<i>I- Régulation hormonale</i>	81
1. <i>Hormones calciotropiques</i>	81
2. <i>Hormones sexuelles</i>	81
<i>Interrelation avec le statut calcique</i>	83
<i>II- Autres facteurs régulateurs : cytokines, facteurs de croissance et autres</i> ..	83
<i>III- Régulation nutritionnelle</i>	84
1. <i>Rôle du calcium et du phosphore</i>	84
a) <i>Calcium</i>	84
b) <i>Phosphore</i>	86
2. <i>Rôles des métabolites de la vitamine D</i>	86
3. <i>Autres éléments nutritifs impliqués</i>	88
a) <i>Vitamines</i>	88
i) <i>Vitamine A</i>	88
ii) <i>Vitamine C</i>	89
iii) <i>Vitamine K</i>	89
b) <i>Minéraux, oligo-éléments et électrolytes</i>	90
i) <i>Magnésium</i>	90
ii) <i>Fluor</i>	91
iii) <i>Zinc</i>	92
iv) <i>Cuivre</i>	92
v) <i>Sodium</i>	93
c) <i>Macroéléments</i>	93
i) <i>Protéines</i>	93
d) <i>Autres éléments et nutraceutiques : phytoestrogènes</i>	94
 CHAPITRE 2. TRAVAUX DE RECHERCHE	 96
HYPOTHÈSE EXPÉRIMENTALE	96
OBJECTIFS GÉNÉRAUX	96

2.1 PREMIER VOLET : INFLUENCE DU STATUT CALCIQUE IN VIVO ET IN VITRO SUR L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE 97

HYPOTHÈSE SPÉCIFIQUE	97
BUT	97
PRÉMISSSES	97
ARTICLE 1	99
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	143

I- Influence de l'hypocalcémie chronique sur la cinétique de réplétion et redéplétion calcique de l'hépatocyte 143

1. Cinétique de réplétion calcique 143

<i>a) Hypothèse spécifique</i>	<i>143</i>
<i>b) But</i>	<i>143</i>
<i>c) Prémisses</i>	<i>143</i>
<i>d) Matériel et Méthodes</i>	<i>144</i>
<i>e) Résultats</i>	<i>145</i>

<i>i) Paramètres sériques</i>	<i>145</i>
<i>ii) Évolution de la calcémie</i>	<i>147</i>
<i>iii) Concentration cytoplasmique basale de calcium</i>	<i>150</i>
<i>iv) Mobilisation des réserves calciques IP₃-dépendantes par la phényléphrine</i>	<i>150</i>
<i>v) Expression génique de la calréticuline dans le foie entier</i>	<i>154</i>

f) Discussion

2. Cinétique de redéplétion calcique 159

<i>a) Hypothèse spécifique</i>	<i>159</i>
<i>b) But</i>	<i>159</i>
<i>c) Prémisses</i>	<i>159</i>
<i>d) Matériel et Méthodes</i>	<i>159</i>
<i>e) Résultats</i>	<i>162</i>
<i>i) Statut calcique extracellulaire</i>	<i>162</i>
<i>ii) Concentration cytoplasmique basale de calcium</i>	<i>162</i>
<i>iii) Mobilisation des réserves calciques IP₃-dépendantes par la phényléphrine</i>	<i>167</i>
<i>iv) Contenu calcique des réserves cellulaires d'hépatocytes perméabilisés</i>	<i>167</i>
<i>f) Discussion.....</i>	<i>171</i>

II- Influence du statut calcique extracellulaire sur l'homéostasie cellulaire calcique de l'ostéoblaste	175
1. Hypothèse spécifique	175
2. But	175
3. Prémisses	175
4. Matériel et Méthodes	175
a) Culture cellulaire	175
i) Ostéoblastes isolés de tibia de rat	175
ii) Lignée cellulaire ostéoblastique ROS 17/2.8	176
b) Paramètres mesurés	176
5. Résultats	179
a) Cellules ROS 17/2.8	179
i) Influence extracellulaire sur la concentration cytoplasmique basale de calcium	179
ii) Influence extracellulaire sur la mobilisation des réserves calciques cellulaires par la 1,25(OH) ₂ D ₃ et l'ionomycine	179
b) Ostéoblastes en culture primaire	183
Influence extracellulaire sur la concentration cytoplasmique basale de calcium	183
ii) Influence extracellulaire sur la mobilisation des réserves IP ₃ -dépendantes par la bradykinine	183
6. Discussion	187
2.2. DEUXIÈME VOLET : PERSISTANCE DES EFFETS DE LA CORRECTION D'UN ÉTAT D'HYPOCALCÉMIE CHRONIQUE IN VIVO	191
HYPOTHÈSE SPÉCIFIQUE	191
BUT	191
PRÉMISSES	191
ARTICLE 2	192
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	241
I-Variation du phosphore alimentaire en présence d'une supplémentation de 3% de calcium	241
1. Hypothèse spécifique	241
2. But	241
3. Prémisses	241
4. Matériel et Méthodes	241
5. Résultats	242

a) <i>Survie</i>	242
b) <i>Calcémies et phosphatémies</i>	245
c) <i>PTH sérique</i>	249
d) <i>Mesures anthropométriques et densitométriques</i>	249
6. <i>Discussion</i>	256
<i>II- Influence du sexe sur la réversibilité d'un état d'hypocalcémie chronique in vivo</i>	260
1. <i>Hypothèse spécifique</i>	260
2. <i>But</i>	260
3. <i>Prémisses</i>	260
4. <i>Matériel et Méthodes</i>	260
5. <i>Résultats</i>	261
a) <i>Survie</i>	261
b) <i>Calcémies et phosphatémies</i>	264
c) <i>Mesures anthropométriques et densitométriques</i>	268
6. <i>Discussion</i>	273
CHAPITRE 3. ANALYSE GLOBALE	276
CHAPITRE 4. CONCLUSIONS	283
CHAPITRE 5. BIBLIOGRAPHIE	284
ANNEXE 1	302

LISTE DES TABLEAUX**CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

TABLEAU I. Principales causes de l'hypocalcémie chronique 44

TABLEAU II. Paramètres sériques indicatifs du métabolisme phosphocalcique chez des animaux normocalcémiques et hypocalcémiques de première et deuxième génération. 145

CHAPITRE 2. TRAVAUX DE RECHERCHE**ARTICLE 2**

TABLE 1. Weight and body area gain during the repletion phase 219

TABLE 2. Histomorphometric analysis 238

ANNEXE 1. Tableau comparatif des animaux privés de vitamine D de première et deuxième génération 302

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

FIGURE 1.1 Voie de signalisation du calcium intracellulaire et fonctions physiologiques associées	30
FIGURE 1.2 Organisation spatio-temporelle des signaux calciques générés lors de la mobilisation des réserves calciques	35
FIGURE 1.3 Structure anatomique du lobule hépatique	37
FIGURE 1.4 Schéma macroscopique et microscopique de l'os	76
FIGURE 1.5 Facteurs physiologiques et pharmacologiques qui influencent la masse osseuse	80

CHAPITRE 2. TRAVAUX DE RECHERCHE

ARTICLE 1

FIGURE 1. Influence of the <i>in vivo</i> calcium status on basal resting $[Ca^{2+}]_c$ in rat hepatocytes	129
FIGURE 2. Influence of the <i>in vivo</i> calcium status on the amplitude of the initial $[Ca^{2+}]_c$ during exposure to Tg in calcium-free buffer	131
FIGURE 3. Influence of the <i>in vivo</i> calcium status on the IP_3 -induced Ca^{2+} mobilization in permeabilized hepatocytes	133
FIGURE 4. Influence of the <i>in vivo</i> calcium status on the IP_3 -induced Ca^{2+} mobilization in permeabilized hepatocytes following emptying/recharging of the IP_3 -sensitive Ca^{2+} pools	135
FIGURE 5. Evaluation of the Ca^{2+} content of the IP_3 -sensitive pools	137
FIGURE 6 Influence of the <i>in vivo</i> calcium status on store-operated/capacitative Ca^{2+} entry in hepatocytes obtained from N or Ca ⁻ rats	139
FIGURE 7. Influence of the <i>in vivo</i> calcium status on the steady state expression of the calreticulin gene transcript	141

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

I-Influence de l'hypocalcémie chronique sur la cinétique de réplétion et redéplétion calcique de l'hépatocyte

FIGURE 2.1 Calcémies d'animaux normocalcémiques et D-Ca- de première et deuxième génération 148

FIGURE 2.2 Influence du statut calcique et de la réplétion calcique sur la concentration cytoplasmique basale de calcium et sur la mobilisation des réserves calciques IP₃-dépendantes d'hépatocytes de rat. 151

FIGURE 2.3 Influence du statut hypocalcémique et de la réplétion en calcium alimentaire sur l'expression génique de la calréticuline du foie entier. 155

FIGURE 2.4 Schéma du protocole expérimental de réplétion en calcium alimentaire suivie de la phase de redéplétion calcique progressive 161

FIGURE 2.5 Catégorisation des groupes étudiés en phase de redéplétion calcique progressive 163

FIGURE 2.6 Influence de la redéplétion calcique progressive sur la concentration cytoplasmique basale de calcium 165

FIGURE 2.7. Mobilisation des réserves IP₃-dépendantes par la phényléphrine et ratio de base des réserves calciques en période de redéplétion calcique progressive. 168

II-Influence du statut calcique extracellulaire sur l'homéostasie cellulaire calcique de l'ostéoblaste

FIGURE 2.8 Schéma du protocole expérimental utilisé pour les études sur cellules osseuses 178

FIGURE 2.9 Effet du statut calcique *in vitro* sur la concentration cytoplasmique basale de calcium et sur la mobilisation des réserves calciques cellulaires chez les cellules *ROS 17/2.8* 180

FIGURE 2.10 Effet du statut calcique *in vitro* sur la concentration cytoplasmique basale de calcium et sur la mobilisation des réserves calciques cellulaires chez des ostéoblastes en culture primaire. 184

ARTICLE 2

FIGURE 1. Schematic illustration of the experimental design 220

FIGURE 2. Survival rate during the redepletion phase following a period of 14 days of repletion with oral calcium, D₃ or CT repletion. 222

FIGURE 3. Serum Ca ²⁺ concentrations during the repletion and repletion phases	224
FIGURE 4. Serum inorganic phosphate concentrations during the repletion and repletion periods	226
FIGURE 5. Serum 25OHD ₃ and 1,25(OH) ₂ D ₃ concentrations during the repletion and repletion phases	228
FIGURE 6. Serum parathyroid hormone concentrations during the repletion and repletion phases	230
FIGURE 7. Serum growth hormone concentrations during the repletion phase	232
FIGURE 8. Urinary calcium (A) and phosphate (B) excretion during the repletion and repletion phases	234
FIGURE 9. Influence of the repletion protocols on BMD gain over baseline values (day 0) at the whole body level	236
FIGURE 10. Bone histology of proximal tibiae	239

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

I- Variation du phosphore alimentaire en présence d'une supplémentation de 3% de calcium

FIGURE 2.11 Courbes de survie des animaux supplémentés en phosphore alimentaire soumis à un protocole de réplétion/redéplétion calcique	243
FIGURE 2.12 Influence des deux modes de supplémentation en phosphore alimentaire sur les concentrations circulantes de calcium ionisé et de phosphore inorganique	246
FIGURE 2.13 Influence des deux modes de supplémentation en phosphore alimentaire sur la concentration sérique de PTH intacte	250
FIGURE 2.14 Influence des deux modes de supplémentation en phosphore alimentaire sur le gain de poids et d'aire corporelle du corps entier	252
FIGURE 2.15 Influence des deux modes de supplémentation en phosphore alimentaire sur l'accrétion minérale osseuse et de la densité minérale osseuse du corps entier	254

II- Influence du sexe sur la réversibilité d'un état d'hypocalcémie chronique in vivo

FIGURE 2.16 Courbes de survie des mâles et des femelles soumis à un protocole de réplétion/redéplétion calcique 262

FIGURE 2.17 Influence de la réplétion/redéplétion calcique sur les concentrations circulantes de calcium ionisé et de phosphore inorganique chez les mâles et les femelles 265

FIGURE 2.18 Gain de poids et d'aire corporelle durant la phase de réplétion calcique chez les mâles et les femelles 269

FIGURE 2.19 Accrétion minérale osseuse et gain de BMD du corps entier durant la phase de réplétion calcique chez les mâles et les femelles 271

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$[Ca^{2+}]_e$: Concentration de calcium extracellulaire
 $[Ca^{2+}]_i$: Concentration de calcium intracellulaire
 $[Ca^{2+}]_m$: Concentration de calcium mitochondrial
 $[Ca^{2+}]_n$: Concentration de calcium nucléaire
 $[Ca^{2+}]_{RE}$: Concentration de calcium des réserves du réticulum endoplasmique
 $[Ca^{2+}]_c$: Concentration de calcium cytoplasmique ou cytosolique
 $1,25(OH)_2D$, $1,25(OH)_2D_3$ ou $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ou CT : $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D ou $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 ou calcitriol
 $25(OH)D$ ou $25(OH)D_3$: 25-hydroxyvitamine D ou 25-hydroxyvitamine D_3
ADPRc : Adénosine diphosphate ribose cyclique
AMP_c : Adénosine monophosphate cyclique
ARN_m : Acide ribonucléique messenger
 Ca^{2+} : Calcium ionisé
 $Ca+_{0,5}$: Supplémentation par une faible dose de calcium alimentaire
 $Ca+_{3}$: Supplémentation par une haute dose de calcium alimentaire
 Ca^{2+} : Calcium ionisé
CaBP : Calbindin
CaSR : Récepteur à calcium
CMO : Contenu minéral osseux
D : Vitamine D
 D_3 : Vitamine D_3 ou cholécalciférol
DAG: Diacylglycérol
D-Ca- : Hypocalcémie chronique secondaire à une déficience en vitamine D
DMO : Densité minérale osseuse
IL: Interleukine
IP₃: Myo-inositol 1,4,5-triphosphate
N : Normocalcémique
NAADP : Adénine dinucléotide phosphate de l'acide nicotinique
Phe : Phényléphrine
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PTH : Parathormone
PTHrP: PTH-related protein
RE : Réticulum endoplasmique
RIP₃ : Récepteur à l'IP₃
RRy : Récepteur à la ryanodine
T: testostérone
S-1-P : Sphingosine-1-phosphate
SNC: Système nerveux central
VDR_m : Récepteur membranaire de la vitamine D
VDR_n : Récepteur nucléaire de la vitamine D
VOC : Canaux calciques voltage-dépendants

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude envers deux femmes qui ont joué un rôle primordial dans la réussite de mes études doctorales soit :

Marielle Gascon-Barré qui a su croire en mes capacités et en ma volonté de réussir et qui m'a donné la chance, les moyens et les conseils pour y parvenir.

Michèle Houde-Nadeau qui a su m'orienter au bon moment vers le bon endroit et qui est toujours demeurée une oreille attentive et une source de conseils et d'aide tout au long de ce périple.

Je voudrais souligner l'importance toute particulière et la contribution essentielle à la réussite de ces travaux de deux hommes qui m'ont tour à tour transmis leur expertise avec beaucoup de patience et de calme:

Jean-Luc Petit qui, par sa douceur, son écoute, sa patience, ses compétences techniques extraordinaires et ses qualités humaines exceptionnelles, a su m'enseigner avec brio les rudiments du métier de scientifique.

Christian Demers, mon professeur des dernières heures qui a contribué à démystifier cette grande inconnue qu'était pour moi la biologie moléculaire et qui par ses conseils, ses discussions, son écoute et sa patience infinie a fourni une dimension humaine et scientifique à mes travaux.

Je remercie les membres actuels de l'équipe MGB ainsi que tout ceux qui m'ont précédée. Votre présence a contribué à mon évolution tant personnelle que professionnelle.

Un gros merci à Manon Livernois qui a toujours été dévouée et prête à m'aider dans l'exécution de tâches essentielles. Son empathie et son écoute me manqueront.

Un merci tout spécial à Robert Boileau pour son aide précieuse dans l'exécution du travail statistique nécessaire à ces travaux de recherche ainsi qu'au Dr Louis-Georges Ste-Marie, à Natalie Dion, à Claire Deschênes et aux autres membres de cette équipe qui ont tous été des collaborateurs essentiels pour l'avancement de mes travaux.

Je remercie finalement les autres membres du centre de recherche, ceux du passé et ceux encore présents, qui sont devenus au fil des années, des collaborateurs, des collègues et des amis et qui ont tous contribué d'une manière toute personnelle à la réussite de ce grand rêve. A Jean-François, Cathy, Natalie et Chantal, mes amis hors labo, merci pour l'écoute attentive, les mots et les paroles encourageantes, le réconfort et le soutien de tous les instants et tout particulièrement dans les derniers moments.

Je ne saurais être là sans la présence et le soutien continu de mes parents, Nicole et Benoît et de mon frère, Hubert qui ont partagé chaque moment de ce merveilleux périple et m'ont encouragée sans relâche à persévérer.

Finalement, je n'aurais pas survécu sans le soutien financier des fonds FCAR, de la FES, du département de nutrition et du Centre de recherche du CHUM.

À ma Muse, Celui qui guide ma vie...

***« L'avenir appartient à ceux qui croient en la beauté de leurs rêves »
(Eleanor Roosevelt)***

CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 PHYSIOLOGIE DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE

GÉNÉRALITÉS

Le calcium est le cinquième élément le plus abondant du sang et le deuxième cation en importance du compartiment intracellulaire. Les concentrations sanguines moyennes de calcium total sont de 2,5 mmol/L. De ce total, la moitié se retrouve sous forme ionisée, 40% lié aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine, et 10% se retrouve complexé à des groupements phosphate, citrate ou oxalate. Les concentrations extracellulaires de calcium peuvent cependant différer d'un organe à l'autre. Ainsi, au front de résorption de l'os, les quantités de calcium extracellulaire ($[Ca^{2+}]_e$) peuvent varier de 8 à 40 mM (1), alors que la concentration de calcium du liquide céphalo-rachidien varie de 4,3 à 5,9 mM de calcium et celle de la bile, de 1,6 à 4 mM.

Le calcium est l'ion dont l'homéostasie est la plus fortement régulée de l'organisme. Ces mécanismes homéostatiques, très sensibles aux variations calciques, se sont développés au cours de l'évolution. En effet, la concentration plasmatique de calcium ionisé (Ca^{2+}) se rapproche de celle retrouvée dans l'eau de mer. Le passage obligé d'un environnement aquatique à un milieu de vie terrestre, beaucoup plus pauvre en calcium, a contraint l'organisme à développer des mécanismes ayant pour objectif la conservation maximale du calcium ainsi que la mobilisation du calcium mis en réserve dans le but de répondre aux besoins calciques que nécessitent certaines fonctions vitales telles la neurotransmission et la contraction cardiaque (2).

L'homéostasie du $[Ca^{2+}]_e$ sera revue en décrivant les différents facteurs qui la régulent.

RÉGULATION DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE

I- Régulation hormonale

La régulation du $[Ca^{2+}]_e$ se fait par le contrôle des entrées au niveau intestinal et rénal et des sorties au niveau rénal, fécal et cutané, contrôle qui est sous la gouverne de trois hormones majeures: la parathormone (PTH), la forme hormonale de la vitamine D (D), la 1,25-dihydroxyvitamine D ($1,25(OH)_2D$) et dans une moindre mesure, la calcitonine. Ces trois hormones agissent sur les organes-cibles du métabolisme calcique soit l'os, le rein et l'intestin. D'autres hormones exercent également une influence indirecte sur le statut calcique extracellulaire en agissant sur la synthèse, la sécrétion et/ou le catabolisme des trois hormones principales.

1. Parathormone (PTH)

La PTH est un peptide composé de 84 acides aminés et sécrété par les glandes parathyroïdes en réponse aux fluctuations des concentrations de Ca^{2+} systémique. Outre l'hormone intacte, on retrouve plusieurs fragments peptidiques mesurables en circulation dont les plus documentés sont les fragments 1-34 et 7-84 qui proviennent à la fois de la glande parathyroïde et du métabolisme périphérique de l'hormone intacte (3). On ne connaît pas avec certitude l'implication physiologique des fragments carboxy-terminaux mais on sait toutefois que le fragment 7-84 antagonise les effets de l'hormone intacte en interagissant avec un récepteur distinct de celui de la PTH 1-84 et qui a été identifié sur le rein et les ostéoblastes (4).

La relation entre la calcémie et la sécrétion de PTH est de nature sigmoïdale inverse. Une baisse de Ca^{2+} sérique stimule la sécrétion de PTH alors qu'une hausse, l'inhibe. La courbe

est très accentuée et le seuil critique, soit la concentration de Ca^{2+} nécessaire pour inhiber de moitié la sécrétion de PTH, oscille entre 1.1 à 1.3 mM de Ca^{2+} soit la quantité normale de Ca^{2+} du sang. Le clonage d'un récepteur à calcium (CaSR) situé sur les glandes parathyroïdes a permis de clarifier l'influence du $[\text{Ca}^{2+}]_e$ sur la sécrétion de cette hormone (5). Outre le calcium, il existe plusieurs éléments régulant la sécrétion de PTH tels la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, le phosphore, le magnésium ainsi que les catécholamines et certaines cytokines.

Des récepteurs qui lient la portion N-terminale de la PTH ont été identifiés au sein de plusieurs organes quoique l'os et le rein demeurent les deux principaux organes-cibles. La liaison de la PTH à son récepteur active deux voies de signalisation cellulaire distinctes soit la voie du calcium intracellulaire et la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Cette dernière reste toutefois la principale voie de signalisation intracellulaire. Dans le rein, la PTH permet la conservation du calcium en favorisant sa réabsorption tubulaire alors qu'elle a l'effet opposé sur l'homéostasie du phosphore dont elle stimule plutôt l'excrétion urinaire. En accroissant les niveaux d'ARN messagers (ARN_m) de l'enzyme rénale responsable de la biosynthèse de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, la PTH est un puissant régulateur de la synthèse de ce dernier (2). De plus, la PTH a un effet inhibiteur sur les niveaux géniques de la 24-hydroxylase responsable du catabolisme de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. On ne sait toutefois pas si l'action de la PTH sur ces deux enzymes est de nature transcriptionnelle ou autre. De même, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, par l'intermédiaire de son récepteur nucléaire (VDR_n) situé dans les cellules parathyroïdiennes, exerce une action transcriptionnelle inhibant la prolifération de ces cellules, la production et la sécrétion de PTH (2). Cette régulation négative a une implication thérapeutique chez les individus atteints d'ostéodystrophie rénale, une maladie caractérisée par une hyperparathyroïdie secondaire. La prise de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ par ces personnes prévient l'hypertrophie de la glande

parathyroïde en plus de supprimer la sécrétion de PTH, permettant ainsi de contrôler l'hyperparathyroïdie (2).

Au niveau de l'os, l'action de la PTH est double car elle est à la fois une hormone anabolique et catabolique. Elle stimule le processus de résorption osseuse en augmentant le nombre et l'activité des ostéoclastes. Toutefois, son action catabolique demeure indirecte car la cellule ostéoclastique est dépourvue d'un récepteur à la PTH. Des études ont d'ailleurs démontré qu'une culture d'ostéoclastes isolés perd sa capacité de résorber l'os lorsque mis en présence de PTH alors que l'ajout d'ostéoblastes aux ostéoclastes restaure leur pouvoir résorbant. Les cellules souches ostéoblastiques ainsi que les pré-ostéoblastes possèdent le récepteur reconnaissant la PTH/PTHrP. L'activation de la voie de signalisation cellulaire médiée par l'AMP_c permet d'accroître les niveaux d'ARN_m d'un élément essentiel à la différenciation des ostéoclastes, le RANKL et de réduire ceux de l'ostéoprotégérine (OPG), un inhibiteur de ce même processus de différenciation (6).

L'action anabolique osseuse de la PTH survient lorsque cette hormone est administrée de façon intermittente alors qu'une administration continue stimule plutôt la formation des ostéoclastes et le processus de résorption osseuse (7). Ce mode d'administration n'affecte pas le ratio OPG/RANKL et stimule plutôt les marqueurs indicatifs de la formation osseuse tels la phosphatase alcaline (7). Néanmoins, les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'action anabolique de la PTH demeurent encore hypothétiques. Certains suggèrent que la PTH module la libération de facteurs de croissance qui, à leur tour, stimulent la réplication et la différenciation des ostéoblastes ainsi que la formation osseuse (8). Des études cliniques ont démontré son efficacité dans la prévention des fractures vertébrales et non-vertébrales chez des femmes ménopausées ostéoporotiques en plus d'accroître la densité minérale osseuse (DMO) de tous les sites squelettiques évalués à l'exception du radius (9). La portion N-terminale de l'hormone, soit le fragment 1-34, a été récemment approuvée

approuvé comme un agent pharmacologique anabolique dans le traitement de l'ostéoporose sévère chez les femmes post-ménopausées et des études sur le potentiel thérapeutique de l'hormone intacte (1-84) sont actuellement en cours (10).

Finalement, certains auteurs suggèrent la présence d'un récepteur intestinal liant la PTH qui stimule l'absorption intestinale de calcium et paradoxalement celle de phosphore (11). Le gène de ce récepteur a été identifié sur les cellules épithéliales et musculaires lisses de l'intestin. Il a également été identifié sur ces cellules par immunocytochimie et des études de liaison ont établi qu'il lie le fragment 1-34 de l'hormone avec une constante de dissociation de 0.2 nM (200 pM), une concentration largement supérieure à la quantité d'hormone intacte mesurée lors d'un état normocalcémique et même hypocalcémique chronique. Les auteurs ont noté que des poulets déficients en D et hyperparathyroïdiens, démontraient pourtant une absorption intestinale de calcium toujours aussi déficiente. Une observation qu'ils expliquent par le fait que ces animaux présentent des défauts au niveau de la voie cellulaire de l'AMP_c (11).

2. *PTH-related protein*

L'étude de patients atteints d'hypercalcémie maligne a permis d'identifier, dans le sérum de ces individus, une hormone dont la séquence d'acides aminés présente une homologie avec celle de la PTH (12). Ce peptide baptisé PTHrP (*PTH-related protein*) est sécrété de manière ubiquitaire par les cellules normales et tumorales. Le PTHrP interagit avec le même récepteur que la PTH et active aussi la voie cellulaire de l'AMP_c. Toutefois, ses actions physiologiques semblent beaucoup moins importantes dans le maintien de l'homéostasie du $[Ca^{2+}]_e$. L'action de la PTHrP semble surtout être paracrine et de nature très localisée. Elle joue un rôle dans le transfert placentaire de calcium durant la vie fœtale (13) et est impliquée dans la stimulation du processus de différenciation chondrocytaire de

la plaque de croissance lors du développement de ce tissu (14). Les modèles de souris transgéniques dépourvues soit du récepteur liant la PTH/PTHrP ou encore de la PTHrP elle-même, présente une chondrodysplasie sévère caractérisée par la différenciation accélérée des chondrocytes de même qu'une minéralisation prématurée de la matrice osseuse (15). Récemment, on a attribué une fonction intracrine à cette hormone avec la découverte d'un signal de localisation nucléaire situé sur une région spécifique du peptide. Toutefois, l'implication physiologique de cette translocation nucléaire du PTHrP est encore méconnue. On suggère que le PTHrP peut agir comme un facteur de transcription ou encore médier l'exportation des ARN_m (16).

3.1,25(OH)₂D

L'implication de la 1,25(OH)₂D dans la régulation du $[Ca^{2+}]_e$ sera discutée plus en détail dans la section portant sur le système endocrinien de la D (section 1.3).

4. Calcitonine

La calcitonine est une hormone hypocalcémiant sécrétée par les cellules C de la glande thyroïde. Elle possède son propre récepteur localisé sur les ostéoclastes, les membranes des tubules rénaux ainsi que sur les ostéoclastes du calvarium fœtal de rat (17). L'interaction de l'hormone avec son récepteur active également la voie de signalisation cellulaire de l'AMP_c. Par son action ostéoclastique, la calcitonine bloque le phénomène de résorption osseuse alors que dans le rein, elle stimule l'excrétion urinaire de calcium et de phosphore. Son action demeure toutefois peu dominante chez l'homme quoiqu'elle est impliquée dans la régulation du métabolisme phosphocalcique du fœtus et du nouveau-né (13).

Le $[Ca^{2+}]_e$ semble être le principal régulateur de la sécrétion de calcitonine. En effet, des études menées chez des rats parathyroïdectomisés, rendus conséquemment

hypocalcémiques, ont démontré une diminution de la calcitonine dans les cellules de la glande thyroïde. L'effet inverse a également été observé chez des animaux hypercalcémiques chez qui on note une hausse de la concentration thyroïdienne de calcitonine. De plus, la découverte d'un CaSR sur les cellules C de la glande thyroïde est venue confirmer le rôle régulateur du $[Ca^{2+}]_e$ dans la sécrétion de cette hormone (18).

5. Autres hormones

a) Prolactine

La prolactine est une hormone hypophysaire impliquée dans l'initiation et le maintien de l'allaitement. Toutefois, elle a aussi un effet stimulateur sur l'absorption intestinale de calcium ainsi que sur la mobilisation du calcium et du phosphore de l'os (19). Ces effets sont en fait médiés par la $1,25(OH)_2D$ puisque la prolactine stimule l'activité de la 1α -hydroxylase rénale (20). Toutefois, la prolactine peut aussi influencer l'homéostasie calcique indépendamment du statut en D puisqu'il a été démontré qu'elle stimulait l'absorption intestinale de calcium de rats mâles déficients en D (19).

b) Estrogènes

Les estrogènes influencent le métabolisme calcique et osseux sans toutefois réguler directement la calcémie. En effet, lors de la ménopause, caractérisée par l'arrêt de la sécrétion endogène d'estrogènes, l'homéostasie calcique subit certains changements. La plupart des données expérimentales proviennent de l'observation des femmes ménopausées chez qui on note une diminution de l'absorption intestinale de calcium, une hausse des pertes calciques urinaires et un phénomène de résorption osseuse accélérée, trois éléments qui contribuent à créer une balance calcique négative et qui entraînent, entre autres, la relative hyperparathyroïdie secondaire caractéristique de la femme ménopausée (21;22). On rapporte la présence d'éléments de réponse aux estrogènes sur les gènes des protéines de

transport du calcium telles la calbindin-D_{28k} (CaBP_{28k}). Ceci peut expliquer pourquoi, en absence d'estrogènes, l'absorption intestinale et la réabsorption rénale de calcium sont réduites.

II- Le récepteur à calcium

Description, localisation et fonctions physiologiques

L'hypercalcémie hypocalciurique familiale est une maladie génétique bénigne caractérisée par un défaut de la régulation de l'homéostasie extracellulaire de calcium. Malgré une hypercalcémie, ces individus présentent une sécrétion de PTH normale et une excrétion urinaire de calcium anormalement trop faible. Ces caractéristiques dénotent une résistance des glandes parathyroïdes à la concentration circulante de calcium. La recherche des causes de cette maladie a permis la découverte d'une protéine située sur les glandes parathyroïdes du bœuf : le CaSR (5). Une mutation hétérozygote du gène de cette protéine est la cause sous-jacente de la maladie. Ainsi, le CaSR assure la surveillance de la concentration environnante de calcium et permet le maintien des $[Ca^{2+}]_e$ dans un intervalle très peu variable. Depuis, cette protéine a été identifiée sur plusieurs cellules telles les cellules du tubule rénal proximal, les cellules intestinales, les ostéoblastes, les ostéoclastes de même que chez les hépatocytes(23-25). Le domaine extracellulaire amino-terminal a pour ligand principal le calcium qui, lorsqu'il se lie, permet l'ouverture de canaux cationiques non-sélectifs et l'entrée de calcium dans la cellule. De plus, la production d'IP₃ conduisant à la mobilisation des réserves calciques du réticulum endoplasmique (RE) est également conséquent à l'activation du CaSR. Cette augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium ($[Ca^{2+}]_c$) sert d'intermédiaire à la réalisation de fonctions biologiques telles la sécrétion de PTH, la prolifération et la différenciation cellulaire, la motilité et l'absorption intestinales, et la sécrétion hormonale (23;24). Les hypothèses, quant à un rôle possible du

CaSR au sein du métabolisme osseux, ont été émises suite à l'étude radiographique et histologique des os de souris ayant une ablation du gène du CaSR (26). Les souris homozygotes (CaSR^{-/-}) survivent rarement au-delà de sept jours et démontrent un retard de croissance et un défaut du processus de minéralisation osseuse conduisant à l'apparition précoce d'un rachitisme dès deux jours. Ces résultats viennent appuyer le rôle du CaSR dans la régulation du processus de remodelage osseux. En effet, la grande quantité de calcium libérée (40 mM) dans la cavité de résorption osseuse active le CaSR présent sur les ostéoclastes. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ qui en résulte inhibe l'ostéoclastogénèse et stimule le recrutement et la prolifération ostéoblastique en vue d'initier le processus de formation osseuse nécessaire au remplacement de l'os résorbé lors du cycle précédent (23;27). Ainsi, le CaSR est considéré comme un facteur couplant la résorption à la formation osseuse lors du remodelage osseux. Certains auteurs suggèrent que le CaSR ostéoclastique est distinct de celui retrouvé sur les glandes parathyroïdes. En effet, comme ce récepteur fonctionne dans un environnement calcique très élevé, son affinité pour l'ion est probablement beaucoup plus faible que le CaSR parathyroïdien (27). De plus, des candidats, autre que le CaSR, sont suggérés pour remplir ce rôle (28). On mentionne l'existence sur la membrane de l'ostéoclaste, d'un récepteur à la ryanodine (RRy), d'un canal voltage-dépendant (VOC) et/ou d'un récepteur de la famille des *trp* (*transient receptor potential*) qui par leurs actions, causent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ de l'ostéoclaste (27). Les travaux portant sur le rôle biologique possible du CaSR dans l'os sont encore très récents et certaines critiques sont formulées. En effet, l'hyperparathyroïdie sévère couplée à une hypercalcémie et une hypophosphorémie que l'on retrouve chez ces animaux peuvent tout aussi bien être à l'origine des troubles du métabolisme osseux. D'ailleurs, les humains qui souffrent d'hyperparathyroïdie néonatale caractérisée par une mutation des deux allèles (homozygote) du gène du CaSR, ne souffrent pas de rachitisme

malgré une déminéralisation sévère rapportée dès la naissance et réversible par la correction de l'hyperparathyroïdie (29). Finalement, le CaSR a été identifié sur bon nombre d'autres cellules dont entre autres les kératinocytes, les cellules hématopoïétiques et les cellules du système nerveux central (SNC). On présume que le CaSR y joue un rôle plutôt local en informant les cellules des fluctuations environnantes de calcium, influençant ainsi la réalisation de fonctions bien précises (24).

FONCTIONS DU CALCIUM EXTRACELLULAIRE

La principale fonction du $[Ca^{2+}]_e$ demeure son implication dans le processus de minéralisation des os et des dents. Il est aussi impliqué comme cofacteur dans le processus de coagulation sanguine, dans l'adhésion paracellulaire et dans la régulation de l'excitabilité neuromusculaire. On lui attribue également des rôles moins traditionnels tels son implication dans la protection contre le cancer du colon, dans le contrôle du poids corporel et de la pression artérielle. Le calcium est un élément nutritif faiblement biodisponible dont le taux d'absorption varie entre 10 et 40% (30). Ainsi, approximativement 60 à 90% du calcium ingéré n'est pas absorbé et demeure dans le tractus gastro-intestinal. Ce calcium résiduel lie plusieurs substances potentiellement nocives pour l'intégrité de la muqueuse intestinale telles les acides biliaires et les acides gras libres, neutralisant ainsi leurs effets dommageables. De plus, le calcium peut prévenir la formation de néphrolithiases en complexant, dans la lumière intestinale, l'acide oxalique alimentaire, un élément qui entre dans la composition de ces lithiases.

On associe de plus en plus un rôle au calcium dans le contrôle du poids corporel et de la pression artérielle. Cette implication est indirecte et semble plutôt découler de l'action de la $1,25(OH)_2D_3$. En effet, de faibles apports alimentaires de calcium ont été associés à un gain

de poids plus important. Cette corrélation se base sur le fait qu'un faible apport calcique est accompagné d'une hausse de la synthèse de PTH et de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Cette dernière agit sur les adipocytes par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire, cause l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en stimulant principalement l'influx de calcium extracellulaire, ce qui entraîne l'activation du gène de la synthèse des acides gras et l'inhibition des gènes impliqués dans la lipolyse, défavorisant ainsi ce processus au détriment de la lipogenèse (31). Ce mécanisme hypothétique explique le gain de poids plus important et le pourcentage de masse adipeuse plus élevé associés à une faible consommation de calcium alimentaire (31;32). Dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins, on explique un mécanisme similaire où l'effet d'une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ médiée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ cause une vasoconstriction (33) et entraîne une hausse de la pression artérielle. Ces deux manifestations sont considérées comme les symptômes d'une déficience marginale en calcium sans toutefois survenir de façon systématique chez tous les individus qui ingèrent de faibles quantités de calcium (30). Finalement, le calcium extracellulaire exerce plusieurs fonctions indirectes par l'intermédiaire du calcium intracellulaire dont il peut influencer l'homéostasie.

1.2 PHYSIOLOGIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

GÉNÉRALITÉS

Le Ca^{2+} intracellulaire est reconnu comme un des principaux seconds messagers impliqués dans les voies de signalisation cellulaire conduisant à la réalisation de plusieurs fonctions biologiques vitales. En effet, des mutations causant des changements de l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire se révèlent incompatibles avec la vie (34). Tout comme le milieu extracellulaire de calcium, le compartiment intracellulaire est hautement régulé quoiqu'il

extracellulaire de calcium, le compartiment intracellulaire est hautement régulé quoiqu'il soit sujet à des variations plus importantes. Cette régulation est nécessaire pour contrer le gradient de 1 pour 10000 qui existe entre les milieux extracellulaire (mM) et cytoplasmique (nM) de calcium. De plus, environ 90-99% du calcium se retrouve dans les organelles; le RE, à lui seul, compte 10^{-3} M de calcium. Plusieurs protéines localisées sur la membrane plasmique, dans le cytoplasme ainsi que sur les membranes et dans la lumière des organelles permettent de contrôler ce gradient et de maintenir la $[Ca^{2+}]_c$ à des niveaux physiologiques acceptables et non-cytotoxiques. Une autre raison vient également expliquer la forte régulation de la $[Ca^{2+}]_c$ (35). La cellule contient de hautes concentrations d'adénosine triphosphate (ATP), qui lorsque clivé, produit des ions phosphate qui lient le calcium pour former des sels phosphocalciques insolubles. Afin d'éviter la formation de ces complexes néfastes pour sa survie, la cellule doit donc maintenir la $[Ca^{2+}]_c$ très basse.

COMPARTIMENTS CELLULAIRES DE CALCIUM

I- Membrane plasmique

La membrane plasmique est imperméable au calcium. Elle ne permet aucune diffusion passive. L'entrée ou la sortie de calcium de la cellule est donc fortement contrôlée par des protéines agissant comme des pompes, des échangeurs ou des canaux calciques.

1. Mécanismes qui contrôlent la sortie de calcium de la cellule

La sortie de calcium de la cellule se faisant contre un gradient de concentration élevé, les mécanismes qui en sont responsables nécessitent l'utilisation d'énergie soit sous forme d'ATP ou créée par l'entrée de sodium dans la cellule contre son propre gradient électrochimique. Chez certains modèles cellulaires, dont l'hépatocyte, la sortie de calcium

dans le milieu extracellulaire possède en soi une fonction physiologique puisqu'il permet de coordonner l'activité des cellules avoisinantes, un phénomène mieux connu sous le nom de communication paracellulaire (36). On retrouve deux mécanismes d'extrusion du calcium soit la pompe Ca^{2+} ATPase et l'échangeur sodium/calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Le premier est une voie active qui possède une forte affinité pour le calcium quoique sa capacité demeure limitée. Elle est donc responsable du maintien de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en absence de toute stimulation. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ n'est pas un mécanisme actif d'extrusion de calcium. Son activité est liée à la concentration de sodium dont le gradient transmembranaire est géré par la pompe Na^+/K^+ ATPase. L'énergie créée par l'entrée de sodium dans la cellule permet d'en extraire le calcium selon une proportion de trois Na^+ échangés pour un Ca^{2+} . Par opposition à la pompe Ca^{2+} ATPase, cet échangeur n'est pas ubiquitaire et semble se concentrer principalement au sein des cellules excitables. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ possède une affinité moindre pour le calcium quoique sa capacité est plus élevée. Il est donc activé lors d'augmentation élevée de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ comme celle générée lors de la dépolarisation membranaire de la cellule cardiaque en amorce de la contraction du cœur .

2. Mécanismes qui contrôlent l'entrée de calcium dans la cellule

L'entrée de calcium dans la cellule se fait par des canaux dont l'ouverture et la fermeture dépendent 1) du voltage, 2) de l'activation d'un récepteur par un ligand extracellulaire spécifique ou de la production de signaux intracellulaires, 3) de la déplétion des réserves cellulaires du RE et, 4) d'une action mécanique ou thermique. Finalement, on retrouve d'autres canaux qui ne peuvent se classer dans l'une ou l'autre de ces catégories.

a) *Canaux voltage-dépendants (VOC)*

Il existe plusieurs types de VOC : le type L (*long lasting and large capacitance*), T (*transient*), N (*neither*), P, Q et R. Ces canaux, hautement sélectifs pour le calcium, se distinguent par des propriétés pharmacologiques et physiologiques qui leur sont propres. On les retrouve principalement dans les tissus dits excitables tels le tissu nerveux, cardiaque et musculaire et sont activés lors de la dépolarisation membranaire.

b) *Canaux voltage-indépendants*

i) *Les canaux modulés par la liaison d'un ligand extracellulaire ou par la production de signaux intracellulaires*

Au niveau extracellulaire, l'interaction de ligands tels l'ATP, le glutamate, la sérotonine et l'acétylcholine avec leurs récepteurs membranaires entraîne l'ouverture d'un canal calcique couplé et l'influx de calcium. Ils sont particulièrement présents dans les cellules musculaires, cardiaques et squelettiques, les neurones et les cellules sécrétoires. Le meilleur exemple de ce type de canal calcique demeure l'interaction du glutamate, un neurotransmetteur, avec son récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) situé sur la membrane du neurone post-synaptique. L'influx calcique qui en résulte est nécessaire à la transmission synaptique.

Des canaux calciques membranaires sont également activés par certaines molécules générées lors du métabolisme cellulaire telles une protéine G, une protéine kinase ou une molécule dérivée de certains lipides intracellulaires comme le diacylglycérol ou l'acide arachidonique.

ii) *Les canaux activés lors de la déplétion des réserves intracellulaires de calcium ou entrée capacitative de calcium*

L'utilisation de produits tels la thapsigargine, un inhibiteur de la pompe Ca^{2+} ATPase de la membrane du RE qui favorise la déplétion des réserves calciques, a permis de démontrer, chez les cellules non-excitables, une voie d'entrée de calcium extracellulaire non-médiée par l'action d'un récepteur membranaire. Ainsi, la déplétion des réserves intracellulaires du RE indépendamment de la production d' IP_3 entraîne un influx de calcium, appelé I_{crac} par l'intermédiaire de canaux membranaires. Cet influx demeure nettement plus faible que celui médié par les VOC (35). La fonction de ces canaux est triple : ils permettent premièrement de répléter en calcium les réserves du RE, ils assurent le prolongement du signal calcique nécessaire à la réalisation de fonctions biologiques bien précises et finalement, ils maintiennent la concentration calcique luminale du RE nécessaire à l'assemblage, le pliage et la translocation des protéines à l'intérieur de cet organelle (37). Actuellement, on ne connaît pas l'identité moléculaire de ces canaux bien que l'on présume que les canaux de la famille *trp* pourraient remplir ce rôle (38). La famille des *trp* regroupe plus de 20 canaux cationiques exprimés dans une forte proportion de tissus et impliqués au sein de processus physiologiques aussi variés que la vasodilatation, la fertilité masculine et l'olfaction (38). Un autre facteur encore inconnu dans le domaine de l'entrée capacitative de calcium demeure l'identité du stimulus physiologique qui initie l'ouverture de ces canaux. L'hypothèse la plus plausible à l'heure actuelle est de nature structurale et suppose qu'il y a un couplage physique entre les canaux calciques membranaires et les récepteurs de l' IP_3 du RE. L'autre hypothèse, de nature moléculaire, suggère la présence d'une molécule qui libérée conjointement avec le calcium lors de la déplétion des réserves cellulaires du RE va activer les canaux membranaires (39). Certains auteurs suggèrent, à titre de médiateur à l'entrée de calcium, la participation de CIF (*calcium influx factor*), molécule

non encore caractérisée (40) alors que d'autres, appuient l'hypothèse de la participation de l'IP₄, un catabolite de l'IP₃ (39) ou encore d'un métabolite de la voie de la lipoxigénase (37). Récemment, l'implication de la phospholipase C (PLC), l'enzyme nécessaire au clivage du PIP₂ en IP₃ et diacylglycérol (DAG), dans l'activation de l'entrée capacitative de calcium a été suggérée (41). On sait aussi que certains canaux *trp* sont régulés par le DAG (38). Finalement, ce phénomène peut également être le résultat de mécanismes où la production d'un ou plusieurs messagers intermédiaires précède l'association physique du RE à la membrane plasmique (42).

iii) Entrée non-capacitative de calcium

L'étude des canaux de la famille *trp* a permis de constater que certains membres de cette famille sont activés soit par l'action d'un agoniste, du DAG ou de l'acide arachidonique et ce, tout à fait indépendamment de la déplétion des réserves cellulaires de calcium. Certains auteurs suggèrent que ce phénomène co-existe avec l'entrée capacitative de calcium dans plusieurs systèmes cellulaires et qu'il peut même prédominer lors de conditions physiologiques normales (42;43).

iv) Les autres types de canaux : stretch-activated calcium channels, échangeur Na⁺/Ca²⁺ inversé et autres canaux cationiques

Les cellules sujettes à la déformation possèdent sur leur surface des canaux calciques activés lorsque la cellule subit un stress mécanique occasionnant un changement de forme.

Les cellules épithéliales de la trachée en sont un bel exemple (36).

L'échangeur Na⁺/Ca²⁺ est un mécanisme d'extrusion de calcium entièrement réversible sous certaines conditions. Ainsi, lorsque la concentration intracellulaire de sodium s'élève

au-dessus d'un seuil ou que la membrane plasmique devient moins polarisée, cet échangeur éjecte du sodium en échange de calcium (35).

Récemment, deux canaux calciques épithéliaux et appartenant à la famille des canaux *trp* ont été clonés à partir du rein et de l'intestin grêle, deux tissus impliqués dans l'absorption et la réabsorption de calcium. Il s'agit de ECAC 1 et 2 (*epithelial calcium channels*). ECAC1 a été principalement identifié dans l'intestin grêle alors que ECAC2 est plus abondant dans le rein. Ces canaux s'apparentent aux autres transporteurs de calcium tels les calbindines D (CaBP), puisque leur expression génique est régulée par le complexe VDR_n-1,25(OH)₂D qui interagit avec des éléments de réponse (VDRE) situés sur le site promoteur des deux ECAC (44). L'étude de deux modèles de souris transgéniques, soit la souris possédant un VDR_n non-fonctionnel (VDR^{-/-}) et celle dépourvue de l'enzyme 1-alpha hydroxylase active (CYP27B1^{-/-}), démontre que ces animaux ont une expression réduite de ces deux protéines au rein et à l'intestin (44). Toutefois, on soulève l'hypothèse que les gènes ECAC 1 et 2 possèdent également des éléments de réponse au calcium. En effet, la correction de l'état hypocalcémique initial des deux modèles de souris cités ci-haut, par l'administration d'une diète riche en calcium, accroît l'expression des deux gènes et ce, malgré l'absence (CYP27B1^{-/-}) ou l'inactivité (VDR^{-/-}) de la 1,25(OH)₂D (44-46).

3. Les protéines membranaires de liaison du calcium

La membrane comprend également des protéines qui ont le pouvoir de lier le calcium et les phospholipides membranaires. La famille des annexines possède cette propriété. *In vivo*, les fonctions physiologiques de ces protéines sont encore à démontrer quoique *in vitro*, elles sont impliquées dans les processus d'endo- et d'exocytose (35).

II- Cytoplasme

Le contenu cytoplasmique moyen de calcium d'une cellule au repos est approximativement de 100 nM mais varie significativement d'une cellule à l'autre en plus d'être soumis à des fluctuations importantes. Dans le cytoplasme, on retrouve deux catégories de protéines liant le calcium : les protéines de transport et les protéines dites « senseurs ». Les protéines de transport regroupent principalement les CaBP, identifiées au sein de plusieurs cellules dont les cellules intestinales et rénales où elles sont nécessaires au transport intracellulaire du calcium. Les senseurs comprennent, entre autres, la troponine C, la calmoduline et les protéines de la famille S-100 (47). La liaison du calcium à la protéine de transport ne modifie pas sa conformation alors que les senseurs, eux, modifient leur structure suite à la liaison de l'ion. Ce changement de conformation leur permet d'interagir avec des protéines-cibles, souvent de nature enzymatique, et ainsi de faire le pont entre le signal calcique initial et la réponse effectrice subséquente. Ces protéines cytoplasmiques constituent également un système de tampon efficace qui restreignent l'accroissement de la $[Ca^{2+}]_c$ et permettent de moduler l'amplitude, la durée et la dispersion des signaux calciques générés. Il est à noter que la calmoduline a également été localisée dans le noyau et y joue un rôle dans la régulation de l'expression de certains gènes.

III- Organelles

1. Le réticulum endoplasmique et réticulum sarcoplasmique

Le RE est le principal réservoir mobilisable de calcium de la cellule. Il est constitué de deux compartiments bien distincts : le RE lisse impliqué principalement dans la voie de signalisation calcique et le RE rugueux, site principal de la biosynthèse des protéines (48). Certains auteurs ont même suggéré l'existence, à l'intérieur même du RE, de plusieurs petits compartiments calciques distincts s'apparentant à des vésicules, appelés calciosomes.

Le RE agit à la fois comme un récepteur et un émetteur de plusieurs signaux régulant le processus de signalisation cellulaire du calcium. Il est la cible de molécules telles le myo-inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3), le sphingosine-1-phosphate (S-1-P) et l'adénosine diphosphate ribose cyclique ($ADPR_c$) qui se lient à des récepteurs situés sur sa membrane et provoquent l'ouverture de canaux calciques avoisinants. De plus, plusieurs protéines régulant l'homéostasie calcique intracellulaire y sont localisées. Ce compartiment cellulaire sera revu en détaillant chacun de ces éléments.

a) Récepteurs couplés à l' IP_3 et les récepteurs à la ryanodine

L' IP_3 est une molécule hydrosoluble produite suite au clivage du PIP_2 par l'enzyme membranaire PLC. Hautement soluble, elle diffuse dans le cytoplasme et se fixe à son récepteur localisé sur la membrane du RE. La portion N-terminale du récepteur à l' IP_3 (RIP_3) lie la molécule d' IP_3 alors que c'est dans la portion carboxy-terminale, responsable de l'ancrage de la protéine à la membrane du RE, que réside le canal calcique permettant la libération du calcium. L'activité du récepteur est régulée principalement par $[Ca^{2+}]_c$ selon une relation qui suit une courbe de Gausse. Ainsi, lorsque les $[Ca^{2+}]_c$ sont faibles (100- $1\mu M$), la mesure de la P_o (probabilité d'ouverture du canal calcique) est très élevée pour atteindre un nadir à une concentration calcique de $1\mu M$. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ au-delà de cette valeur a pour effet de réduire la P_o . Ce mécanisme régulateur permet, entre autres, de générer des signaux calciques aux propriétés spatio-temporelles différentes.

Les récepteurs à la ryanodine (RRy), plus volumineux, possèdent certaines homologies de séquence et de structure avec le RIP_3 . On les retrouve principalement dans les cellules excitables. On a rapporté, chez certains types de cellules notamment au système nerveux, qu'il peut cohabiter avec le RIP_3 . Il peut être activé par plusieurs agents dont la ryanodine et la caféine. Toutefois, selon le type de cellule, ces récepteurs sont étroitement associés

aux VOC. Ainsi, dans le muscle, les R_{Ry} sont couplés physiquement aux VOC et sont activés en réponse à la dépolarisation membranaire, causant ainsi une sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique. Le mécanisme de mobilisation calcique du réticulum sarcoplasmique diffère quelque peu au sein des cellules cardiaques où c'est plutôt l'influx massif de calcium médié par les VOC directement dans le cytoplasme qui active les R_{Ry}.

L'action de la PLC sur le PIP₂ permet également la synthèse du DAG, une molécule liposoluble qui reste accolée à la membrane plasmique. Le DAG peut par la suite être métabolisé en acide arachidonique et en leucotriènes. Le leucotriène B₄ a été identifié comme une molécule permettant la libération de calcium au sein des oocytes (36).

b) Sphingosine-1 phosphate (S-1-P)

Le sphingosine, le précurseur du S-1-P provient du clivage enzymatique du ceramide, lui-même un produit de l'action de la sphingomyélinase sur la sphingomyéline. La sphingomyélinase est une enzyme stimulée par l'activation de plusieurs récepteurs membranaires tels celui du TNF α , de l'interleukine-1 (IL-1) et du fas (48). L'action du S-1-P sur la voie de signalisation calcique est difficile à caractériser puisque cette molécule exerce une action à la fois extra- et intracellulaire. Le S-1-P extracellulaire active des récepteurs membranaires couplés aux protéines G, ce qui conduit à la production d'IP₃ et à la mobilisation calcique du RE. Le S-1-P intracellulaire, par contre, induit un pic rapide de calcium provenant des réserves du RE. Toutefois, la présence d'un récepteur reconnaissant cette molécule de même que son site d'action n'ont pas été clairement identifiés. On présume qu'une protéine située sur la membrane du RE et qui médie la libération de calcium de cette réserve en réponse aux sphingolipides (*sphingolipid Ca²⁺ release-mediating protein*) lie le S-1-P (49).

c) *Adénosine diphosphate ribose cyclique (ADPR_c)*

L'ADPR_c est produit par l'action d'une enzyme membranaire appelée ADP-ribosyl cyclase (ou CD38) qui catalyse la transformation du NAD en ADPR_c. L'ADPR_c agit sur les RRY pour permettre l'ouverture de canaux calciques et la sortie du calcium du RE. En effet, l'application de l'ADPR_c en présence d'héparine, un antagoniste des RIP₃, a causé la mobilisation du calcium des réserves du RE, laissant présumer une voie d'activation distincte de celle empruntée par l'IP₃ (50). On a observé que les niveaux d'ADPR_c demeurent élevés plus longtemps que ceux d'IP₃ laissant présager que cette molécule intermédiaire joue un rôle dans la prolongation des signaux calciques alors que l'IP₃ est plutôt impliquée dans l'initiation des signaux. Finalement, des niveaux appréciables d'ADPR_c ont été mesurés au sein de cellules dépourvues de RRY, ce qui laisse présumer que cette molécule peut également posséder une voie d'activation distincte ou encore qu'elle a des fonctions cellulaires indépendantes de la voie de signalisation calcique (36). L'implication de l'ADPR_c a été démontrée dans les voies intracellulaires conduisant à la fécondation, à la sécrétion d'insuline et l'activation des lymphocytes T (51). D'ailleurs, la présence d'auto-anticorps contre l'enzyme CD38 a été identifiée chez des individus ayant un diabète non-insulinodépendant (52).

L'enzyme CD38 peut aussi agir sur le NADP pour permettre la synthèse du NAADP. L'action de cette molécule sur la mobilisation de calcium intracellulaire a été pour la première fois démontrée dans les œufs d'oursin de mer puis dans le cerveau de rat, les lymphocytes T, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules cardiaques (53). A ce jour, son mode d'action n'est pas connu avec exactitude. Certaines observations laissent présumer que le NAADP agit par une voie distincte de l'IP₃ puisque la mobilisation calcique induite par cette molécule est insensible aux antagonistes des RIP₃. De plus, le

NAADP cause la mobilisation calcique de réserves différentes de celles mobilisables par l'IP₃ ou l'ADPRc (53). On sait qu'il agit comme l'inducteur et le coordonnateur d'un signal calcique global en générant plusieurs signaux locaux de faible amplitude (50).

d) Coexistence de ces messagers au sein d'une même cellule

Ces voies intermédiaires situées en amont de l'augmentation de calcium intracellulaire peuvent coexister au sein de la même cellule en répondant toutefois à des voies d'activation distinctes. Le meilleur exemple de cette coexistence demeure le pancréas exocrine. La cellule pancréatique possède sur sa surface des récepteurs qui lient l'acétylcholine et induisent la production d'IP₃ et des récepteurs reconnaissant la cholecystokinine qui stimulent la voie de l'ADPRc (49). Ces voies distinctes de signalisation calcique conduisent au phénomène d'exocytose de vésicules renfermant les enzymes pancréatiques.

e) Pompe Ca²⁺ATPase de la membrane du RE (SERCA)

Il existe une pompe Ca²⁺ATPase localisée sur la membrane du RE qui permet l'entrée de calcium dans le RE. Cette pompe est inhibée spécifiquement par l'agent pharmacologique, thapsigargine. L'utilisation de la thapsigargine se révèle d'ailleurs un outil intéressant pour l'étude des réserves calciques du RE. En effet, l'utilisation de la thapsigargine prévient la recapture du calcium par le RE et permet d'évaluer sommairement, quoique indirectement, la quantité de calcium relâchée par cet organelle et ce, sans passer par la voie nécessitant la production d'IP₃. La pompe Ca²⁺ATPase du RE est plus sensible au calcium que celle de la membrane plasmique. Chez les cellules acineuses pancréatiques, on a estimé que l'activité de cette pompe est le double de celle de la pompe membranaire et qu'elle devient 14 fois plus active lorsqu'on déplete les réserves cellulaires et que la [Ca²⁺]_c s'accroît significativement (54).

f) Protéines de liaison du calcium

On retrouve dans la lumière du RE des protéines qui partagent une séquence commune d'acides aminés (Lys-Asp-Glu-Leu) dans leur portion carboxy-terminale, ce qui leur confère leur localisation microsomiale. Ces protéines exercent deux fonctions : le maintien de la concentration de calcium à l'intérieur du RE en tamponnant l'ion et le rôle de molécules-chaperons dans le processus d'assemblage, de pliage, d'exportation des protéines ainsi que dans le contrôle de la qualité des protéines produites (55). La calréticuline et la calséquestrine sont des protéines de liaison ayant une capacité élevée de liaison au calcium et qui agissent comme molécules tampon ce qui permet d'éviter l'accroissement de la concentration intraluminale de calcium libre du RE qui peut engendrer des conséquences négatives telles l'inhibition de la pompe SERCA du RE ou encore la formation de complexes insolubles de calcium. Le Bip (GRP78), l'endoplasmine (GRP94) et la calnexine exercent une fonction de chaperon et ce, tout particulièrement auprès des protéines non-glyquées. La calréticuline, elle, contrôle plutôt l'assemblage et le pliage des protéines glyquées. De plus, la calréticuline et la calnexine stimulent indirectement la pompe Ca^{2+} ATPase de la membrane du RE en inhibant la phosphorylation qui rend inactive cette dernière en plus de moduler les RIP_3 (42;55).

La calréticuline joue également plusieurs rôles au sein du RE dont celle de réguler les réserves fonctionnelles calciques (55) en agissant comme un senseur de la concentration de calcium dans la lumière du RE. La création d'une souris transgénique dépourvue de calréticuline a permis d'identifier plusieurs autres fonctions vitales de cette protéine notamment au moment de l'embryogenèse. En effet, ces souris ne survivent pas au-delà de 14,5 jours de vie fœtale. La mortalité des embryons est causée par le développement anormal du cœur (56). D'ailleurs, l'expression constitutive de la calréticuline dans le cœur

de ces souris, permettent leur survie au-delà de la naissance quoiqu'elles connaissent de graves problèmes métaboliques liés au métabolisme des lipides et des glucides (55;57).

On a longtemps conclu que la calréticuline était une protéine localisée uniquement dans le RE. Plusieurs évidences démontrent qu'elle est aussi présente à la surface de la cellule ainsi que dans le milieu extracellulaire où elle joue des rôles tout à fait indépendants de l'homéostasie calcique. Ainsi, la calréticuline a été identifiée à la surface de cellules telles les cellules endothéliales où elle agit sur le processus d'adhésion cellulaire en plus d'inhiber l'angiogenèse (57). Cette dernière propriété soulève l'intérêt scientifique quant au potentiel thérapeutique de la calréticuline dans le traitement de certains cancers. Finalement, la localisation extracellulaire de la calréticuline est surtout impliquée dans un certain nombre de pathologies auto-immunes. En effet, une certaine proportion de patients atteints de lupus érythémateux et du syndrome de Sjogren possèdent des auto-anticorps contre la calréticuline (57).

Il existe peu de données expérimentales décrivant les facteurs qui régulent l'expression génique de cette protéine. Ainsi, la régulation transcriptionnelle de la calréticuline semble dépendre du type de cellule étudiée. Ainsi, dans les cellules prostatiques et des vésicules séminales de rat, l'expression du gène de la calréticuline est influencée par les androgènes; elle est réduite suite à une castration et augmentée suite à l'administration d'androgènes (58). Dans une lignée cellulaire myéloïde d'origine humaine, l'induction de la différenciation influence à la baisse les niveaux d'ARN_m de la calréticuline laissant sous-entendre l'importance de cette protéine dans le processus de prolifération cellulaire. Des situations induisant un stress telles l'hyperthermie ou l'exposition aux rayons ultraviolets accroissent l'expression du gène de la calréticuline au sein du poumon de rat (59) et des kératinocytes humains (60). Alors que d'autres auteurs stipulent que le calcium, lui-même, par l'intermédiaire d'un signal de stress invoqué par la déplétion des réserves cellulaires,

est l'élément qui régule l'expression de la calréticuline au sein d'une lignée cellulaire transfectée (61). La comparaison du site promoteur du gène de la calréticuline à ceux de d'autres protéines de liaison du calcium telles le Bip, la PDI et le GRP94 a permis d'observer des sites régulateurs analogues laissant présager une régulation transcriptionnelle similaire (60).

2. La mitochondrie

On a longtemps associé la mitochondrie à une forme de réservoir de secours qui capte le calcium cytoplasmique lorsque la cellule est endommagée ou lorsque celle-ci est soumise à une augmentation très élevée voire dangereuse de sa $[Ca^{2+}]_c$. En effet, la faible constante d'affinité des transporteurs mitochondriaux pour le calcium laissent croire qu'elle est un organelle relativement inerte qui répond peu aux fluctuations cytoplasmiques de calcium. La membrane de la mitochondrie possède néanmoins quatre systèmes impliqués dans les échanges calciques entre le cytoplasme et la lumière mitochondriale. La mitochondrie séquestre le calcium grâce à un uniport ayant une faible affinité pour le calcium, ce qui laisse présumer qu'il est relativement insensible face aux $[Ca^{2+}]_c$ physiologiques normales. Certains auteurs suggèrent que sa localisation à proximité des canaux calciques couplés aux récepteurs à l' IP_3 du RE permet une activation du transporteur mitochondrial et l'entrée de calcium dans la mitochondrie suite à la mobilisation calcique du RE (62). Récemment, on a également suggéré l'implication des radicaux libres dans la voie de communication existant entre le RE et la mitochondrie (48). L'élévation de la $[Ca^{2+}]_m$ stimule le métabolisme de celle-ci et augmente la production de radicaux libres dont le peroxyde d'hydrogène qui peut diffuser à l'extérieur de l'organelle. Toutefois, sa demi-vie est courte et on présume qu'il est rapidement capté par le RE où il active les canaux calciques couplés à l' IP_3 et à la ryanodine.

La mitochondrie est également pourvue de trois mécanismes permettant la sortie du calcium de la matrice mitochondriale soit un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ retrouvé principalement dans le cœur, le muscle squelettique et le cerveau, un échangeur $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui prévaut dans le foie, les cellules rénales et le muscle lisse et finalement, un pore membranaire appelé pore de perméabilité transitoire (63). L'ouverture de ce dernier est d'ailleurs modulé par le calcium lui-même; un accroissement de la $[\text{Ca}^{2+}]_m$ active son ouverture (63).

Finalement, le calcium intramitochondrial est nécessaire à la réalisation de certains fonctions intrinsèques à cet organelle puisqu'il régule l'activité de trois déshydrogénases impliquées dans le cycle de Krebs et la production d'ATP soit le pyruvate, l'isocitrate et l'oxoglutarate déshydrogénase (62).

3. Le noyau

Le noyau est constitué d'un nucléoplasme, d'une enveloppe nucléaire faite de deux membranes, l'une interne et l'autre externe, et de pores nucléaires. Ces derniers sont perméables au calcium et permettent à ce dernier de transiter librement du cytoplasme vers le noyau. Toutefois, l'existence d'un gradient entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire n'a pas encore été déterminée de façon claire. Ce gradient est hautement dépendant du type de cellule; il demeure inexistant chez certaines populations cellulaires, telles les cellules musculaires, soumises à de grandes augmentations de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (64). De plus, la localisation cytoplasmique de l'augmentation de calcium influence également la $[\text{Ca}^{2+}]_n$. Par exemple, si l'accroissement de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ survient dans un espace situé à proximité du noyau, ceci entraîne une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_n$ (65).

Trois rôles physiologiques sont actuellement postulés pour le calcium nucléaire : 1) la régulation de l'expression génique, 2) l'importation de protéines et 3) une implication dans le phénomène d'apoptose. Le calcium nucléaire est principalement étudié dans le contexte

du contrôle de l'expression génique et ce, tout particulièrement au sein des lymphocytes et des neurones où le calcium régule l'expression de certains gènes impliqués dans les processus de croissance, de différenciation, d'apoptose et de mémoire à long terme (64). On rapporte l'existence de certains gènes, tels *c-fos*, porteurs de deux éléments de réponse au calcium (66;67). Ces éléments de réponse, appelés CRE (*cAMP response element*) et SRE (*serum response element*), interagissent avec des protéines de liaison dénommées respectivement CREB (*CRE binding protein*) et SRF (*serum factor*) qui agissent comme des facteurs de transcription. Ces protéines doivent toutefois être phosphorylées pour pouvoir se lier aux éléments de réponse et cette étape de phosphorylation dépend de protéines kinases dont certaines sont dépendantes du complexe calcium-calmoduline. L'accroissement de calcium intracellulaire augmente la formation d'un complexe calcium-calmoduline, qui à son tour, active ces kinases nucléaires (64). Les CaMkinase (*calcium/calmodulin dependent protein kinase*) II et IV sont des enzymes ciblées par le complexe calcium-calmoduline et sont particulièrement étudiées dans la régulation de l'expression génique par le calcium (66;68).

Le mécanisme d'activation de CRE diffère de celui de SRE. Le premier étant stimulé suite à un influx calcique par les VOC de type L alors que le second, en plus d'être régulé par le même processus, est, à titre d'exemple, influencé par l'entrée de calcium associé aux récepteurs NMDA du SNC. De plus, il semble que l'activation de CRE nécessite une augmentation de la $[Ca^{2+}]_n$ alors que le SRE peut être activé par un accroissement de la $[Ca^{2+}]_c$ seulement. Ces distinctions soulignent l'impact des différents signaux calciques sur la différence d'expression observée entre certains gènes répondants au calcium (64;69).

4. L'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi est un ensemble de saccules dont la fonction principale est d'entreposer et de permettre le transit et le transport des protéines produites dans le RE. L'appareil de Golgi est considéré comme une réserve intracellulaire très concentrée de calcium estimée à plus de 10 mM (70). Les différentes études réalisées sur ce compartiment révèlent qu'il possède la machinerie nécessaire à l'accumulation, au stockage et à la libération de calcium. L'appareil de Golgi est pourvu de deux pompes membranaires responsables du recaptage de calcium par l'organelle; une pompe à calcium de style Ca^{2+} ATPase et une pompe dont l'identité est imprécise mais qui possède des propriétés pharmacologiques distinctes (70). De plus, cet organelle possède des récepteurs à l' IP_3 , quoiqu'en densité moindre que le RE. Ces récepteurs sont couplés à des canaux calciques qui permettent la mobilisation de calcium de l'appareil de Golgi. (70;71). Finalement, le Golgi est également pourvu de protéines intraluminales de liaison au calcium dénommées CALNUC et Cab 45 (71). Le calcium de l'appareil de Golgi aurait pour principales fonctions la genèse de signaux calciques très localisés servant principalement au contrôle de sa propre fonction organellaire, à des changements post-traductionnels ou encore à la sécrétion de protéines (70).

5. Les organelles acidiqes : les vésicules sécrétoires

Les vésicules sécrétoires proviennent du Golgi et servent au transport des protéines vers l'extérieur de la cellule. Toutefois, dans certains types cellulaires, ces vésicules fusionnent pour former de véritables réservoirs intracellulaires de protéines de sécrétion qui sont déversés dans l'espace extracellulaire par exocytose. Ce type d'organelle a été particulièrement bien caractérisé au sein de cellules possédant une fonction sécrétoire telles les cellules des glandes salivaires, des glandes surrénales et les cellules acineuses du

pancréas (72). Au sein des granules pancréatiques, on rapporte la présence d'un échangeur H^+/Ca^{2+} qui permet l'influx de calcium cytoplasmique. De plus, l' IP_3 et l'ADPRc peuvent mobiliser ce calcium. Toutefois, ces organelles semblent jouer un rôle bien mineur dans le maintien de l'homéostasie du calcium intracellulaire et ont été jusqu'à présent peu étudiés (73).

LES FONCTIONS DU CALCIUM INTRACELLULAIRE : LE RÔLE DE SECOND MESSAGER CELLULAIRE

Le concept de signalisation calcique intracellulaire

Il existe deux catégories de cellules qui se distinguent par la régulation de leur homéostasie calcique ainsi que par la machinerie cellulaire impliquée dans cette régulation. On retrouve les cellules excitables qui sont caractérisées par le fait qu'elles subissent une dépolarisation de leur membrane en réponse à un stimulus électrique et les cellules non-excitables qui répondent plutôt à une stimulation hormonale. La première catégorie regroupe les cellules du système nerveux, du muscle lisse et cardiaque alors que les hépatocytes, les cellules sécrétrices, les cellules épithéliales sont des exemples de cellules non-excitables. Cette classification quoique largement utilisée n'est pas exhaustive puisque certains types de cellules, tels les ostéoblastes, possèdent à la fois des propriétés de cellules excitables et non-excitables. On qualifie ces cellules d'hybride. Les cellules non-excitables seront plus spécifiquement traitées dans les sections subséquentes.

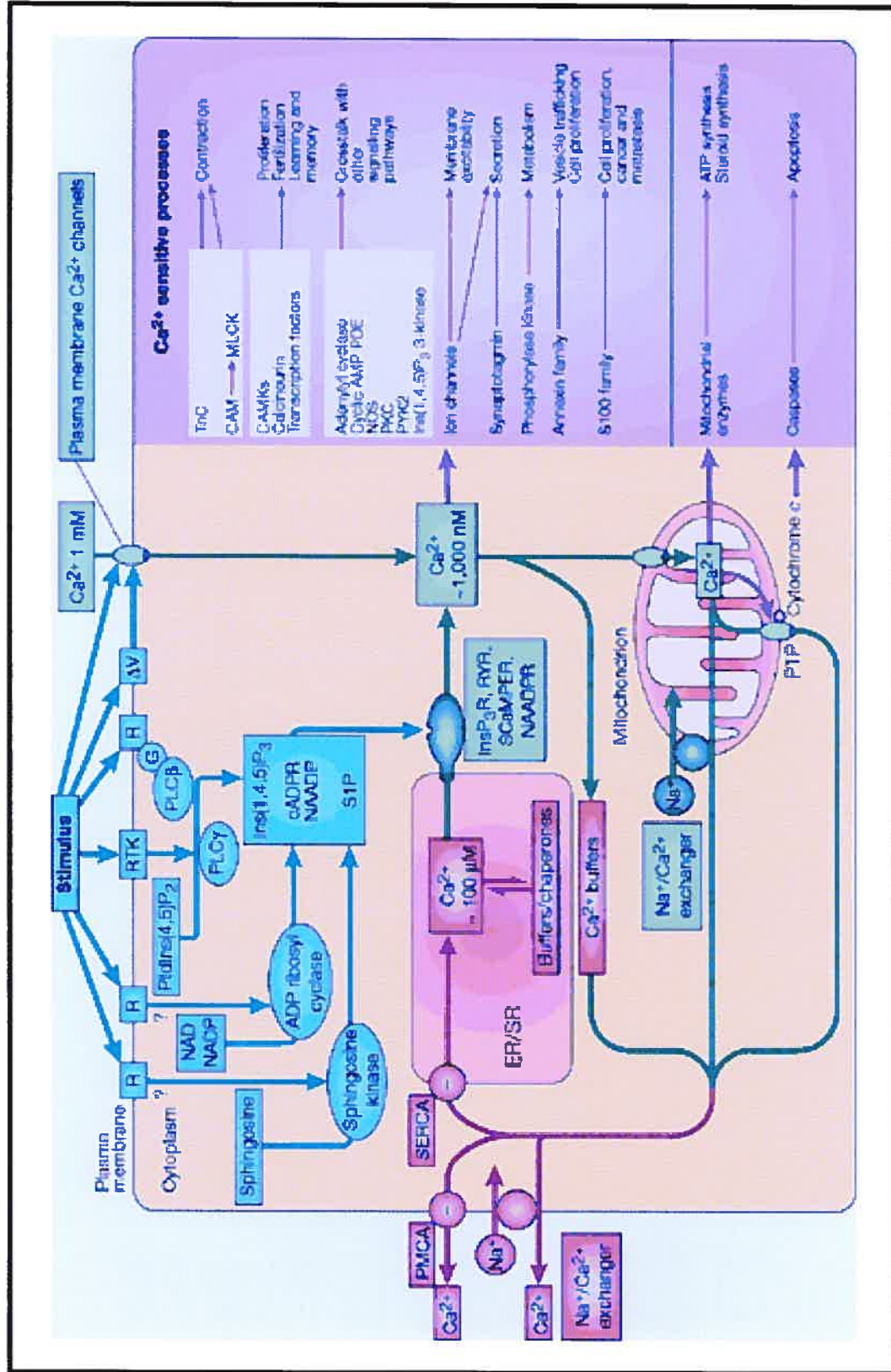


FIGURE 1.1 VOIE DE SIGNALISATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ASSOCIEES
 Tiré de Berridge et coll. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1:11 (2000)

De façon générale, le calcium intracellulaire agit comme un intermédiaire reliant un stimulus initial à une réponse physiologique finale. La multiplicité des stimuli initiateurs et des voies intermédiaires conduisant à la création de signaux calciques aux multiples caractéristiques spatio-temporelles complexifient cette voie de signalisation intracellulaire. Ainsi, d'un système cellulaire à l'autre, la voie de signalisation calcique comporte certaines similitudes couplées à plusieurs différences structurales et fonctionnelles importantes. La voie de signalisation calcique a été brièvement introduite dans la section précédente et sera décrite plus spécifiquement en ciblant les éléments qui y jouent un rôle important. Le schéma de cette voie est illustré à la figure 1.1 de la page 30.

1. Voies d'activation

Il existe principalement trois voies d'activation de la voie de signalisation calcique : 1) la dépolarisation membranaire, 2) la liaison d'un ligand à un récepteur couplé à une protéine G et, 3) la liaison d'un ligand à un récepteur possédant une activité tyrosine kinase.

a) La dépolarisation membranaire

Ce phénomène physiologique induit par le passage d'un courant électrique entraîne une entrée de sodium dans la cellule et un accroissement du potentiel membranaire de la cellule. Le changement de ce dernier cause l'ouverture des canaux VOC et l'amorce de la signalisation calcique intracellulaire.

b) Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les RCPG sont des récepteurs à sept passages transmembranaires qui, à la liaison du ligand, entraînent l'activation de différentes sous-unités G. L'une d'elle, la sous-unité G_s , active à son tour, l'enzyme PLC- β_1 qui clive le PIP₂ en IP₃ et en DAG.

c) Les récepteurs possédant une activité tyrosine kinase

Ce type de récepteur a la particularité de posséder un domaine tyrosine kinase qui permet l'ancrage de la PLC- γ_1 à la membrane de même que la phosphorylation nécessaire à son activation. Tout comme l'enzyme PLC- β_1 , l'isoforme γ_1 clive le PIP₂. Cette voie d'activation permet le déclenchement d'une cascade de réactions cellulaires conduisant à la croissance et la prolifération cellulaire. Ces récepteurs ont pour ligand principal des facteurs de croissance ainsi que certains antigènes (74).

2. Réponses calciques intracellulaires

Il arrive qu'au sein de la même cellule, la voie de signalisation calcique conduit à la réalisation de fonctions physiologiques différentes. Pour y arriver, le message calcique doit donc différer en terme d'amplitude, de durée, de fréquence ou de localisation afin d'être reconnu par des voies cellulaires spécifiques. Ces différents signaux calciques dépendent, entre autres, du mécanisme initiateur et du type de cellule. Certains auteurs (35) mentionnent la présence de nano-gradients de calcium localisés autour de l'ouverture des canaux calciques couplés au RIP₃ et au RRY. Ces gradients d'environ 100 μ M surviennent lorsque la mobilisation des réserves cellulaires de calcium se révèlent plus rapides que la diffusion du calcium dans le cytoplasme. Ces signaux élémentaires, appelés communément *spark* (associés aux RRY) ou *puff* (associés aux RIP₃) accroissent la sensibilité des récepteurs, ce qui stimule l'ouverture des canaux calciques avoisinants générant une sortie massive de calcium sous forme de vagues ou d'oscillations calciques (43). La vitesse de ces oscillations dépend des besoins de chaque cellule. Ainsi, pour activer la contraction musculaire, les vagues calciques se propagent dans les cellules musculaires à une vitesse

largement supérieure que dans les cellules non-excitables où le phénomène oscillatoire est beaucoup plus lent. Au sein des cellules non-excitables, ce mécanisme oscillatoire est intrinsèque à la cellule et semble dépendre uniquement de la mobilisation des réserves calciques sans aucune contribution du milieu extérieur de calcium alors qu'au sein de la cellule excitable, l'oscillation calcique dépend des sources intra- et extracellulaire de calcium (36).

Les signaux élémentaires de calcium, pour leur part, permettent la réalisation de fonctions physiologiques spécifiquement localisées dans ces micro-domaines cellulaires. Ainsi, la libération des vésicules synaptiques, l'activation de canaux ioniques, le métabolisme énergétique mitochondrial sont autant d'exemples d'actions médiées par ces signaux (75). La rapidité d'action de ces signaux occasionne un faible coût énergétique pour la cellule.

La réponse calcique à un agoniste mobilisateur de calcium varie d'un tissu, d'un organe et même d'une cellule à l'autre. Ainsi, les caractéristiques de la réponse calcique permettent la spécificité d'une réponse biologique malgré un stimulus initiateur parfois identique. Dans la cellule acineuse pancréatique, une réponse calcique de faible amplitude permet la sécrétion des enzymes digestives alors qu'une réponse de plus grande amplitude contrôle la sécrétion des électrolytes. L'importance de la réponse calcique au sein du lymphocyte B influencera, quant à elle, la régulation transcriptionnelle de certains gènes (69). Un autre exemple demeure celui des cellules du muscle lisse où le calcium, grâce à deux modes de signalisation, l'un global et l'autre élémentaire, permet de contrôler deux processus opposés, la contraction et le relâchement (75).

Lorsque le calcium augmente de façon globale dans le cytoplasme, celui-ci peut diffuser à l'extérieur de la cellule par l'intermédiaire de jonctions paracellulaires et ainsi transmettre le message à l'ensemble des cellules ou du tissu. Ce phénomène a été rapporté dans les cellules épithéliales de la trachée et du poumon (49). En effet, la progression de ces vagues

permet l'activation des cils situés sur ces cellules et aide à l'élimination du mucus et des particules retrouvées dans les voies aériennes. La figure 1.2 de la page 35 illustre les différentes réponses calciques intracellulaires.

3. Fin du signal calcique

Finalement, ces signaux calciques sont décodés par deux senseurs protéiques intracellulaires : la protéine kinase C (PKC) et la CAMKII (*Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II*) qui se chargent de poursuivre la transmission cellulaire de l'information. Le calcium intracellulaire est le médiateur de multiples fonctions biologiques, ce qui en fait un des seconds messagers les plus versatiles. Le calcium est impliqué dans les processus initiant la vie, dans ceux permettant la croissance et la différenciation des cellules et dans ceux conduisant à leur mort.

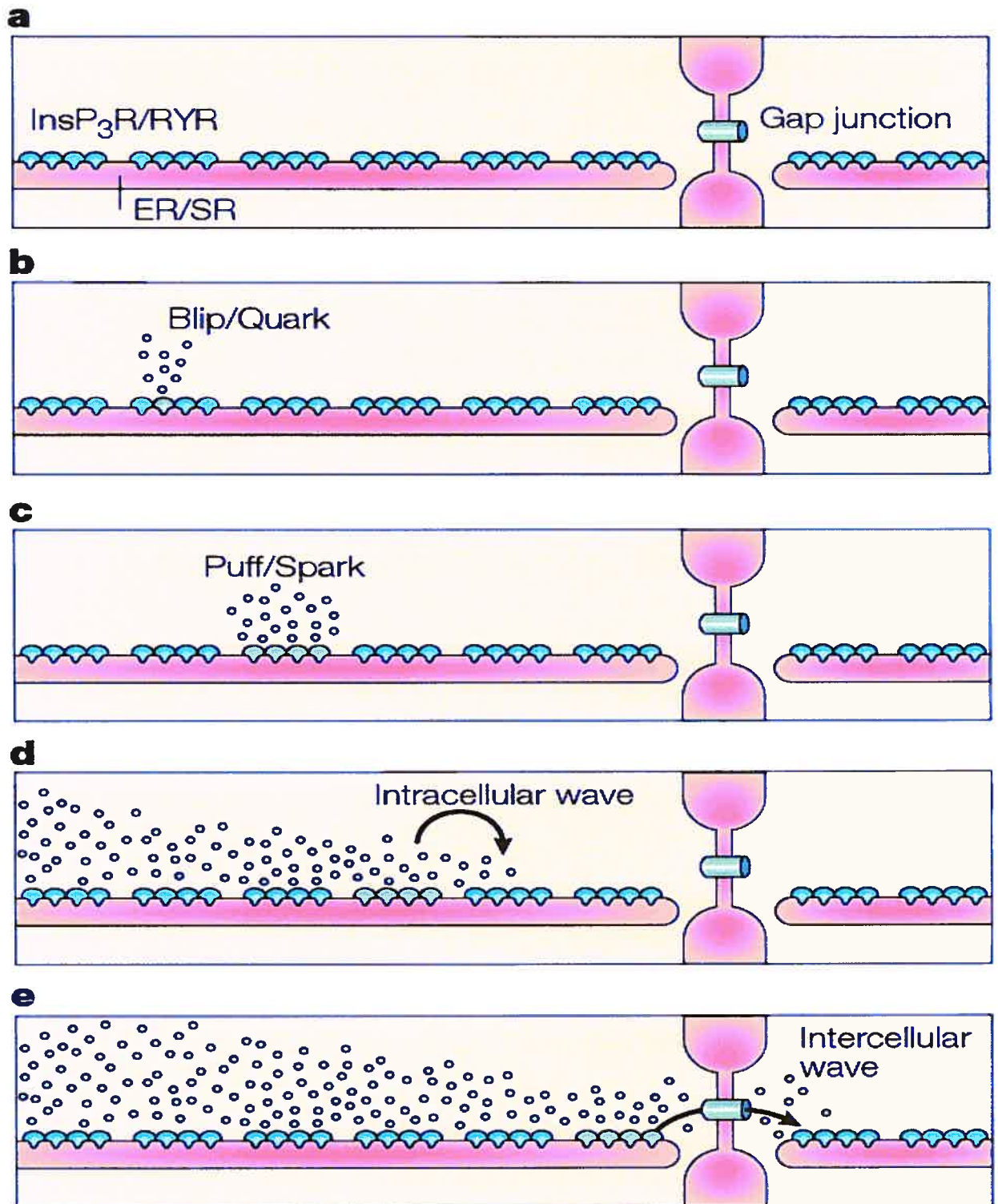


FIGURE 1.2 ORGANISATION SPATIO-TEMPORELLE DES SIGNAUX CALCIQUES GÉNÉRÉS LORS DE LA MOBILISATION DES RÉSERVES CALCIQUES

a) Distribution des récepteurs à l'IP₃ et des récepteurs à la ryanodine sur la membrane du RE. b) En réponse à un stimulus de faible intensité, initiation d'une première sortie localisée de calcium. c) Mobilisation calcique plus importante suite à un stimulus de plus forte intensité. d) La sortie initiale de calcium active les récepteurs avoisinants et génère une sortie massive de calcium. e) La présence de jonctions paracellulaires permet la transmission du signal calcique aux cellules avoisinantes. Tiré de Berridge et coll. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1:11 (2000)

L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE AU SEIN DU FOIE

I- Le système cellulaire hépatique

Le foie est un organe regroupé en unités fonctionnelles appelées lobules au centre duquel passe une veine centrale qui converge dans la veine hépatique. Les lobules sont principalement composés d'hépatocytes qui communiquent avec deux systèmes veineux : la veine centrale hépatique et la veine porte et sont traversées par un réseau de capillaires appelé sinusoides. De plus, un réseau de canalicules biliaires parcourent ces cellules et recueillent la bile sécrétée par ces cellules. Outre les hépatocytes, le foie comprend quatre autres populations cellulaires : 1) les cellules de Kupffer qui possèdent une activité phagocytaire et jouent le rôle de macrophages, 2) les cellules stellaires qui sont des sites de réserve de la vitamine A et des triglycérides, en plus de synthétiser certaines protéines et facteurs de croissance, 3) les cellules endothéliales qui sont une zone de contact entre le sang et les hépatocytes et finalement, 4) les cellules à granulation qui sont en fait des lymphocytes. La figure 1.3 de la page 37 représente la structure d'un lobule hépatique ainsi

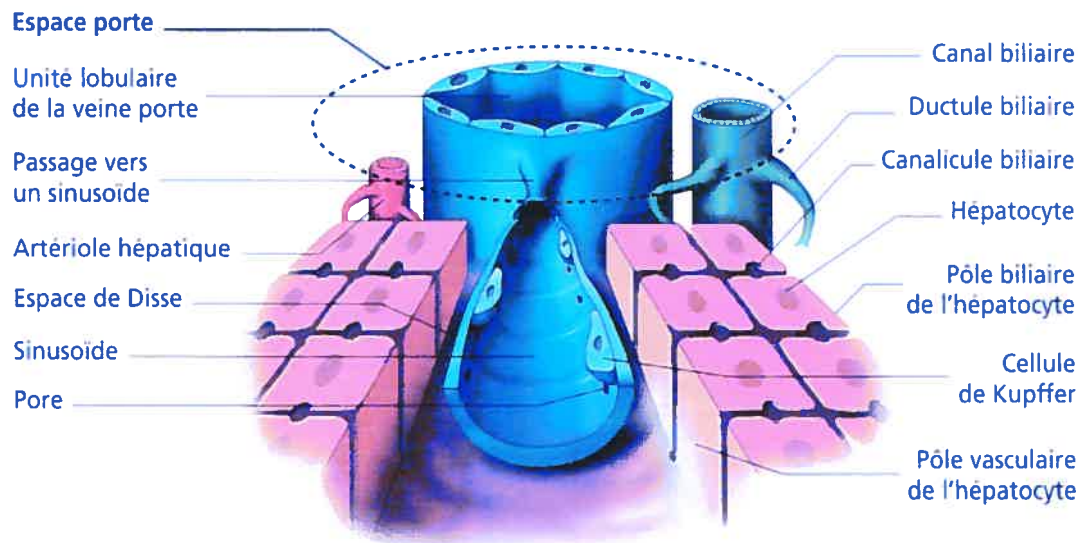
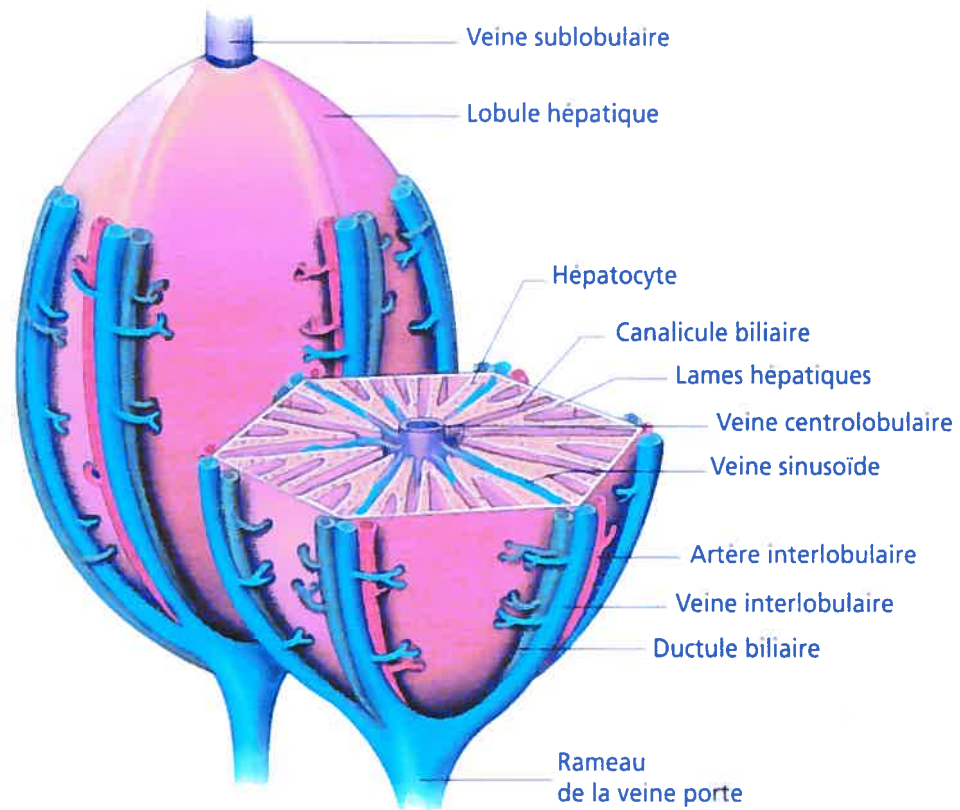


FIGURE 1.3 STRUCTURE ANATOMIQUE DU LOBULE HÉPATIQUE
 A- Représentation du lobule hépatique. B- Schéma de la connexion entre le lobule hépatique et l'espace porte. Tiré de Perlemuter L. (2000). *Anatomie et physiologie pour les soins infirmiers*.

II- La voie de signalisation du calcium intracellulaire et fonctions physiologiques associées

Le foie est un organe de détoxification en plus d'être le lieu de synthèse des acides biliaires. De plus, il est impliqué dans le métabolisme des glucides, lipides et protéines en agissant comme site de stockage, de catabolisme et de synthèse. Il est, entre autres, le lieu de synthèse de l'*insulin growth factor* (IGF-1), de certains facteurs de coagulation, des corps cétoniques, du cholestérol et des protéines plasmatiques. La voie de signalisation cellulaire du calcium est donc impliquée dans la réalisation de certaines de ces fonctions biologiques.

Le foie n'est pas un organe traditionnellement associé au métabolisme calcique mais, historiquement, il a été particulièrement privilégié pour l'étude des signaux calciques intracellulaires. Il constitue un organe dont la technique d'isolation est aisément réalisable et dont les cellules, une fois isolées, conservent leur homéostasie calcique pour permettre d'en faire l'étude à court terme. Ce fut d'ailleurs chez l'hépatocyte que les concepts d'oscillations calciques et de leur transmission interhépatocytaire ont été pour la première fois décrits (76).

Dans le foie, la signalisation calcique intracellulaire a tout particulièrement été étudiée chez l'hépatocyte. Sur la membrane plasmique de ce dernier, on retrouve plusieurs types de récepteurs tels les récepteurs V_2 qui lient la vasopressine, les récepteurs purinergiques de type P_2 qui lient l'ATP, les récepteurs α_{1b} -adrénergiques liant la noradrénaline et l'agent pharmacologique phényléphrine, le récepteur qui interagit avec l'angiotensine-II et des récepteurs qui reconnaissent certains facteurs de croissance tels l'EGF (*epidermal growth factor*) et le HGF (*hepatocyte growth factor*). L'interaction agoniste-récepteur induit une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ provenant soit de la mobilisation des réserves cellulaires par l'entremise de la production d' IP_3 et/ou de l'entrée de $[Ca^{2+}]_e$ par des canaux calciques

couplés ou non à la déplétion des réserves intracellulaires. On retrouve également des R_{Ry} sur des fractions microsomiales distinctes de celles présentant les RIP₃ de même que la machinerie conduisant à la production de l'ADPRc. Néanmoins, ces deux voies ne sont pas impliquées dans la voie de signalisation calcique de l'hépatocyte. De plus, certains sels biliaires tels l'acide lithocholique et tauroolithocholique initient une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ de l'hépatocyte qui possède les transporteurs nécessaires à leur importation cellulaire. On présume que cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ est responsable de la cholestase induite par ces sels biliaires (77). On a identifié récemment un CaSR sur l'hépatocyte (25). On présume que ce récepteur module la sécrétion biliaire, très sensible aux concentrations environnantes de calcium, en assurant la surveillance de la concentration de calcium retrouvée dans la bile. Finalement, l'hépatocyte est un modèle cellulaire particulièrement caractérisée par la présence de vagues et d'oscillations calciques initiées par certains agonistes tels la vasopressine et la phényléphrine. L'initiation de ce phénomène survient dans la région du pôle apical de l'hépatocyte et se répand en direction du pôle basal. De plus, la présence de jonctions paracellulaires permet la transmission et le synchronisme de ces oscillations calciques d'une cellule à l'autre. La propagation de ces vagues calciques est nécessaire au péristaltisme du canalicule biliaire qui traverse les hépatocytes permettant ainsi le transport de la bile (77). De plus, ces vagues calciques permettent de relier les hépatocytes de la région périportale à ceux de la région périveineuse. Les cellules de la région de la veine porte sont les seules à être en contact avec des terminaisons nerveuses qui, une fois stimulées, sécrètent de la noradrénaline. Ce neurotransmetteur induit un signal calcique intracellulaire qui se propage aux cellules avoisinantes par l'intermédiaire des jonctions paracellulaires. La propagation de cette vague calcique est nécessaire à l'activation d'enzymes impliqués dans le phénomène de glycolyse et de néoglucogenèse (76).

La signalisation calcique a également été identifiée au sein d'une autre population cellulaire intimement liée au foie soit les cellules du ductule biliaire (77). La voie de signalisation intracellulaire de calcium y est activée par l'action membranaire de l'ATP, l'UTP et de l'acétylcholine. Toutefois, l'implication physiologique de cette voie calcique n'a pas encore été élucidée.

L'activation de la voie de signalisation calcique est nécessaire à la réalisation de plusieurs fonctions physiologiques hépatiques mais peut également activer certains mécanismes pathologiques. L'inhibition du débit biliaire, la stimulation de la croissance cellulaire, de la glycogénolyse et même paradoxalement de la production hépatique de glucose sont toutes des fonctions physiologiques dépendantes de cette voie (77;78). De plus, l'apoptose causée par un carcinome hépatique, une hépatite virale, une cirrhose biliaire ou une intoxication hépatique est régulée par la concentration intracellulaire de calcium (77). L'activité de certaines enzymes, telles des protéases et des endonucléases, impliquées dans le processus d'apoptose ou de nécrose cellulaire est dépendante du statut calcique intracellulaire.

L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE AU SEIN DE L'OS ET DU CARTILAGE

I- Ostéoblastes

L'étude de l'homéostasie du calcium intracellulaire au sein de l'os a principalement été réalisée dans les ostéoblastes et les lignées cellulaires immortalisées d'origine ostéoblastique. On qualifie l'ostéoblaste de cellule hybride puisqu'elle possède à la fois des propriétés de cellules excitables et non-excitables. Ainsi, l'ostéoblaste est pourvu de canaux VOC et de canaux sensibles à une modification de la structure cellulaire telle un gonflement ou un étirement. La $[Ca^{2+}]_c$ basale a été estimée entre 50 et 150 nM et est maintenue grâce à la présence d'une pompe Ca^{2+} ATPase et d'un échangeur Na^+/Ca^{2+}

membranaire (79). La voie de signalisation calcique est associée à la réalisation des fonctions suivantes : la prolifération cellulaire, l'apoptose, le processus sécrétoire et l'expression génique en plus de moduler les flux calciques particulièrement importants pour le processus de formation osseuse.

II- Ostéoclastes

Les ostéoclastes possèdent également quelques éléments de machinerie cellulaire associée à l'homéostasie du calcium intracellulaire dont une pompe Ca^{2+} ATPase, un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ainsi qu'un CaSR. Toutefois, le rôle physiologique de la voie de signalisation calcique au sein de l'ostéoclaste n'a pas encore été clarifié et ce, même si cette cellule, par son contact direct avec la cavité de résorption osseuse, est soumise à de fortes variations de $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

III- Chondrocytes du cartilage de la plaque de croissance

On rapporte une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ des chondrocytes au fur et à mesure de leur maturation lors du processus d'ossification endochondrale (80). Cette augmentation est reliée au mécanisme d'apoptose des chondrocytes hypertrophiés, une étape terminale de leur différenciation. De plus, on présume que cette augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ permet de réduire l'expression du gène PTHrP, un élément anti-différentiateur des chondrocytes. Le gène PTHrP possède d'ailleurs un domaine génique sensible au calcium par lequel ce dernier régule négativement l'expression du peptide (81).

L'IMPLICATION DU CALCIUM INTRACELLULAIRE DANS LA SANTÉ HUMAINE : PERTURBATIONS DE L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE

Plusieurs conditions pathologiques résultent d'une altération de l'homéostasie du calcium intracellulaire. Toutefois, les pathologies semblent plus fréquemment associées à une hyperactivité de la voie de signalisation calcique, ce qui résulte en une augmentation anormale des concentrations cellulaires de calcium et en une perturbation des fonctions physiologiques associées (74). Certains auteurs surnomment ceci le paradoxe calcique puisque l'accroissement des concentrations intracellulaires de calcium résulte en fait d'un état de déficience marginale de calcium (82). Ce stade de carence active en premier lieu la sécrétion de PTH qui interagit avec son récepteur membranaire et cause subséquemment une hausse de la $[Ca^{2+}]_c$. L'hypertension, l'athérosclérose, le diabète, la maladie d'Alzheimer et le cancer colorectal sont des exemples de pathologies associées à une homéostasie cellulaire calcique dysfonctionnelle.

I- Perturbations de l'homéostasie du calcium : l'hypocalcémie chronique

1. Causes de l'hypocalcémie chronique

L'hypocalcémie survient généralement lorsqu'il y a un apport alimentaire insuffisant de calcium et de D, une diminution de l'absorption intestinale de calcium, une augmentation de son excrétion ou une perturbation de la mobilisation calcique des réserves de l'os. Ainsi, toutes causes nutritionnelles, génétiques ou métaboliques qui affectent l'un de ces paramètres peut entraîner l'apparition d'une hypocalcémie. Une seule étude rapporte l'apparition de symptômes hypocalcémiques qu'après un an de carence chez des prisonniers norvégiens volontairement privés de calcium alimentaire (35). Outre une

déficience alimentaire majeure en calcium rapportée surtout au sein des pays en développement (83) ou chez des individus aux habitudes alimentaires particulières (84) et conduisant à des niveaux sanguins abaissés de calcium, l'hypocalcémie est généralement secondaire à l'altération des hormones qui régulent le statut calcique extracellulaire. Le tableau I résume les causes d'hypocalcémies telles que décrites par Carpenter et Insogna (85) qui les classifient en fonction de la concentration de PTH. Ainsi, les hypocalcémies peuvent être secondaires à des anomalies dues à la 1) disponibilité de la PTH ou 2) résistance des organes-cibles aux actions de la PTH. Finalement, il existe des cas d'hypocalcémie où la sécrétion et l'action de la PTH sont tout à fait normales mais où d'autres facteurs demeurent alors en cause.

Tableau I. Principales causes de l'hypocalcémie chronique

CAUSES	PATHOLOGIES
1. ANOMALIES RELIÉES À LA DISPONIBILITÉ DE LA PTH	
Défaut du développement des glandes parathyroïdes	<ul style="list-style-type: none"> • Séquence DiGeorge • Hypoparathyroïdie idiopathique
Défaut de la production de l'hormone	<ul style="list-style-type: none"> • Hypoparathyroïdie (mutation causant la diminution de la capture de la pré-pro PTH dans le RE) • Mutations du CaSR • Maladie de Addison
Défaut de la sécrétion de l'hormone	<ul style="list-style-type: none"> • Hypomagnésémie
Destruction ou infiltration du tissu parathyroïdien	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer du sein avec métastase sur les glandes parathyroïdiennes • Thalassémie: dépôt de fer dans les glandes • Maladie de Wilson: dépôt de cuivre dans les glandes • Diabète et urémie • Irradiation
2. RÉSISTANCE AUX ACTIONS DE LA PTH	
Absence ou réduction de la réponse du second messenger: AMP _c suite à une stimulation par la PTH	<ul style="list-style-type: none"> • Pseudohypoparathyroïdie de type I a,b,c
Réponse de l'AMP _c normale mais absence de réponse physiologique	<ul style="list-style-type: none"> • Pseudohypoparathyroïdie de type II
3. SÉCRÉTION ET FONCTION NORMALE DE LA PTH	
Carence en vitamine D et/ou en calcium ou trouble du métabolisme de la vitamine D	
Déficience en D et/ou en calcium	<ul style="list-style-type: none"> • Exposition aux rayons U.V. insuffisante • Apports alimentaires de calcium et/ou de vitamine D insuffisants • Malabsorption secondaire à des maladies gastro-intestinales (Crohn, fibrose kystique, insuffisance pancréatique, cirrhose biliaire)
Altération du métabolisme de la D	<ul style="list-style-type: none"> • Déficience en 25OHD-1α hydroxylase (rachitisme de type I) • Anomalie du récepteur nucléaire à la vitamine D (rachitisme de type II) • Médicaments anticonvulsivants: augmentation du catabolisme de la D • Insuffisance rénale chronique • Maladies hépatiques
Augmentation de la liaison, complexation ou séquestration du calcium	
Hyperphosphatémie	<ul style="list-style-type: none"> • Lyse cellulaire tumorale/ Rhabdomyolyse • Insuffisance rénale • Administration excessive de phosphore par voie entérale et parentérale
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • Pancréatite aiguë • Utilisation de chélateurs (citrate/EDTA) • Alkalose

CAUSES	PATHOLOGIES
Afflux disproportionné de calcium dans l'os	
Accroissement de l'activité ostéoblastique	<ul style="list-style-type: none">• Hypocalcémie par avidité osseuse (<i>Hungry bone Syndrome</i>)• Métastases ostéoblastiques originant d'un cancer du sein ou de la prostate
Autres	<ul style="list-style-type: none">• Usage excessif de médicaments inhibiteurs de la résorption osseuse

Adapté de : (85-87)

2. Conséquences de l'hypocalcémie chronique

La réduction des niveaux circulants de calcium occasionne des perturbations au sein de plusieurs organes et tissus, affectant ainsi leurs fonctions et causant l'apparition de symptômes spécifiques et non-spécifiques.

a) Système nerveux central

Des convulsions, de l'irritabilité et des modifications de l'état mental sont des manifestations cliniques associées à l'hypocalcémie. De plus, on rapporte de la paresthésie et une excitabilité neuromusculaire accrue se traduisant à l'extrême par une tétanie et l'apparition de spasmes musculaires de la main et du visage communément appelés signes de Trousseau et de Chvostek (86).

b) Système cardiovasculaire

Un état hypocalcémique est caractérisé par une altération de la contractilité cardiaque, de l'arythmie, de la bradycardie et de l'hypotension. Ces manifestations traduisent l'importance du calcium dans le mécanisme de contraction cardiaque et de contraction des cellules musculaires lisses.

c) Système reproducteur

Chez le modèle animal d'hypocalcémie chronique, les femelles sont fertiles, peuvent mener à terme une gestation et sont aptes à allaiter. Toutefois, elles démontrent certaines anomalies lorsqu'elles sont comparées à des femelles normocalcémiques. En effet, on note une fertilité diminuée causée par un cycle menstruel irrégulier, des portées grandement réduites et les ratons présentent des retards de croissance sévères.

Ces défauts peuvent toutefois être causés par la déficience en D comme telle puisque la présence d'un VDR_n a été démontré dans l'utérus, les ovaires, les trompes de Fallope, les glandes mammaires, le placenta ainsi que dans les glandes endocrines impliquées dans la sécrétion des hormones reproductrices telles l'hypophyse et l'hypothalamus. De plus, les

souris $VDR^{-/-}$ ont une fertilité grandement diminuée. Mais la correction des concentrations sériques de calcium par une diète riche en calcium, en phosphore et contenant du lactose a permis de corriger les défauts du système reproducteur chez le modèle génétique et nutritionnel de déficience en D (88). Cette observation laisse présumer que l'hypocalcémie plutôt que la déficience en D est le principal facteur associé à ces défauts.

d) Système endocrinien

La mesure des concentrations sériques de certaines hormones ont démontré que les animaux hypocalcémiques chroniques présentent généralement des niveaux hormonaux sous-optimaux lorsque comparés à des animaux normocalcémiques. Ainsi, ces animaux présentent entre autres une insulino-pénie (89) et une réduction de la sécrétion hypophysaire de l'hormone de croissance et de la prolactine (90). Ces observations dénotent l'importance du calcium dans le processus sécrétoire.

e) Métabolisme osseux

i) Maladies osseuses métaboliques

Chez l'animal, les conséquences d'une carence en calcium sur l'os ont été largement étudiées et varient en fonction de plusieurs facteurs : 1) le type de diète administrée pour instaurer la carence, 2) le type de carence: déficience en calcium couplée ou non à une déficience en D et déficience primaire en D avec ou sans hypocalcémie, 3) le stade de la vie où la carence est amorcée : lors du sevrage, lors de la croissance, en période d'allaitement, lors de la vie adulte, après la simulation d'un état ménopausal par ovariectomie (OVX), 4) la durée de l'étude, 5) les variables (paramètres histologiques, enzymatiques, densitométriques ou biomécaniques) et 6) le type d'os (cortical ou trabéculaire) étudié.

Chez l'homme, on associe généralement l'hypocalcémie à deux maladies osseuses métaboliques soit le rachitisme, chez l'enfant en croissance et l'ostéomalacie, chez l'adulte. Le rachitisme est caractérisée par un défaut ou un ralentissement du processus de

minéralisation des os en croissance résultant en une déformation des os longs et de la cage thoracique et à une propension élevée aux fractures costales. Les enfants souffrant de rachitisme ont les jambes profondément arquées et présentent un rosaire rachitique sur le tronc. Cette maladie particulièrement prévalente dans plusieurs pays d'Afrique et d'Asie, refait maintenant surface dans certains pays développés de l'Europe du Nord de même qu'aux États-Unis (91). Ces cas semblent être causés par un état d'insuffisance ou de déficience en D. Les enfants qui en souffrent présentent un ensemble de facteurs de risque tels l'allaitement exclusif sans aucun supplément de D, une alimentation végétarienne ou macrobiotique, la localisation géographique en haute altitude et l'absence d'exposition solaire adéquate. Néanmoins, des cas de rachitisme ont été rapportés dans des pays tropicaux où l'exposition aux rayons ultraviolets est libérale et n'est donc pas un facteur de risque (83;92). De plus, ces enfants ne sont pas déficients en D et développent un rachitisme beaucoup plus tardivement. L'apport calcique est néanmoins très faible (inférieur à 200 mg par jour) et on présume que cette déficience est à la base de ce rachitisme. Encore ici, ce ne sont pas tous les enfants qui développent cette maladie en présence d'un faible apport calcique. On suppose que certains individus sont moins aptes à s'adapter à un stress calcique, que la durée d'allaitement a été insuffisante pour fournir un apport calcique adéquat pour permettre la formation de réserves corporelles suffisantes ou encore qu'ils ont une alimentation particulièrement riche en éléments inhibant l'absorption intestinale de calcium (93).

Le cas particulier du prématuré

L'altération du métabolisme phosphocalcique de l'enfant prématuré est bien documentée. En effet, dès les premières heures de sa vie, l'enfant prématuré développe une hypocalcémie transitoire d'une durée de 48 à 72 heures (94). Cette hypocalcémie est secondaire à l'hypoparathyroïdie développée en période prénatale en réponse à

l'hypercalcémie fœtale et qui reste présente pendant quelques jours suivant la naissance. Ces perturbations se résorbent habituellement avec l'âge mais elles peuvent, dans la moitié des cas, conduire au développement d'un rachitisme. Les enfants dont l'âge gestationnel est inférieur à 28 semaines, les bébés de très petits poids (inférieur à 1 kg) et les bébés de sexe masculin sont plus à risques de développer un rachitisme (95). Une étude récente réalisée en Afrique rapporte une incidence de rachitisme de 80% chez les nourrissons mâles alors qu'elle n'est que de 50% pour les filles (96). Malheureusement, les auteurs n'élaborent pas sur les hypothèses pouvant expliquer cette distinction. L'enfant prématuré est au prise avec un défi physiologique de taille. Privé des apports équilibrés de calcium et de phosphore provenant du transfert placentaire, il devient hautement dépendant de l'apport alimentaire pour accomplir les dernières étapes du processus de minéralisation osseuse qui survient principalement (80%) durant le dernier trimestre de grossesse. De plus, l'absence d'un VDR_n intestinal mature limite ses capacités d'absorption de phosphore et de calcium (97). Ainsi, l'administration de lait maternel, pauvre en D, sans aucune autre forme de supplémentation conduit à l'apparition d'une hypophosphatémie sévère précédant l'apparition du rachitisme (98). L'analyse biochimique d'un enfant né prématurément et souffrant de rachitisme démontre que ces enfants ont des concentrations sanguines de calcium, magnésium, PTH et métabolites de la D ($25(OH)D$ et $1,25(OH)_2D$) dans les limites normales (99). Les enfants démontrent une hypophosphatémie, une excrétion urinaire de phosphore quasi non-délectable et une hypercalciurie secondaire à une inhibition de la réabsorption tubulaire rénale de calcium causée par l'hypophosphatémie (100). Ainsi, le rachitisme du prématuré semble être de nature hypophosphatémique plutôt que causé par une déficience en calcium ou en D. La réversibilité du rachitisme s'observe suite à une supplémentation combinée et équilibrée de phosphore et de calcium. En effet, la seule administration d'un supplément de phosphore peut conduire à l'apparition d'une

hypocalcémie causée par la chélation intestinale du calcium par les hautes doses ingérées de phosphore (101).

ii) Paramètres biomécaniques

Des animaux, chez qui on a instauré une diète déficiente en calcium, présentent généralement une réduction de la taille des os, une résistance diminuée des os à un stress physique et une susceptibilité accrue aux fractures et ce, malgré une calcémie encore normale. On rapporte les mêmes résultats chez des animaux déficients en D depuis le sevrage mais qui sont demeurés normocalcémiques grâce à un apport alimentaire suffisant de calcium (102).

iii) Paramètres histologiques

Règle générale, une privation alimentaire de calcium, chez des animaux initialement normocalcémiques, cause un accroissement de la résorption osseuse et une augmentation conséquente de l'aire de la cavité médullaire. Toutefois, on note une différence entre l'effet pro-résorption de la carence calcique seule et celui observé lors de la déficience en D doublée d'une hypocalcémie. On rapporte une hausse significativement plus élevée des surfaces de résorption osseuse dans le premier cas comparativement au second (103).

Au sein du processus de minéralisation osseuse, la carence en calcium conduit à un accroissement de l'ostéoïde indicateur d'un retard du processus de minéralisation (104). On rapporte néanmoins une hausse du nombre d'ostéoblastes qui demeurent cependant inactifs (105). Parallèlement, on observe une réduction du degré d'apposition du minéral qui semble directement relié à l'état hypocalcémique ou hypophosphatémique plutôt qu'à la déficience en D ou à l'hyperparathyroïdie secondaire (103). Ces perturbations sont corrigées suivant une réplétion de calcium alimentaire et ce, indépendamment des niveaux de D ou de PTH.

1.3 LE SYSTÈME ENDOCRINIEN DE LA VITAMINE D

GENERALITÉS

La D est un des éléments essentiels au maintien de l'homéostasie calcique. On associe l'appellation « système endocrinien » à la D car celle-ci remplit tous les critères caractérisant un tel système. Contrairement aux vitamines, 1) la D est synthétisée par l'organisme, 2) la D, dans sa forme native, est un composé inactif, 3) la 1,25(OH)₂D, soit le produit di-hydroxylé de la D est produite à un site distant du lieu de synthèse de la D et 4) la 1,25(OH)₂D est une véritable hormone puisqu'elle agit sur des organes-cibles via un récepteur nucléaire qui initie des voies de signalisation propres au système de la D. Toutefois, en absence de synthèse cutanée de D, un apport exogène est essentiel et, à ce titre, elle remplit, également les critères de vitamine.

MÉTABOLISME GÉNÉRAL

1- Synthèse cutanée et apport exogène de vitamine D

La D est un composé liposoluble qui existe sous deux formes : le cholécalciférol ou D₃ issu de sources animales et l'ergocalciférol ou D₂ qui provient de sources végétales. La D₃ est produite principalement par la peau lors de l'exposition aux rayons ultraviolets d'une composante membranaire épidermique et dermique, le 7-dehydrocholesterol. Grâce à l'énergie fournie par les rayons ultraviolets, ce dernier est converti en prévitamine D₃ qui est rapidement transformé, grâce à la chaleur du corps, en D₃ qui quitte la membrane plasmique pour être, par la suite, transloquée vers le milieu extracellulaire où elle se lie à sa protéine de liaison, la DBP (*D-binding protein*). Une exposition prolongée aux rayons

ultraviolets ne cause pas d'hypervitaminose D₃ puisque la prévitamine D₃ emprunte alors une voie métabolique conduisant à la formation de deux produits biologiques inertes soit le lumistérol et le tachystérol. Plusieurs facteurs physiologiques, géographiques et environnementaux viennent influencer la production cutanée de D₃.

Il existe peu de sources alimentaires de D. En effet, elle se retrouve à l'état naturel dans les poissons gras, l'huile de foie de morue et le jaune d'œuf. L'apport exogène de cette vitamine dépend donc, en grande partie, de la fortification des aliments tels le lait et la margarine. La D alimentaire est, par la suite, incorporée dans les chylomicrons et présentée au foie par la veine porte où une extraction fractionnelle de l'ordre de 30 à 50% est observée (106). La fraction non-captée par le foie est mise en circulation systémique où elle circule principalement liée à la DBP. Elle peut être mise en réserve dans les muscles et le tissu adipeux où sa remise en circulation semble peu influencée par le statut nutritionnel ou hormonal en D. Elle est principalement libérée suite à la lipolyse et à la protéolyse (107). Les concentrations sanguines de D sont faibles soit de l'ordre de 0 à 310 nmol/L et ne reflètent pas l'état nutritionnel en D.

II- Hydroxylation en C-25

Tel que mentionné ci-haut, la D est inactive et doit subir deux hydroxylations afin d'acquérir son pouvoir biologique. La D est hydroxylée une première fois en C-25 par une enzyme mitochondriale, la D25-hydroxylase ou CYP27A. Chez l'homme, seule l'enzyme mitochondriale a été identifiée alors que chez l'animal une enzyme microsomiale semble également existée. Elle n'a, toutefois, été clonée que chez le porc (2). La CYP27A, fait partie de la famille des cytochromes P450 et sert également à l'hydroxylation du cholestérol et des sels biliaires. L'enzyme est localisée dans les hépatocytes, et génère la 25-hydroxyvitamine D ou calcidiol (25(OH)D), soit la principale forme circulante de la D (25-125 nmol/L) dont la demie-vie est estimée à deux à trois semaines chez l'humain. Les

concentrations sanguines de 25(OH)D sont donc le meilleur reflet du statut nutritionnel en D. La D-25 hydroxylase est régulée de façon négative par trois éléments : les concentrations du précurseur, du produit et de la 1,25(OH)₂D.

III- Hydroxylation en C-1α

Le site principal d'hydroxylation de la 25OHD en C-1α se situe au rein quoique plusieurs sites extra-rénaux aient été identifiés. La 25OHD-1α hydroxylase ou CYP27B1 est localisée dans les mitochondries des tubules proximal et distal. La 1,25(OH)₂D est exportée vers la circulation systémique où elle circule à des concentrations mille fois inférieures (38-144 pmol/L) à celle de la 25(OH)D. La CYP27B1 est également membre de la famille des cytochromes P450 et est sujette à l'influence de plusieurs facteurs régulateurs dont le plus important est la PTH. En réponse à une baisse de calcium sérique, la production de PTH est augmentée, ce qui stimule l'enzyme et la production de 1,25(OH)₂D. Le calcium, le phosphore, la 1,25(OH)₂D elle-même, les estrogènes, la prolactine, la calcitonine et l'hormone de croissance sont tous des facteurs exerçant également un contrôle sur l'enzyme. Les concentrations sériques de 1,25(OH)₂D ne constituent pas un reflet du statut nutritionnel en D. En effet, ces concentrations peuvent être faibles, normales voire élevées en carence vitaminique.

La présence de CYP27B1 a également été identifiée dans plusieurs autres tissus dont le placenta ainsi que chez le fœtus (13;108). Le fœtus semble pouvoir produire la 1,25(OH)₂D nécessaire pour combler une partie de ses besoins calciques nécessaires à la minéralisation squelettique lors du troisième trimestre de la grossesse. On rapporte également la production extrarénale de 1,25(OH)₂D par certaines cellules (kératinocytes, macrophages et monocytes) et lors de certaines pathologies telles la sarcoïdose (2). La 1,25(OH)₂D ainsi produite localement a une action autocrine ou paracrine. Néanmoins, lors d'insuffisance rénale chronique conduisant à une baisse importante de CYP27B1, les concentrations de

1,25(OH)₂D sont faibles voire négligeables, ce qui indique que le rein est l'organe principal responsable de la production de 1,25(OH)₂D et de son exportation systémique.

IV- Hydroxylation en C-24

La 25(OH)D tout comme la 1,25(OH)₂D peuvent être hydroxylées en position C-24 par la CYP24 et les produits de cette réaction, la 24,25dihydroxyvitamine D (24,25(OH)₂D) et 1,24,25 dihydroxyvitamine D (1,24,25(OH)₂D) sont subséquentement catabolisés en acide calcitroïque et excrétés dans l'urine. Il est à noter que la 25(OH)D ainsi que la 1,25(OH)₂D sont les substrats de plusieurs autres hydroxylases. Ainsi, plusieurs métabolites dont l'activité biologique est faible ou méconnue sont également produits. Toutefois, la CYP24 demeure la voie catabolique principale. La 1,25(OH)₂D possède la caractéristique de réguler son propre catabolisme et donc de prévenir un état d'intoxication. En effet, la régulation de la CYP24 dépend du complexe VDR_n-1,25(OH)₂D puisque son gène compte au moins deux VDRE. La localisation de CYP24 est ubiquitaire, on le retrouve donc dans le rein, l'intestin et l'os ainsi que dans plusieurs autres tissus ou organes possédant le VDR_n (2). La présence de cette enzyme dans les cellules extra-rénales semble nécessaire au contrôle local des concentrations cellulaires de 1,25(OH)₂D (2).

La création d'une souris transgénique pourvue d'un gène non-fonctionnel de CYP24 (CYP24^{-/-}) a permis de cerner le rôle de cette enzyme et/ou de ses produits. En effet, un doute persiste dans la littérature sur l'importance de la 24,25(OH)₂D. Ainsi, les animaux CYP24^{-/-} présentent des concentrations anormalement élevées de 1,25(OH)₂D ainsi que certains signes d'intoxication à la D tels l'hypercalcémie et la néphrocalcinose. Les défauts d'ossification intra-membranaires observés chez la souris CYP24^{-/-} semblent être secondaires à l'excès de 1,25(OH)₂D lors d'une étape particulièrement critique du développement plutôt qu'à l'absence de métabolites 24-hydroxylés (109). A ce jour, l'importance biologique de ces métabolites reste encore incertaine (110).

V- Excrétion

Outre son rôle anabolique dans la production de 25(OH)D, le foie participe également à l'excrétion des métabolites de la D. En effet, il joue un rôle important dans la conjugaison des métabolites de la vitamine et dans leur excrétion biliaire subséquente. Les métabolites ainsi excrétés retournent dans l'intestin grêle et certains subissent une réabsorption entérohépatique. Ce cycle a néanmoins une importance physiologique négligeable puisque plusieurs de ces métabolites sont pour la plupart inactifs et peu d'entre eux se retrouvent en circulation systémique (111). Certaines études ont démontré qu'une quantité négligeable de 25(OH)D et de 1,25(OH)₂D intacte était ainsi excrétée dans la bile puis réabsorbée dans l'intestin grêle, n'apportant aucune contribution aux concentrations sanguines de ces deux substances (112). Lorsque les concentrations sanguines des différents métabolites de la D sont normales, le cycle entérohépatique demeure une voie mineure d'excrétion qui devient toutefois fort importante en présence de concentrations très élevées voire toxiques.

MODES D'ACTION

I- Récepteur nucléaire de la vitamine D

La D possède un récepteur nucléaire dans toutes les cellules cibles du système endocrinien de la D. La présence de groupements hydroxyles situés en position C-1 α et C-25 influence l'affinité du ligand pour le VDR_n. Ainsi, la 1,25(OH)₂D possède une affinité d'environ 500 fois plus grande pour le VDR_n que son précurseur, la 25(OH)D (2). Le VDR_n ne lie pas la 24,25(OH)₂D et la 1,24,25(OH)₂D₃ n'est qu'un agoniste partiel. Le VDR_n fait partie de la famille des récepteurs stéroïdiens qui compte, entre autres, les récepteurs aux estrogènes, à la progestérone, aux androgènes, à l'hormone thyroïdienne, aux glucocorticoïdes et à l'acide rétinoïque (AR). Ces récepteurs interagissent par l'intermédiaire de leur ligand

propre à la stimulation ou la répression de gènes spécifiques au sein des tissus cibles.

Le VDR_n est une protéine de 48 et 60 kilodaltons selon l'espèce mais dont la séquence en acides aminés est fortement conservée entre espèces. Elle comprend plusieurs domaines fonctionnels dont un site de liaison du ligand, une région responsable de sa localisation nucléaire, un site d'ancrage à l'ADN situé sur la portion N-terminale de la protéine, un site nécessaire à son hétérodimérisation avec les récepteurs X de l'AR (RXR α) et finalement, une portion requise à l'activation de la transcription génique. Le VDR_n compte également deux doigts de zinc responsables de la liaison à l'ADN. Pour se fixer sur l'ADN et contrôler l'expression génique, le complexe VDR_n-1,25(OH)₂D doit former un hétérodimère avec RXR α . Plusieurs études laissent croire que l'hétérodimérisation prend place dans le cytoplasme et qu'ensuite ce complexe est importé dans le noyau (113;114). Il a également été rapporté que le VDR_n peut exceptionnellement former un homodimère. Ce n'est que sous forme homo- ou hétérodimérique que le VDR_n lie la séquence d'acides nucléiques spécifiques, le VDRE, dont la séquence consensus [G/A)GGT(G/C)A] est située dans la région promotrice des gènes cibles. La liaison du complexe avec le VDRE entraîne un changement dans la conformation du VDR_n et de l'ADN qui permettent le recrutement de coactivateurs nécessaires à l'initiation de la transcription (2).

On rapporte que le statut calcique cellulaire influence la liaison du VDR_n à l'ADN. En effet, par un mécanisme impliquant la calréticuline, cette dernière contribue à masquer le site de liaison du complexe VDR_n-RXR α de l'ADN (115;116). Même si la calréticuline demeure une protéine microsomiale, elle semble pouvoir se déplacer vers le noyau par un mécanisme encore inconnu. Ce mode d'action peut, entre autres, expliquer la régulation négative qu'exerce la 1,25(OH)₂D sur la répression de la transcription du gène de la PTH.

Plusieurs gènes exhibent des VDRE dont beaucoup sont associés soit au métabolisme du calcium ou de la D elle-même. Il s'agit de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine, de la 24- et

1- α hydroxylase, des CaBP 9 et 28k et de la PTH. De plus, la présence de VDRE a été identifiée au sein de gènes non-traditionnellement associés au système endocrinien de la D. Cette liste inclut le gène de *c-fos*, PTHrp, p21, β_3 -intégrine, fibronectine et du facteur natriurétique (ANP) (2). L'identification de VDRE au sein des deux hydroxylases cible l'importance de la 1,25(OH)₂D dans la régulation de sa synthèse et de son catabolisme. Le gène de la 24-hydroxylase demeure un cas exceptionnel puisque son site promoteur comporte deux VDRE dont la double présence est requise pour une inductibilité maximale par le complexe VDR_n-1,25(OH)₂D.

II- Récepteur membranaire de la vitamine D

La présence d'un récepteur membranaire à la D (VDR_m) est sujet à débat au sein de la communauté scientifique. Il est certes intéressant de postuler que la 1,25(OH)₂D, à l'instar de plusieurs autres hormones de nature stéroïdienne telles les estrogènes et les hormones thyroïdiennes (117), possède elle aussi un récepteur membranaire sur lequel elle peut se lier, activer certaines voies de signalisation cellulaire et moduler certaines fonctions physiologiques. Toutefois, ce récepteur n'a pas encore été cloné. Jusqu'à présent, le VDR_m a été identifié chez quelques espèces seulement et sur un petit nombre de cellules. Un anticorps, Ab99, qui reconnaît la portion N-terminale d'une protéine candidate, a été développé par l'équipe de Nemere (118;119). Des études suggèrent sa présence dans la membrane plasmique des chondrocytes de rat, des cellules intestinales de poulet, des myoblastes, dans plusieurs lignées cellulaires ostéoblastiques et ostéoblastes en culture primaire ainsi que dans plusieurs organes dont le foie et le colon (120-122). Certains auteurs suggèrent que la présence du VDR_m explique certaines actions non-génomiques de la 1,25(OH)₂D (117). En effet, la rapidité de ces actions, qui est souvent de quelques minutes, exclut la possibilité d'une action génomique caractérisée par un délai d'action allant de six à huit heures.

Interrelation avec le calcium intracellulaire

Les premières études qui ont décrit l'influence de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ont été réalisées sur des ostéoblastes en culture primaire et sur des lignées cellulaires ostéoblastiques (121;123). L'action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est rapide (quelques millisecondes) et survient à des concentrations physiologiques (entre 1 et 10 pM). De plus, des travaux effectués sur des lignées de cellules ostéoblastiques dépourvues du VDR_n , les cellules *ROS 24/1*, rapportent une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en réponse à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (123). Ces résultats suggèrent que le VDR_n n'est pas requis pour influencer l'homéostasie du calcium intracellulaire.

Par la suite, des résultats analogues ont été obtenus, pour la plupart, sur des cellules immortalisées. Ainsi, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ provoque une hausse rapide et soutenue de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ chez les cellules CACO-2 (originant d'un carcinome du colon), MCF-7 (carcinome du sein), FRTL-5 (glande thyroïde), GH_4C_1 (glande pituitaire), RINr 1946-38 (cellule β pancréatique) ainsi que chez des kératinocytes humains, des entérocytes et des hépatocytes de rat (122;124). L'augmentation initiale rapide de calcium résulte de la mobilisation, par l'intermédiaire de la production d' IP_3 , des réserves cellulaires calciques alors que la phase de réponse soutenue provient d'un influx calcique par les VOC de type L ou encore par le mécanisme d'entrée capacitative de calcium (124). Toutefois, le mécanisme précis expliquant cette action rapide de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est encore à élucider. Les différents travaux réalisés sur ce sujet suggèrent l'implication du VDR_m . L'interrelation entre le système endocrinien de la D et l'homéostasie intracellulaire de calcium permet d'expliquer certaines actions rapides de l'hormone. Ainsi, il a été démontré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ active la PKC, stimule la libération du DAG et induit la phosphorylation des résidus sérine-thréonine et tyrosine de plusieurs protéines (119;124). L'activation de ces voies de signalisation conduit à la réalisation de diverses réponses physiologiques dont peu

ont été, jusqu'à présent, clairement identifiées.

Récepteur membranaire de la 24,25(OH)₂D

La 24,25(OH)₂D a longtemps été considérée comme un produit inactif de la voie de catabolisme de la 25(OH)D et de la 1,25(OH)₂D et non comme un métabolite capable d'initier des actions endocrines spécifiques. Le développement de la souris CYP24^{-/-} qui est dépourvue de 24,25(OH)₂D sérique a permis de postuler que ce métabolite joue certains rôles physiologiques bien précis malgré le fait qu'aucun récepteur nucléaire ou membranaire liant ce métabolite n'aient pas été formellement identifiés (110).

Des travaux récents visant à identifier et caractériser la présence d'un récepteur membranaire à la 24,25(OH)₂D ont rapporté la présence de sites de liaison de ce métabolite sur les lysosomes et la membrane plasmique de l'intestin de poulet ainsi que sur les chondrocytes de la plaque de croissance et les ostéoblastes (120;125). Ce récepteur est tout à fait distinct du VDR_m et sa fonction physiologique est encore inconnue quoiqu'il est rapporté qu'il antagonise l'effet stimulant de la 1,25(OH)₂D sur l'absorption intestinale de calcium. Le seul exemple illustrant cet effet antagoniste de la 24,25(OH)₂D a été rapporté chez les poissons d'eau douce, pauvre en calcium, qui doivent s'adapter à un environnement d'eau salée riche en calcium. Chez ces espèces, on a rapporté une réduction des niveaux du VDR_m des entérocytes couplée à une augmentation des récepteurs liant la 24,25(OH)₂D (117).

III- Fonctions traditionnelles

Alors que la PTH assure la régulation immédiate et à court terme de l'homéostasie phosphocalcique, la 1,25(OH)₂D vise plutôt le maintien à long terme de concentrations sanguines optimales de calcium et de phosphore pour assurer certaines fonctions cellulaires vitales telles la conduction neuromusculaire et l'ossification. Pour ce faire, elle agit sur l'intestin grêle en favorisant l'absorption intestinale de calcium et de phosphore et sur l'os


en permettant la mobilisation du calcium et du phosphore des réserves osseuses par son effet stimulant sur le processus de résorption osseuse. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ peut également influencer la réabsorption rénale de calcium quoique cette action soit modeste.

1. Effets sur l'intestin

L'absorption intestinale de calcium compte trois phases: l'entrée dans la cellule intestinale du côté apical, la diffusion intracellulaire et l'extrusion à travers la membrane basolatérale (126). L'entrée calcique à la bordure en brosse se fait par l'intermédiaire de canaux calciques voltages indépendants qui ne sont pas sous le contrôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. L'identification d'un VDRE dans la région promotrice des gènes ECAC, des canaux calciques localisés sur les cellules épithéliales de l'intestin grêle, suggère toutefois l'implication de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans le processus d'entrée de calcium dans l'entérocyte (44;127;128).

La diffusion intracellulaire du calcium se fait grâce à une protéine de liaison possédant une haute affinité pour le calcium appelée *calbindin* (CaBP). Outre le transport intracellulaire de calcium, ces CaBP constituent également un système de tampon du calcium cytoplasmique. Il existe deux CaBP de poids moléculaire différent, une de 9 kDa (CaBP_{9k}) qui prévaut chez les mammifères et une de 28 kDa (CaBP_{28k}) identifiée chez les mammifères de même que chez les oiseaux (2). Un VDRE a été identifié sur les gènes des deux protéines et leur expression génique est fortement régulée par le complexe VDR_n - $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.


Une fois à la membrane basolatérale, le calcium est extrait de la cellule contre un gradient électrochimique à l'aide d'une pompe $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$, dont l'expression génique est également sous la gouverne du complexe VDR_n - $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. La membrane basolatérale de la cellule intestinale possède aussi un échangeur d'ions $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, responsable de l'extrusion du calcium dans une proportion de 20%. Cet échangeur fonctionne toutefois



Le phénomène physiologique le plus documenté concernant une action non-génomique de la D est également associé à l'absorption intestinale de calcium. Il s'agit du transport intestinal rapide de calcium appelé *transcaltachia*, un phénomène qui a été caractérisé sur le duodénum de poulet en condition isolée-perfusée. Les résultats de ces études suggèrent que le calcium est capté par la bordure en brosse de l'intestin grêle par un système de vésicules associées à la structure de la membrane, ces vésicules fusionnent avec les lysosomes qui se déplacent alors vers la membrane basolatérale de l'entérocyte. Les lysosomes s'associent alors à la membrane et relâchent le calcium par un phénomène d'exocytose. Ce mécanisme d'exocytose est régulé par une élévation de calcium intracellulaire, elle-même causée par l'action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur le VDR_m (129;130). On rapporte, de plus, qu'en présence d'une déficience en D, ce système de transport demeure inopérant, ce qui souligne l'importance de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ circulante pour la réalisation de ce processus.

2. Effets sur le rein

Le calcium est principalement réabsorbé dans la partie distale du tubule rénal. On retrouve plusieurs protéines impliquées dans les échanges de calcium au sein des cellules du tubule distal dont, entre autres, ECAC1, la CaBP_{28k} et la pompe $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ située sur la membrane basolatérale. Par le contrôle génique de ces protéines, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimule le processus de réabsorption rénale du calcium par un mécanisme comparable au processus d'absorption intestinale (131;132). Toutefois, contrairement au processus d'absorption intestinale, la D ne semble pas être impliquée dans la réabsorption rénale de phosphore, phénomène qui s'effectue essentiellement au sein du tubule proximal et qui est régulée principalement par la PTH.



3. Effets sur l'os

L'action de la D sur l'os peut être subdivisée en deux : 1) un rôle dans la mobilisation du calcium de l'os dans le but de maintenir constantes les concentrations sanguines de calcium et 2) une implication dans la physiologie osseuse par son action sur les ostéoblastes et les ostéoclastes.

a) Rôle dans le maintien de la calcémie

Il est bien documenté que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit sur le processus de résorption osseuse en stimulant l'ostéoclastogénèse. Deux hypothèses sont actuellement à l'étude pour tenter de comprendre le rôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans l'ostéoclaste. La première suggère une action de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur les cellules-souches de la moëlle osseuse, permettant ainsi leur différenciation en ostéoclastes. L'autre hypothèse implique que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ module la sécrétion de facteurs stimulant l'ostéoclastogénèse et le processus de résorption osseuse tels l'IL-1, -6 et -11. Récemment, il a été montré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ par son interaction avec le VDR_n des cellules-souches des ostéoblastes, régule à la hausse l'expression du RANKL, un facteur qui favorise la différenciation des ostéoclastes (133).

Des études *in vitro* réalisées sur des co-cultures cellulaires soutiennent l'importance du complexe VDR_n - $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans le processus de différenciation des ostéoclastes médiée de façon paracrine par les ostéoblastes. Ainsi, des cellules souches et ostéoblastiques isolées de souris $\text{VDR}^{-/-}$ et cultivées en présence de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ avec des cellules isolées de la rate de souris normales ne permettent pas la différenciation de ces cellules en ostéoclastes. Toutefois, lorsque les cellules souches et ostéoblastiques proviennent de souris normales et sont mises en culture avec des cellules de la rate de souris $\text{VDR}^{-/-}$, ces dernières se différencient en ostéoclastes (134). Ainsi, un VDR_n fonctionnel sur les ostéoblastes semble essentiel pour médier l'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur la différenciation ostéoclastique *in vitro*. Cette observation n'est pas reproduite *in vivo* car curieusement, les

ostéoclastique *in vitro*. Cette observation n'est pas reproduite *in vivo* car curieusement, les souris $VDR^{-/-}$ exhibent un nombre normal voire élevé d'ostéoclastes, ce qui suggère l'implication d'autres voies de signalisation telles celle de la PTH et de l'IL-11 dans le processus de différenciation ostéoclastique (116).

b) Rôle au sein de la physiologie osseuse

i) Minéralisation osseuse

On attribue des actions osseuses directes et indirectes à la D et tout particulièrement à sa forme hormonale, la $1,25(OH)_2D$. Son rôle majeur indirect est le maintien de concentrations sanguines normales de calcium et de phosphore lesquelles favoriseront la minéralisation de l'os. Ce rôle est atteint par l'action de la $1,25(OH)_2D$ sur l'absorption intestinale de ces deux minéraux. En effet, des études réalisées chez des animaux déficients en D ont démontré que l'infusion intra-veineuse continue de quantités suffisantes de calcium et de phosphore permettaient une croissance et une minéralisation osseuse comparable à celle des animaux non-déficients en D (135). L'étude des souris $VDR^{-/-}$ recevant une diète de secours visant à corriger l'hypocalcémie et l'hypophosphorémie caractéristique de ce modèle animal, a contribué à souligner l'importance majeure des concentrations circulantes de calcium et de phosphore ainsi que l'implication secondaire de la D dans le processus de maturation et de minéralisation de l'os (136;137). En effet, cette diète a permis de corriger le rachitisme présent chez les animaux recevant la diète non-supplémentée et ce, malgré un VDR_n dysfonctionnel (136). Une étude similaire a été réalisée chez des enfants souffrant de rachitisme vitamino D-dépendant de type II chez qui on a procédé à des infusions nocturnes de calcium. Les résultats ont démontré une guérison du rachitisme et une minéralisation osseuse normale (138).

ii) *Fonctions cellulaires*

L'ostéoblaste exprime le VDR_n . L'action de la $1,25(OH)_2D$ sur l'ostéoblaste permet la synthèse de plusieurs protéines impliquées dans le processus de formation osseuse dont la phosphatase alcaline, l'ostéopontine, l'ostéocalcine et le collagène de type I. La $1,25(OH)_2D$ exerce une action biphasique sur l'ostéoblaste qui dépend du stade de prolifération ou de différenciation cellulaire. Lors du stade prolifératif, la $1,25(OH)_2D$ inhibe la synthèse du collagène de type I et de la phosphatase alcaline alors que son action sur des ostéoblastes matures conduit à une augmentation de l'expression des gènes de l'ostéocalcine et de l'ostéopontine. De plus, la $1,25(OH)_2D$ module la synthèse et les voies de signalisation des différents facteurs de croissance et cytokines impliqués dans le processus de différenciation des ostéoblastes ainsi que dans le contrôle du remodelage de l'os (139). Il a été rapporté que la $1,25(OH)_2D$ agit sur la synthèse ostéoblastique de $TGF\beta$, de l'IGF-I et de l'IGF-II (139). De plus, elle influence l'expression ostéoblastique du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et de son récepteur par les cellules endothéliales. Ce facteur de croissance est impliqué dans le processus d'angiogenèse soit l'invasion vasculaire de la matrice extracellulaire osseuse, mécanisme nécessaire à l'ossification endochondrale et à la réparation de fractures. Les cellules endothéliales, une fois activées par le VEGF, sécrètent des facteurs ostéotrophiques (IGF-1 et endothéline-1) qui stimulent la prolifération ostéoblastique.

Par la méthode de *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR), la présence du VDR_n a été détectée sur des ostéoclastes matures. De plus, des travaux ont montré que le gène de l'anhydrase carbonique, une enzyme particulièrement active dans les ostéoclastes, est régulé par le complexe $VDR_n-1,25(OH)_2D$. Toutefois, tel que discuté précédemment, l'action de la $1,25(OH)_2D$ sur la physiologie de l'ostéoclaste est plutôt de nature indirecte.

IV- Fonctions non-traditionnelles

Le VDR_n est exprimé dans plusieurs tissus tels la peau, le rein, le foie, le pancréas, le muscle, le cœur, le sein, la prostate, les glandes surrénales, la glande thyroïde, le colon et l'intestin grêle, les lymphocytes et les cellules hématopoïétiques (116). L'expression ubiquitaire du VDR_n suggère que la D exerce plusieurs fonctions qui ne sont pas associées à ses rôles traditionnels au sein du métabolisme phosphocalcique. De plus, plusieurs cellules possèdent une activité enzymatique 1α -hydroxylase leur permettant de synthétiser localement la $1,25(OH)_2D$. L'hormone ainsi produite semble agir par voie intra- ou paracrine (140). Toutefois, on présume que les fonctions de la $1,25(OH)_2D$ dans ces tissus sont de nature redondante. En effet, l'étude des individus atteints de rachitisme vitamino D-dépendant de type II caractérisé par une résistance généralisée à l'action de la $1,25(OH)_2D$ ne révèle aucune anomalie au chapitre de ces fonctions non-traditionnelles.

1. Effets sur la croissance, la réparation et la mort cellulaire

La $1,25(OH)_2D$ est un agent pro-différenciateur et anti-proliférateur cellulaire. Cette fonction a été observée chez plusieurs modèles cellulaires tels les cellules cancéreuses du sein, de la prostate, du colon, les cellules leucémiques, les cellules de l'os et du cartilage, les cellules hématopoïétiques et les kératinocytes. Plusieurs mécanismes d'action de la $1,25(OH)_2D$ ont été suggérés. En effet, elle peut agir sur certains éléments régulateurs (p21 et p27) et sur certains facteurs de transcription (*c-myc* et *c-fos*) contrôlant le cycle cellulaire et ainsi permettre l'arrêt des cellules en phase G1. Toutefois, au sein de certains systèmes cellulaires, la $1,25(OH)_2D$ agit comme un facteur de croissance. L'exemple cité est celui des cellules épithéliales alvéolaires où des études ont montré que l'application de $1,25(OH)_2D$ résulte en une augmentation de la prolifération cellulaire. La $1,25(OH)_2D$ joue donc un rôle pro-prolifératif dans un contexte de développement ou de réparation du poumon (141).

D'autres études réalisées chez l'animal suggèrent un rôle protecteur de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans la prévention de dommages causés à l'ADN par des agents cancérigènes. Ainsi, une supplémentation de D précédant la prise de la substance cancérigène, diéthylnitrosamine, réduit significativement les aberrations chromosomales causées par celle-ci chez des cellules hépatiques de rat (141).

De plus, en inhibant l'expression de bcl-2, un agent anti-apoptotique et en stimulant l'expression de bax, une protéine pro-apoptotique, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ stimule le processus de mort cellulaire programmée. Toutefois, cette propriété dépend de plusieurs facteurs: le stade de prolifération et de différenciation cellulaire, l'interaction avec des facteurs de croissance et des cytokines et dans le cas d'études *in vitro*, les conditions de culture cellulaire et l'espèce d'où proviennent les cellules (139). De plus, l'influence de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sur la mobilisation des réserves cellulaires calciques et l'accroissement de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ qui en résulte peut être un autre facteur modulant le phénomène d'apoptose. Cette propriété pro-apoptotique de la D devient intéressante dans la mesure où elle peut promouvoir la régression de tumeurs cancéreuses en induisant leur mort cellulaire (141).

Une hypothèse récente suggère l'implication de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dans le contrôle du stress oxydatif cellulaire par l'intermédiaire d'une hausse des niveaux cellulaires de glutathion, un antioxydant reconnu et de l'accroissement de l'activité de certaines enzymes antioxydantes (141).

Ces propriétés associées à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ confère à cette dernière une valeur pharmacologique et thérapeutique pour certaines pathologies. En effet, l'effet anti-proliférateur de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ a été à la base du développement d'analogues de la D utilisés dans le traitement du psoriasis, une maladie caractérisée par une hyperprolifération des cellules cutanées. De plus, des analogues de la D sont à l'essai dans le traitement de plusieurs cancers.

2. Effets sur le système endocrinien

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ réprime aussi l'expression de certains gènes dont celui de la PTH qui possède un VDRE négatif dans la région promotrice du gène. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ agit aussi sur l'hypophyse en stimulant la sécrétion de prolactine, d'hormone de croissance et de l'hormone thyroïdienne (TSH) (141).

La présence d'un VDR_n sur les cellules bêta du pancréas laisse présager que le complexe VDR_n - $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ influence la sécrétion d'insuline. Certains travaux rapportent toutefois que la sécrétion pancréatique d'insuline est plutôt régulée par le statut calcique indépendamment du statut en D (89). Chez un modèle animal d'hypocalcémie secondaire à une déficience en D (D-Ca-), on a rapporté la présence d'un état insulino-pénique normalisé par l'administration d'une supplémentation de calcium alimentaire seul sans correction de la déficience en D (89). Toutefois, l'expression génique du récepteur à l'insuline semble être sous le contrôle du complexe VDR_n - $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ suite à la découverte récente d'un VDRE dans la région promotrice de son gène (142).

3. Effets sur le système immunitaire

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ supprime *in vitro* la prolifération des lymphocytes T ainsi que l'expression de certaines cytokines telles les IL-1, -2 et -6 et l'interféron gamma. Ces rôles biologiques sont à la base de la propriété immunosuppressive de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ qui pourrait se révéler un adjuvant intéressant aux thérapies immunosuppressives classiques utilisées lors de transplantation d'organes et dans le cas de maladies auto-immunes. Néanmoins, l'absence de perturbations du système immunitaire de la souris $\text{VDR}^{-/-}$ suggère que cette fonction physiologique est redondante et qu'elle prend surtout une importance particulière lors de situations pathologiques bien précises (116).

4. Effets sur le système nerveux central

Plusieurs éléments du système endocrinien de la D sont présents dans le SNC. On rapporte

la détection du VDR_n dans plusieurs régions du cerveau de même que la production locale de $1,25(OH)_2D$ grâce à la présence de la $25(OH)D-1\alpha$ hydroxylase (143). *In vitro*, il a été démontré que la $1,25(OH)_2D$ induit l'expression génique de plusieurs facteurs neurotrophiques dans les astrocytes et les cellules gliales en culture primaire. De plus, le contrôle de l'expression du gène de la $CaBP_{28k}$ par la $1,25(OH)_2D$ permet de protéger les cellules nerveuses contre l'apoptose causée par une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. La $1,25(OH)_2D$ inhibe également la synthèse de l'enzyme oxyde nitrique synthase, une enzyme fortement induite lors de certaines maladies telles l'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose en plaques (144). Cette enzyme catalyse la production d'oxyde nitrique, une molécule qui, lorsque produite en grande quantité, cause des dommages neuronaux (144). Ainsi, la $1,25(OH)_2D$ est considérée comme une molécule ayant un potentiel thérapeutique dans plusieurs maladies neurodégénératives.

5. Effets sur le système reproducteur

La déficience nutritionnelle en D tout comme la mutation génétique résultant en un VDR_n non-fonctionnel cause des anomalies du système reproducteur menant à une fertilité réduite. Chez la femelle, on note une hypoplasie utérine couplée à une anomalie de la folliculogenèse alors que chez le mâle, le nombre ainsi que la motilité des spermatozoïdes sont réduits et des anomalies histologiques des testicules sont détectées (145).

6. Effets sur le système musculaire

Le rachitisme et l'ostéomalacie causés par une déficience en D sont fréquemment accompagnés de symptômes de faiblesse musculaire et de myopathie. Les myoblastes possèdent le VDR_n et on suggère que la $1,25(OH)_2D$ est impliquée dans le processus de prolifération et différenciation des cellules en plus de réguler le transport transcellulaire de phosphore et la capture de calcium par la cellule musculaire (146). De plus, on présume que la $1,25(OH)_2D$ a une action non-génomique conduisant à l'activation de la voie de

signalisation calcique (146).

ALTÉRATIONS DE L'HOMÉOSTASIE DU SYSTÈME ENDOCRINIEN DE LA VITAMINE D

I- Chez l'homme

1. Déficience nutritionnelle en vitamine D

La déficience nutritionnelle en D est un terme plutôt large qui peut englober à la fois des états d'insuffisance et de déficience. La distinction entre ces deux états réside dans les concentrations de 25(OH)D sériques et leur impact sur les concentrations sanguines de PTH. Ainsi, un état d'insuffisance (ou de déficience marginale) se caractérise par des concentrations sanguines de 25(OH)D abaissées couplées à des niveaux supranormaux de PTH (147). L'action de cette dernière sur la production de 1,25(OH)₂D permet de maintenir les concentrations sanguines de celle-ci. Toutefois, un état de déficience prolongée couplée à l'épuisement du précurseur entraîne la baisse des concentrations sériques de 1,25(OH)₂D (148). L'apparition de symptômes cliniques tels l'ostéomalacie ou le rachitisme et des douleurs musculaires est le reflet d'un état de déficience et peut survenir en présence de concentration normale de 1,25(OH)₂D (149). Longtemps considérée comme une carence nutritionnelle pédiatrique (150;151), la déficience en D est maintenant rapportée chez tous les sous-groupes d'âge. De nombreuses études rapportent la présence de concentrations sous-optimales de 25(OH)D sérique chez de jeunes adultes ainsi que chez des personnes âgées en santé (140;147;152-155). La déficience en D semble causée par une faible exposition solaire qui est insuffisante à combler les besoins en cette vitamine. Ceci souligne d'ailleurs l'intérêt de recourir à une fortification plus extensive des sources alimentaires dans le but de pallier au manque d'exposition au soleil. Finalement, des études de nature empirique rapportent une corrélation entre la latitude et l'incidence de

certaines maladies incluant les cancers du colon, du sein et de la prostate, le diabète de type 1 et la sclérose en plaques. Ainsi, les individus provenant de régions nordiques, caractérisées par une réduction de la synthèse cutanée de D et donc par un état d'insuffisance en D, semblent présenter un risque accru de développer ces maladies (140).

2. *Déficiences d'origine génétique*

Chez l'homme, on rapporte deux maladies héréditaires qui altèrent le système endocrinien de la D. Le rachitisme dépendant de la D de type I est causé par une mutation de l'enzyme 25(OH)D-1 α hydroxylase. Les individus qui en souffrent présentent une concentration sérique de 25(OH)D soit normale soit plus élevée que la normale et des concentrations de 1,25(OH) $_2$ D à la limite de la détection. La très faible concentration de 1,25(OH) $_2$ D mesurée dans le sang entraîne une hypocalcémie et une hyperparathyroïdie secondaire.

Le rachitisme dépendant de la D de type II est caractérisé par la présence d'un VDR $_n$ non-fonctionnel et conséquemment d'une résistance généralisée à l'action de la 1,25(OH) $_2$ D. Ainsi, ces individus démontrent des anomalies de la liaison du récepteur avec son ligand, de la translocation nucléaire du récepteur ou de l'affinité du complexe VDR $_n$ -ADN (156). Les différentes mutations responsables du rachitisme de type II peuvent contribuer à un état de résistance complète à l'action de l'hormone ou à un état caractérisé par une réponse sous-optimale à l'action de la 1,25(OH) $_2$ D (156). Les personnes atteintes présentent des concentrations anormalement élevées de 1,25(OH) $_2$ D en présence de concentrations sériques de 25(OH)D normales, une hypocalcémie, une hypophosphorémie et une hyperparathyroïdie secondaire. L'hypocalcémie peut causer des faiblesses et douleurs musculaires et de l'hypotonie (156). Ces sujets souffrent également de rachitisme ou d'ostéomalacie et arborent souvent une alopecie. Ces manifestations cliniques permettent de souligner l'importance du complexe VDR $_n$ -1,25(OH) $_2$ D non seulement dans l'homéostasie phosphocalcique et dans le processus de minéralisation osseuse mais aussi

dans l'établissement de la machinerie nécessaire à la croissance des poils à un stade critique du développement. D'ailleurs, cette dernière manifestation est irréversible et n'est pas corrigée, contrairement au rachitisme ou à l'ostéomalacie, par des infusions intraveineuses de calcium et de phosphore. De plus, elle n'est pas toujours observée chez ceux qui souffrent de ce type de maladie car elle semble associée à une résistance très sévère à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (156).

II- Chez l'animal

Le développement de deux modèles de souris $\text{VDR}^{-/-}$ a permis de mimer chez cet animal le rachitisme dépendant de la D de type II. Ces souris sont porteuses soit de l'ablation de l'exon II situé sur le premier doigt de zinc du domaine de liaison du VDR_n à l'ADN (souris japonaises) (145) ou de l'exon III du deuxième doigt de zinc (souris américaines) (157). Il est à noter que ces souris développent des symptômes associés au phénotype qu'au moment du sevrage, soit à l'âge de 21 jours. Il a été préalablement rapporté, chez le rat, que l'absorption intestinale de calcium et de phosphore est un processus non-saturable et indépendant de la D jusqu'à l'âge de 18 jours pour ensuite décroître et être graduellement remplacé par une voie saturable et régulée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Ce mécanisme explique l'absence de symptômes associés à la maladie lors de l'allaitement. Les souris homozygotes démontrent des manifestations pathologiques très semblables à celles observées chez l'humain. Leur longévité est généralement de 15 semaines pour la souris japonaise et de six mois pour le modèle américain. Il est toutefois à noter qu'une première anomalie est détectée dès l'âge de 15 jours dans la plaque de croissance où un accroissement de 15% du nombre de chondrocytes hypertrophiés est observé (157). Cette manifestation est certes inattendue puisqu'elle survient en présence d'une homéostasie phosphocalcique normale et qu'elle précède le défaut de minéralisation osseuse qui n'est décelé qu'à partir de 35 jours. Ceci laisse présumer que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ est nécessaire à la

prolifération et/ou à la maturation chondrocytaire. Contrairement à l'homme, l'alopécie est uniformément observée chez les souris homozygotes. Finalement, l'expression des gènes D-dépendants, CaBP_{9k} et ostéopontine, est réduite dans l'intestin, le rein et l'os des souris mutantes de trois semaines, soit au moment du sevrage (145).

Le phénotype de ces souris peut être partiellement corrigé par l'intermédiaire d'une diète riche en lactose, calcium et phosphore. Cette diète équilibrée permet de corriger l'hypocalcémie, l'hypophosphorémie et l'hyperparathyroïdie secondaire et ainsi d'améliorer les défauts de minéralisation osseuse tels l'élargissement de la plaque de croissance (137). Les travaux portant sur cette diète laissent présumer que le complexe VDR_n-1,25(OH)₂D n'est pas nécessaire au fonctionnement normal de l'os et que son rôle physiologique principal est le maintien des concentrations circulantes de calcium et de phosphore par le biais de son influence sur le processus d'absorption intestinale (116).

L'alopécie demeure toutefois irréversible chez ces souris. Cette manifestation est causée par un défaut inhérent au VDR_n des kératinocytes et ne peut être corrigée par aucune manipulation nutritionnelle (137;158). Seule l'expression ciblée d'un VDR_n fonctionnel dans les kératinocytes des souris VDR^{-/-} permet de prévenir l'alopécie (159).

1.4 PHYSIOLOGIE DU PHOSPHORE

GÉNÉRALITÉS

Tel le calcium, le phosphore est un ion dont la concentration sérique est fortement contrôlée. Cette concentration est maintenue dans un intervalle physiologique grâce à la régulation hormonale de l'absorption intestinale et de la réabsorption tubulaire rénale ainsi qu'au contrôle des échanges entre les réserves intracellulaires et osseuses de phosphore. L'absorption intestinale de phosphore est sous le contrôle de la 1,25(OH)₂D. Une

hypophosphorémie stimule la synthèse rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ce qui permet ainsi de favoriser l'entrée intestinale de phosphore et la mobilisation de ce dernier par l'intermédiaire d'une augmentation de la résorption osseuse. Le rein demeure sans contredit le principal organe régulateur des concentrations sériques de phosphore et il est soumis à l'influence de plusieurs hormones agissant sur la réabsorption rénale de phosphore. De plus, le tubule proximal présente sur sa bordure un transporteur de phosphore couplé au sodium, le NPT-2, qui facilite le processus de réabsorption. Ce transporteur est inhibé, entre autres, par la PTH. Le PTHrp, la calcitonine, les glucocorticoïdes et les TGF- α et β sont également des facteurs phosphaturiants alors que l'hormone de croissance, l'IGF-1, l'hormone thyroïdienne, l'insuline, l'EGF et possiblement la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ont plutôt un effet stimulant sur la réabsorption rénale de phosphore (160). Des souris transgéniques (souris HYP) dépourvues du gène PHEX démontrent une phosphaturie importante et une hypophosphorémie conduisant à l'apparition d'un rachitisme sévère. Le phosphore circulant est aussi un important régulateur de sa propre excrétion urinaire. Une augmentation des concentrations sériques de phosphore agit sur le processus de réabsorption tubulaire maximal de phosphore en le réduisant alors qu'une baisse de la phosphorémie présente l'effet inverse.

Outre son implication traditionnelle dans la composition des cristaux d'hydroxyapatite, le phosphore semble également impliqué dans le processus d'apoptose. En effet, une hausse de la concentration extracellulaire de phosphore observée, par exemple, lors du mécanisme de résorption osseuse ou au moment du dépôt du minéral, stimule l'apoptose des ostéoblastes ainsi que des chondrocytes hypertrophiés de la plaque de croissance par un effet dose-dépendant (161;162). L'apoptose des chondrocytes est nécessaire à l'ossification endochondrale. Le phénomène d'apoptose médiée par le phosphore a également été rapporté chez une lignée de cellules ostéoblastiques (162). L'apoptose des ostéoblastes est

une étape nécessaire et critique à une structure et un fonctionnement adéquat de l'os et survient lors de conditions caractérisées par une formation osseuse rapide telles le développement embryonnaire, la formation de l'os métaphysaire et la guérison des fractures (163). Toutefois, on suggère que plusieurs autres facteurs agissent également sur le phénomène apoptotique (164).

1.5 PHYSIOLOGIE DE L'OS

DESCRIPTION GÉNÉRALE

I- Description macroscopique et microscopique

Le squelette se subdivise en deux parties : le squelette axial qui englobe les vertèbres, le pelvis, le crâne, les côtes et le sternum et le squelette appendiculaire qui regroupe tous les os longs. Ces derniers comprennent trois sections : la diaphyse, la métaphyse et l'épiphyse séparée des deux autres segments par le cartilage de la plaque de croissance. Le processus d'ossification endochondrale, initié *in utero* et se prolongeant jusqu'au terme de la puberté, permet le modelage des os longs et leur croissance longitudinale alors que le crâne et le pelvis, des os désignés comme plats, sont formés par le processus d'ossification intramembranaire permettant plutôt une croissance en largeur (165;166).

Sur le plan microscopique, il existe deux types d'os : l'os primaire (os tissé ou *woven bone*) et l'os lamellaire. L'os primaire est un os immature retrouvé à l'état embryonnaire, chez le nourrisson, ainsi que lors de la réparation d'une fracture. Il peut aussi être caractéristique de certaines pathologies telles l'ostéogenèse imparfaite, la maladie osseuse de Paget et être observé au sein de certains ostéosarcomes. L'os lamellaire est un os dont la structure cellulaire et la structure des fibres de collagène sont hautement organisées (166).

Ces deux types d'os incluent à leur tour deux compartiments: l'os cortical et l'os trabéculaire. La masse de l'os cortical est de quatre fois celle de l'os trabéculaire et constitue approximativement 80% du squelette. Il assume principalement des fonctions structurales. La surface de l'os trabéculaire est plus importante, ce qui en fait un os métaboliquement plus actif impliqué dans le processus de remodelage osseux (165;166). La figure 1.4 de la page 76 détaille les structures macroscopiques et microscopiques de l'os.

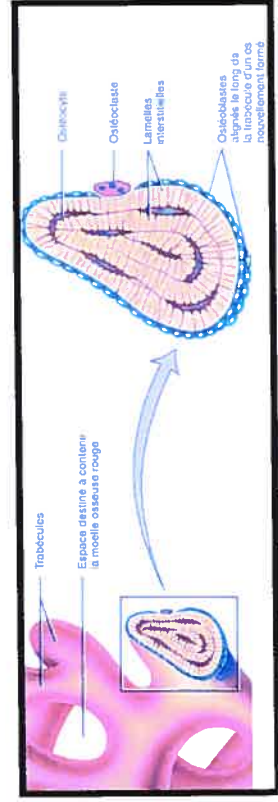
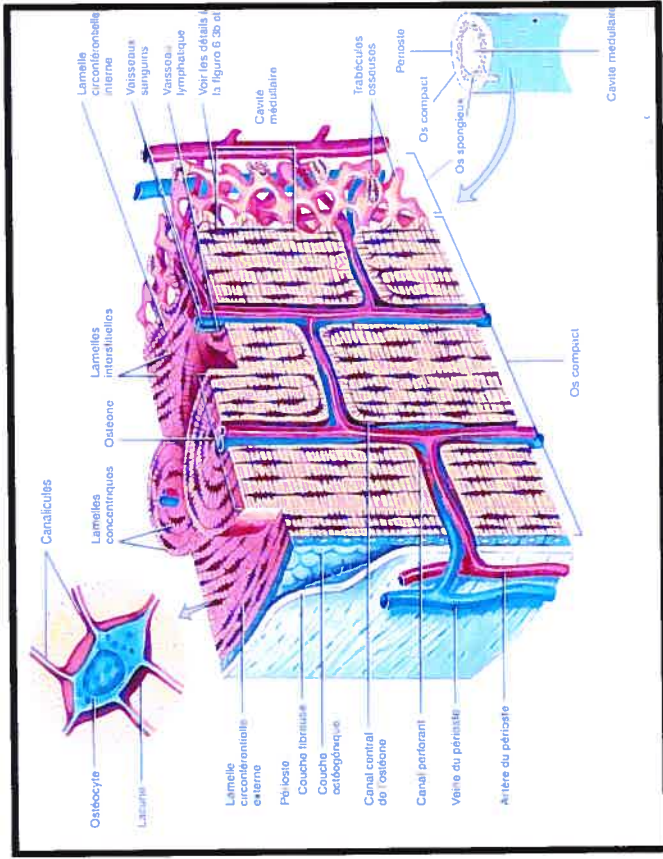
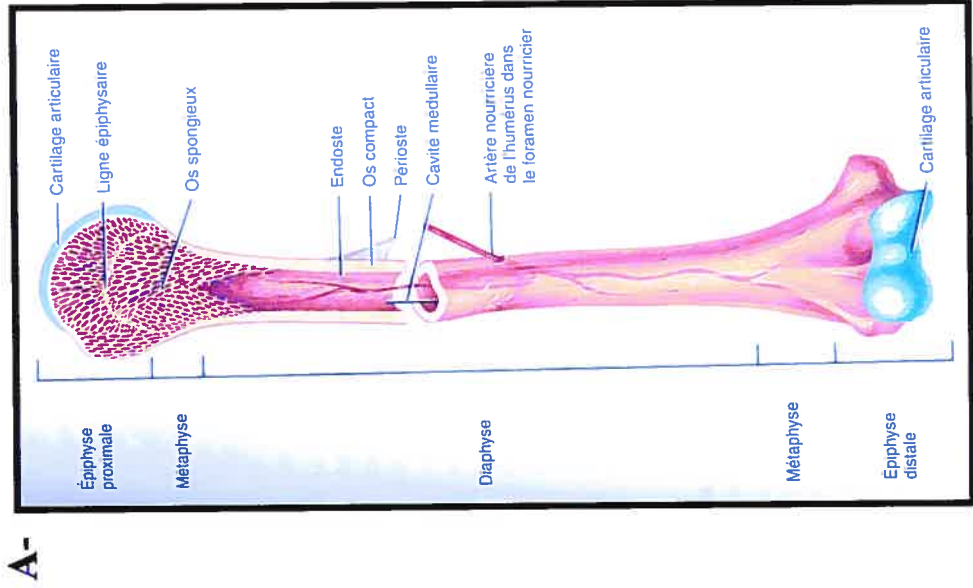


FIGURE 1.4 STRUCTURE MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE DE L'OS
 A- Schéma d'un humérus. B- Représentation microscopique des systèmes de Havers de l'os cortical et des trabécules osseuses de l'os trabéculaire.
 C- Trabécules osseuses. *Tiré de Tortora et Grabowski. (2001). Principes d'anatomie et de physiologie.*

L'os est composé majoritairement d'une substance inerte formée de la matrice (25%) et du minéral (70%) où sont incorporées une très faible proportion de cellules (2-5% de son volume). Le minéral de l'os est fait de cristaux d'hydroxyapatite composés de calcium dans une proportion variant entre 37 et 40%, de phosphore, entre 50 et 58% et de carbonate, entre 2 et 8%. De plus, le minéral osseux est aussi fait de sodium, potassium, magnésium, de fluor, de citrate et d'autres ions présents dans le milieu extracellulaire. Ces éléments peuvent influencer certaines propriétés physiques de l'os ainsi que sa solubilité (165;166).

La matrice organique de l'os est faite à 90% de collagène de type I et à 10% de protéines non-collagéniques telles l'ostéocalcine, l'ostéonectine, la fibronectine, l'ostéopontine, la MGP (*matrix gla protein*) et la BSP (*bone sialoprotein*) (167). Cette petite fraction de protéines jouent un rôle dans l'organisation de la matrice, dans la stabilisation des cristaux de l'os ainsi que dans la régulation des concentrations de calcium. La matrice comprend également plusieurs facteurs de croissance (TGF β , IGF) et cytokines (interleukines) qui sont liés au minéral de l'os et à certaines protéines et qui sont libérés lors du processus de résorption osseuse. Ces facteurs jouent un rôle dans le processus de chimiotactisme, de croissance et de différenciation des différentes cellules de l'os.

II- Le cartilage de la plaque de croissance et les populations cellulaires de l'os

1. Le cartilage de la plaque de croissance

La plaque de croissance est peuplée principalement de chondrocytes qui sont organisés en colonnes bien définies et divisées en zones bien distinctes : I- la zone de repos caractérisée par la présence de cellules quiescentes, II- les zones prolifératives où la division cellulaire des chondrocytes est la plus active, III- les zones hypertrophiques caractérisées par l'arrêt de la croissance cellulaire, l'augmentation de la taille des chondrocytes et l'apoptose de ces derniers qui seront progressivement remplacés par des ostéoblastes et finalement, IV- la zone de jonction entre le cartilage et la métaphyse. C'est au sein de cette zone que l'on note l'apparition d'un réseau vasculaire dans lequel circulent, entre autres, les cellules-souches d'origine mésenchymateuse, les précurseurs des ostéoblastes. Finalement, plusieurs facteurs viennent réguler la maturation de la plaque de croissance. Citons, parmi ceux-ci les deux plus importants soit le PTHrP et l'*indian hedgedhog (Ihh)*.

2. Populations cellulaires de l'os

Il existe quatre populations de cellules osseuses. Outre les ostéoblastes et les ostéoclastes discutés dans les sections précédentes, l'os comprend aussi des ostéocytes ainsi que des cellules situées en bordure de l'os (cellules bordantes ou *lining cells*).

a) Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes qui ont atteint un stade final de différenciation cellulaire et qui se sont auto-encastés dans l'os minéralisé. Toutefois, seulement 15% des ostéoblastes atteignent ce stade. La réduction de la diffusion de nutriments au sein de l'os calcifié contribue à réduire l'activité métabolique des ostéocytes qui deviennent relativement inertes quoique viables, approvisionnés uniquement par l'intermédiaire d'un réseau de canalicules. Une hypothèse récente suggère que ces cellules agissent comme des senseurs des forces mécaniques appliquées à l'os (mécanostat). Ces senseurs permettent à

l'os d'ajuster le processus de remodelage osseux pour avoir une masse osseuse qui soit appropriée aux forces mécaniques appliquées (22).

b) Les cellules situées à la surface de l'os (bone lining cells)

Cette population cellulaire de forme allongée et aplatie est constituée d'ostéoblastes en quiescence (168). Ils sont en communication avec les ostéocytes et permettent la transmission d'informations à ces derniers. Ainsi, ces cellules sont en contact d'une part avec le milieu extracellulaire riche en hormones, en cytokines et en ions et d'autre part avec les ostéocytes vers lesquels ils propagent l'information provenant de ces stimuli extracellulaires. On présume que des oscillations calciques traversant les cellules en bordure et se dispersant aux ostéocytes par l'entremise des jonctions paracellulaires sont des vecteurs d'information (166).

RÉGULATION DU MÉTABOLISME OSSEUX

Le remodelage osseux est un processus physiologique qui permet le maintien constant de la masse osseuse de la puberté jusqu'à l'arrêt de la sécrétion des hormones sexuelles. Le remodelage osseux s'effectue simultanément au sein de plusieurs unités de remodelage où le tissu osseux est séquentiellement résorbé par les ostéoclastes puis reformé par les ostéoblastes (169). Ce procédé est hautement régulé par une série d'hormones et de cytokines qui agissent synergiquement par voie autocrine, paracrine ou endocrine sur les cellules formant l'os et sur les cellules responsables de sa résorption. Plusieurs autres facteurs agissent également sur ce processus tel qu'illustré à la figure 1.5 de la page 80.

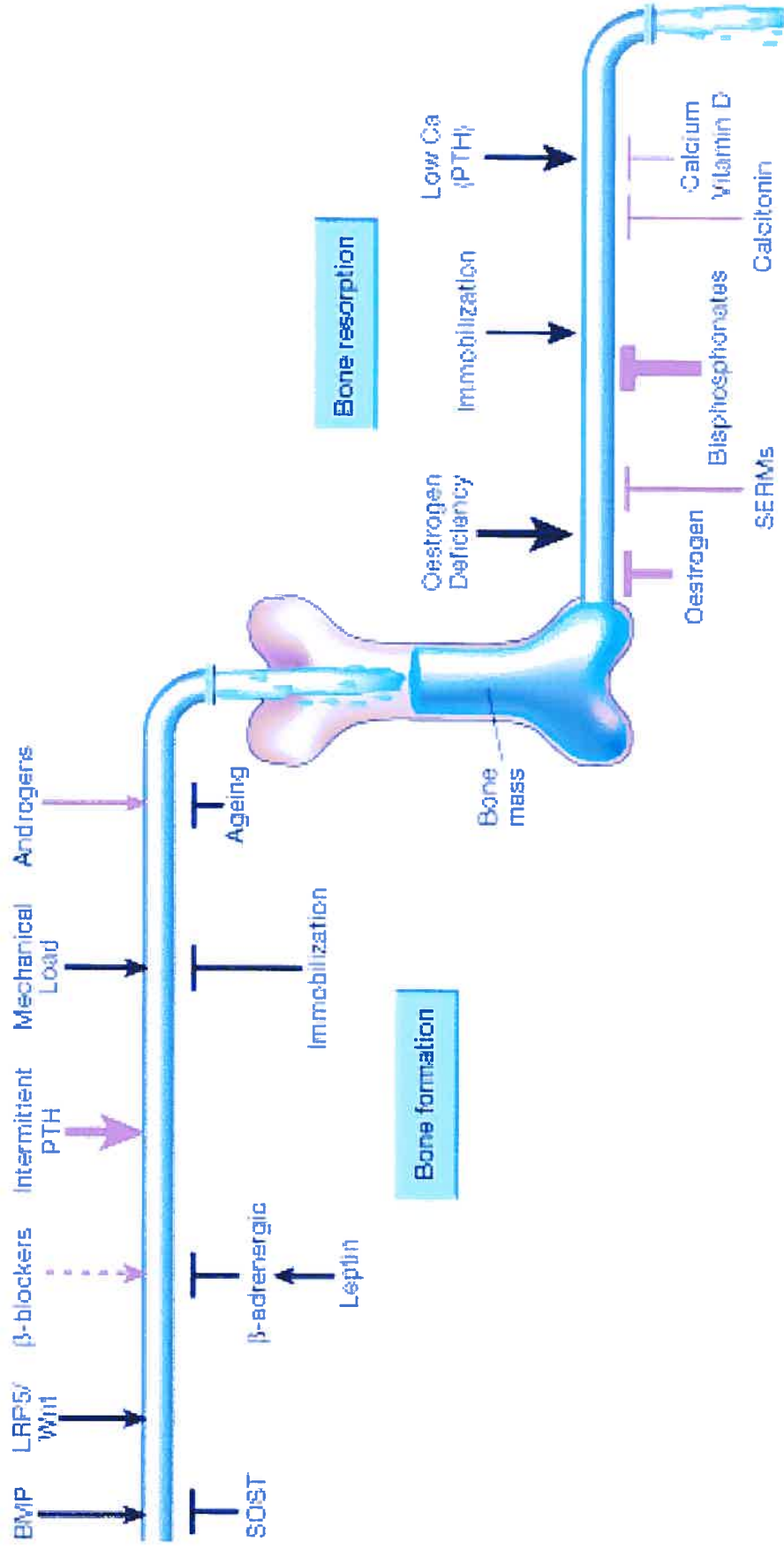


FIGURE 1.5 FACTEURS PHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES QUI INFLUENCENT LA MASSE OSSEUSE

L'impact des différents facteurs est représenté par l'épaisseur des lignes. La flèche pointillée représente une intervention encore hypothétique. *BMP: bone morphogenetic protein; SOST: sclerostin; LRP5: low-density lipoprotein-receptor-related protein 5; SERM: selective estrogen-receptor modulator.*

Tiré de Harada et Rodan, Nature, 423: 349, 2003.

I- Régulation hormonale

1. Hormones calcitropiques

Le rôle joué par la PTH, la 1,25(OH)₂D et la calcitonine au sein de l'homéostasie osseuse a été discutés dans les sections portant sur la physiologie du calcium extracellulaire et sur le système endocrinien de la D.

2. Hormones sexuelles

On sait depuis fort longtemps que les hormones sexuelles sont nécessaires au gain de masse osseuse durant la puberté ainsi qu'à la fermeture des épiphyses, phénomène qui permet l'arrêt de la croissance longitudinale. De plus, les hormones sexuelles sont nécessaires à la régulation du remodelage osseux et au maintien de la masse osseuse adulte. L'étude de cas cliniques d'hommes présentant une mutation du gène de l'aromatase, l'enzyme nécessaire à l'aromatation de la testostérone (T) en estrogènes ainsi que d'hommes exhibant un récepteur estrogénique dysfonctionnel a permis de préciser l'importance toute particulière des estrogènes dans la régulation du métabolisme osseux tant chez les hommes que chez les femmes (170). En effet, ces individus présentaient des phénotypes squelettiques similaires, soit une ostéopénie marquée causée par une résorption osseuse accrue et une grande taille due à la non-fermeture des épiphyses et ce, malgré une concentration sanguine de T tout à fait normale. On estime d'ailleurs que les estrogènes sont responsables d'environ le deux-tiers des effets des hormones sexuelles sur le squelette (170). En permettant un plus grand dépôt osseux dans le périoste, la T est responsable de la dimension du squelette. En effet, comparativement aux femmes, les hommes présentent un diamètre et une surface osseuse transversale plus importante. D'ailleurs, parmi les symptômes recensés chez les hommes porteurs d'une mutation du récepteur aux androgènes rendant les tissus cibles insensibles à l'action de l'hormone, on retrouve une réduction de la DMO qui n'est pas normalisée par

l'administration d'estrogènes (171). Toutefois, le rôle relatif et distinctif des deux hormones sexuelles mâles, soit la T et la dihydrotestostérone, dans la régulation du métabolisme osseux n'a pas encore été clarifié (171). Malgré l'influence évidente des hormones sexuelles sur la physiologie osseuse, leurs mécanismes d'action demeurent encore incertains. On sait qu'il existe deux types de récepteur aux estrogènes dans l'os ainsi que dans les chondrocytes, soit le récepteur α et β . Leur distribution demeure distinctive; l'os cortical est particulièrement abondant en récepteur de type α alors que l'os trabéculaire abonde en récepteurs β . Ce dernier ne semble pas avoir un rôle important dans l'acquisition de la masse osseuse contrairement à son isoforme α quoiqu'on présume qu'il peut agir tel un antagoniste de ce dernier (22). Le récepteur nucléaire aux estrogènes a été identifié dans le noyau des ostéoblastes (172). Toutefois on suggère que certains de leurs rôles physiologiques sont plutôt reliés à l'action du récepteur membranaire récemment identifié à la fois sur les ostéoblastes et les ostéoclastes (164). La liaison du ligand à son récepteur ostéoblastique active la voie de signalisation calcique par l'entremise d'une stimulation de l'influx de $[Ca^{2+}]_e$ par les canaux VOC. Il est intéressant de noter que, chez les ostéoblastes isolés d'humains adultes, les effets cellulaires des hormones sexuelles médiés par le récepteur membranaire sont spécifiques au sexe. En effet, les cellules provenant de femmes répondent aux estrogènes alors que celles issues des hommes ne sont activées que par la T (117). Chez les ostéoclastes, l'action des estrogènes ne semblent pas activer la voie de signalisation calcique mais plutôt causer une dépolarisation membranaire par l'activation de canaux potassiques. L'action de la T sur cette population cellulaire n'a, jusqu'à présent, pas encore été examinée. On présume que les hormones sexuelles, en occurrence, la dihydrotestostérone et le 17- β estradiol, sont également impliquées dans le phénomène d'apoptose des ostéoblastes et des ostéoclastes (164).

Les estrogènes agissent principalement en inhibant le processus de résorption osseuse. Leur action est plutôt indirecte puisqu'ils influencent négativement la production de plusieurs molécules, telles l'IL-1 et 6, le TNF- α , le M-CSF et la PGE₂ qui agissent en stimulant les ostéoclastes. De plus, ils augmentent les niveaux de TGF β , un inhibiteur de la résorption et d'OPG, un inhibiteur de la différenciation ostéoclastique (22). Le mécanisme d'action des androgènes demeure toutefois moins connu, on présume qu'ils stimulent l'IGF-1 et l'IGF-II, deux facteurs à action anabolique.

Interrelation avec le statut calcique

Il a été démontré que l'action des estrogènes sur le maintien de la masse osseuse est optimisé en présence d'un statut calcique adéquat. En effet, l'accroissement de la masse osseuse de la colonne lombaire est de 1,3% par année lors de la prise d'estrogènes seuls alors qu'il augmente à 3,3% par an lorsque les estrogènes sont combinés à un supplément de calcium (173). On suggère qu'un apport calcique supérieur à 1200 mg par jour potentialise les effets bénéfiques des estrogènes sur l'os (173). Le mécanisme expliquant cette synergie est encore incertain. On suppose que l'usage d'estrogènes entraîne une réduction du processus de résorption osseuse, laissant ainsi des cavités de résorption où la formation osseuse est fortement activée. Ce processus accéléré de formation accroît les besoins calciques de l'organisme et lorsque suffisamment de calcium est supplée, le processus s'effectue de manière optimale et la masse osseuse s'en trouve significativement augmentée.

II- Autres facteurs régulateurs : cytokines, facteurs de croissance et autres

Il existe plusieurs autres facteurs régulateurs qui interagissent dans les processus de formation et résorption osseuse. Les cytokines sont des peptides ou glycoprotéines généralement produits par les cellules du système immunitaire. Toutefois, elles peuvent

aussi être produites par les cellules osseuses et les cellules-souches et être impliquées dans le processus de remodelage osseux en agissant principalement sur la résorption de l'os. Parmi les cytokines, on retrouve, entre autres, le *tumor necrosis factor α* (TNF α), les interleukines (I, IV, VI, XI), les leucotriènes, les prostaglandines, le *monocyte-macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) et le système OPG/RANK/RANKL qui agissent, soit directement sur la résorption osseuse ou encore, sur l'ostéoclastogenèse (174).

Les facteurs de croissance tels l'IGF-1 et -II, le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et le *fibroblast growth factor* (FGF) stimulent plutôt la formation de l'os en agissant sur la prolifération et la différenciation ostéoblastique (175). Il existe finalement des peptides tels le TGF β qui peuvent agir sur les deux tableaux soit sur les ostéoclastes en diminuant leur formation et en accroissant leur apoptose et sur les ostéoblastes où il stimule leur prolifération et leur migration.

III- Régulation nutritionnelle

1. Rôle du calcium et du phosphore

a) Calcium

Les concentrations extracellulaires de calcium et de phosphore doivent être adéquates pour permettre l'atteinte d'une masse osseuse optimale. Toutefois, plusieurs facteurs, autre que nutritionnels, viennent influencer l'atteinte du pic de la masse osseuse. Parmi ceux-ci, les facteurs génétiques expliquent, à eux seuls, 85% de la variabilité populationnelle de la masse osseuse (176). L'environnement, les habitudes de vie, l'ethnie et l'activité physique sont également des variables qui influencent la masse osseuse (176). On sait que l'os constitue le principal réservoir corporel de calcium et qu'il existe un seuil de rétention maximale de calcium, au-delà duquel, le calcium n'est plus stocké dans l'os mais tout simplement excrété. Ce seuil varie selon l'âge, il est bas chez le nourrisson et l'enfant en croissance et s'élève chez l'adulte et la personne âgée. Pour permettre une rétention

squelettique maximale, l'apport alimentaire de calcium doit donc outrepasser ce seuil mais sans toutefois dépasser l'apport maximal tolérable (179) .

Des études de supplémentation de calcium ont été réalisées chez pratiquement tous les sous-groupes de la population, des enfants en bas âge jusqu'aux personnes âgées. La plupart d'entre elles, ont conclu à un effet positif d'une supplémentation alimentaire ou pharmacologique. Les paramètres osseux investigués sont généralement de deux types : la DMO, un indice de la masse osseuse et le nombre de fractures. Une supplémentation de calcium accroît la DMO chez les enfants, les adolescents et les femmes pré-ménopausées. Elle ralentit la perte de DMO associée à la ménopause et au vieillissement. Toutefois, un facteur entre ici en ligne de compte ; il s'agit de l'effet transitoire du calcium sur le remodelage osseux. La supplémentation en calcium accroît de façon significative la DMO dans les trois à douze premiers mois de l'intervention. Un effet qui ralentit et même s'estompe lorsque les études ont une durée supérieure à deux ans. Cette augmentation transitoire de la masse osseuse, observée principalement dans l'os trabéculaire, est en partie causée par la réduction des cavités de résorption osseuse et donc de la quantité d'os en phase de remodelage.

Finalement, aucune association n'a pu être démontrée entre l'apport alimentaire en calcium et la réduction du risque de fractures. Cette variable est fortement influencée par des facteurs autres que ceux reliés à l'alimentation. De plus, les études portant sur ce sujet (177) sont de nature transversale et ponctuelle et ne peuvent qu'associer l'apport calcique du temps présent ou dans une période précise de la vie au risque de fractures ostéoporotiques. Aucune étude longitudinale n'a, jusqu'à présent, évalué la corrélation entre le risque de fractures et l'apport calcique de la vie entière.

b) Phosphore

Longtemps prodigué adéquatement et même excessivement par l'alimentation, le phosphore a toujours été perçu comme un élément nutritif risqué pour la santé osseuse. En effet, l'apport excessif de phosphore couplé à un apport insuffisant de calcium, a été présenté comme un facteur de risque de l'ostéoporose sans toutefois s'appuyer sur des données expérimentales valables (178). Récemment, certains auteurs commencent à manifester des craintes quant aux apports insuffisants de ce minéral tout particulièrement chez les sujets qui consomment des suppléments de calcium dépourvus de phosphore et qui reçoivent un traitement anabolique contre l'ostéoporose (178). La thérapie anabolique augmente la masse osseuse et conséquemment les besoins en calcium et en phosphore de l'organisme. De plus, ces thérapies sont habituellement accompagnées d'une supplémentation concomitante de calcium. De fortes doses de calcium, surtout combinées à un anion qui n'est pas le phosphore, contribuent à réduire l'absorption intestinale de ce dernier de manière significative. Face aux besoins accrus de l'os, un état d'insuffisance en phosphore peut alors survenir chez cette population bien précise.

2. Rôle des métabolites de la vitamine D

Les effets indépendants d'une supplémentation de D sur l'os sont difficiles à distinguer. En effet, puisque la D stimule l'absorption intestinale de calcium, l'effet positif d'une supplémentation de D sur l'os peut tout simplement être causé par une meilleure entrée intestinale de calcium. Toutefois, plusieurs études démontrent que la combinaison calcium et D se révèle supérieure à la prise de l'un ou l'autre séparément. Deux méta-analyses récentes visant à comparer l'efficacité d'une supplémentation de D ou de calcium dans la prévention primaire, évaluée par la DMO, ou secondaire, évaluée par l'incidence de fractures, de l'ostéoporose concluent que la D semble plus efficace pour réduire l'incidence

de fractures vertébrales et non-vertébrales que le calcium seul alors que ce dernier a un plus grand impact sur la DMO que la D. (180;181)

De plus, il est important de bien distinguer les différents métabolites de la D puisqu'ils ne semblent pas posséder la même efficacité selon le paramètre mesuré. Ainsi, de fortes doses de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont plus efficaces mais toutefois plus toxiques que la D_3 pour accroître la DMO (180). Cependant, la D_3 démontre une efficacité accrue dans la réduction du risque de fractures ostéoporotiques. De plus, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ accroît la force musculaire, ce qui peut avoir un effet bénéfique dans la réduction de la fréquence des chutes (146). Finalement, en vieillissant, on observe une altération de la fonction rénale, une réduction de la production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et une résistance généralisée à l'action de cette hormone. Ces facteurs peuvent en soi justifier le choix de ce métabolite comme supplément chez cette population bien précise. Peu d'études ont, jusqu'à présent, étudié l'efficacité de la $25(\text{OH})\text{D}$ sur la DMO ou l'incidence de fractures. Une étude rapporte l'efficacité d'une supplémentation de $25(\text{OH})\text{D}$ pour ralentir la perte de masse osseuse mais seulement en présence de faibles apports calciques. Les auteurs concluent que la $25(\text{OH})\text{D}$ contribue plutôt en renverser l'état d'insuffisance calcique et qu'elle n'a pas d'effet bénéfique indépendant (182).

Finalement, l'état nutritionnel sous-jacent en D semble être déterminant dans l'efficacité de cette vitamine. Les personnes qui présentent un état d'insuffisance en D tirent plus de bénéfices d'une supplémentation. La question qui subsiste est donc : est-il justifié de supplémenter en D les personnes qui ne présentent pas d'insuffisance ou de déficience en D ? Certaines études ont montré que l'administration de D a un effet positif indépendant sur la fonction des ostéoblastes en stimulant la production d'ostéocalcine et ce, peu importe le statut nutritionnel sous-jacent (183).

3. Autres éléments nutritifs impliqués

a) Vitamines

i) Vitamine A

La vitamine A est un des rares éléments nutritifs dont l'excès est délétère pour la masse osseuse. En effet, deux études prospectives récentes rapportent que la consommation excessive de vitamine A est associée à une augmentation des fractures ostéoporotiques (184;185). Ces observations visent tout particulièrement les personnes âgées qui consomment des suppléments. Avec l'âge, l'augmentation de la masse adipeuse accroît les réserves de vitamine A. De plus, chez les personnes âgées, on observe un ralentissement du métabolisme de la vitamine A qui demeure alors plus longtemps en circulation sous sa forme estérifiée. Cet accroissement de la concentration sanguine de vitamine A sature rapidement son transporteur et la portion libre augmente en circulation devenant donc plus biodisponible pour les tissus périphériques. La vitamine A sérique est donc captée par ces tissus qui la convertit en AR. L'AR est un facteur de transcription bien connu qui se lie à deux récepteurs nucléaires soit le récepteur de l'AR (RAR) et le récepteur aux rétinoïdes X (RXR α). Au sein des cellules osseuses, et plus particulièrement des ostéoblastes, la liaison de l'AR à l'un ou l'autre de ses récepteurs entraîne la production de cytokines qui agissent de façon paracrine sur les ostéoclastes et leurs précurseurs cellulaires de la moëlle osseuse. Ceci résulte en un accroissement du nombre et de l'activité des ostéoclastes et un déséquilibre entre les processus de formation et de résorption osseuse favorisant la perte de masse osseuse (186).

Une autre hypothèse a été formulée dans le but d'expliquer les effets néfastes d'un excès de vitamine A sur la masse osseuse. On rapporte que la vitamine A exerce un effet antagoniste sur l'action biologique de la D. En effet, les deux récepteurs de l'AR appartiennent à la même famille de récepteurs que le VDR $_n$ avec qui le RXR α forme un hétérodimère. Une

étude animale a démontré que l'ingestion de hautes doses de rétinyl esters en absence de D alimentaire conduit à une réduction des niveaux sériques de calcium chez des rats initialement normocalcémiques (187). En présence de D alimentaire, l'effet hypocalcémique de la vitamine A est atténué. Chez l'humain, des résultats similaires sont rapportés où une supplémentation de rétinyl palmitate couplée à une dose de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, réduit l'effet hypercalcémiant de cette dernière, alors que la supplémentation de rétinyl palmitate employée seule a plutôt un effet de réduction sur la calcémie (188). Les auteurs de l'étude chez l'humain proposent un effet antagoniste au sein de l'absorption intestinale de calcium plutôt qu'un effet direct sur l'absorption, le transport, l'activation ou le catabolisme de la D. On suppose qu'un excès de vitamine A conduit à un excès d'AR qui lie plus favorablement le RAR et favorise l'interaction RAR-RXR α plutôt que le complexe hétérodimère RXR α -VDR η . Ainsi, les actions génomiques traditionnellement associées à la D peuvent être compromises lors d'hypervitaminose A.

ii) Vitamine C

Par son rôle de cofacteur de l'enzyme nécessaire à l'hydroxylation de la proline, l'acide ascorbique est nécessaire à la stabilité du collagène de type I. En effet, le processus d'hydroxylation de cet acide aminé permet la réticulation du collagène, ce qui accroît sa stabilité.

iii) Vitamine K

La vitamine K est nécessaire à la carboxylation des résidus glutamate (GLU) de l'ostéocalcine. Ce processus de carboxylation confère aux résidus la propriété de lier le calcium et les autres minéraux. Néanmoins, le rôle exact de l'ostéocalcine au sein du métabolisme osseux demeure encore obscur et, de plus, on ne connaît pas à quel point la sous-carboxylation des résidus GLU altère la fonction de cette protéine. Par conséquent, l'influence et l'importance réelle de la vitamine K sur la physiologie osseuse n'ont pas été

montrées hors de tout doute et ce, même si la corrélation négative existant entre les concentrations sériques d'ostéocalcine sous-carboxylée et la DMO ainsi que l'association positive entre ces mêmes concentrations et l'incidence de fractures ont été largement rapportées dans la littérature (189).

La vitamine K cause également une rétention plus grande de calcium dans le rein. On propose l'implication d'une protéine rénale possédant des résidus GLU mais cette protéine n'a pas encore été identifiée formellement (189). Finalement, certains auteurs rapportent que la vitamine K peut inhiber la production de PGE₂ et d'IL-6, deux facteurs qui stimulent la résorption osseuse (189). La réalisation d'études épidémiologiques a permis d'observer qu'un apport alimentaire élevé de vitamine K est associé à une meilleure DMO chez la femme seulement ainsi qu'à une réduction de l'incidence de fractures de la hanche chez les deux sexes (190-192). Toutefois, l'élaboration d'études randomisées d'intervention n'ont pas donné de résultats concluants quant à l'efficacité indépendante de cette vitamine dans la prévention primaire ou secondaire de l'ostéoporose (189). Plusieurs études comparent l'effet d'une supplémentation de vitamine K et/ou de D sur la DMO et l'incidence de fractures. La combinaison des deux vitamines semblent démontrer un effet synergique intéressant sur la DMO quoique difficilement explicable (193). Le rôle joué par la D dans la synthèse de l'ostéocalcine ainsi qu'au sein du processus de γ -carboxylation des résidus GLU sont des hypothèses suggérées (192).

b) Minéraux, oligo-éléments et électrolytes

i) Magnésium

L'os est le principal réservoir de magnésium de l'organisme. En cas de baisse de la magnésémie, l'os peut libérer du magnésium et en cas de hausse du magnésium sérique, il peut servir de tampon en liant le surplus de magnésium (194). Le magnésium joue un rôle important dans l'os puisqu'en s'insérant dans les cristaux d'hydroxyapatite, il en assure une

meilleure solidité. En effet, la réduction de la concentration de magnésium osseux est associée à une augmentation de la taille des cristaux, ce qui accroît leur fragilité (195). Toutefois, cette propriété que possède l'os de lier le magnésium diminue avec l'âge, entraînant la réduction de la concentration osseuse de cet ion. Ce phénomène, non-compensé par un apport alimentaire suffisant de magnésium et combiné à une réduction concomitante du calcium osseux, contribue à la perte de masse osseuse observée avec le vieillissement. De plus, une déficience clinique en magnésium est fréquemment couplée à une hypocalcémie qui se révèle résistante à toute intervention à moins de corriger la cause primaire soit l'hypomagnésémie. Cette hypocalcémie est un facteur additionnel qui affecte négativement la masse osseuse. Par ces rôles de cofacteur dans de multiples réactions enzymatiques, le magnésium est nécessaire à la sécrétion de PTH ainsi qu'à son action rénale et osseuse. Ainsi, une déficience en magnésium cause une réduction de la sécrétion de cette hormone et une résistance à son action dans l'os et le rein, qui se traduit, entre autres, par la réduction de la synthèse rénale de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et de la formation osseuse (196;197). Des études animales et humaines de supplémentation en magnésium ont démontré une influence positive du magnésium sur la DMO ainsi que sur la prévention des fractures. Toutefois, il est difficile de conclure à un rôle direct de ce minéral au sein de l'os étant donné ses nombreuses implications dans le métabolisme du calcium, de la PTH et de la D.

ii) Fluor

Le fluor, lorsque complexé au sodium (fluorure de sodium) est un puissant stimulant de la formation osseuse et possède la capacité d'accroître de façon significative et consistante la DMO vertébrale de femmes post-ménopausées ostéoporotiques (10). Toutefois, malgré cet effet positif sur la DMO, l'étude de doses pharmacologiques de fluor n'a donné aucun résultat tangible dans la prévention des fractures. Le fluor a la capacité de s'incorporer dans

les cristaux de l'os sous forme de fluoroapatite et d'en affecter les propriétés structurales. On présume d'ailleurs que le fluor augmente la friabilité des os, les rendant ainsi plus fragiles, ce qui peut expliquer l'absence de protection de cet élément contre les fractures.

iii) Zinc

L'os demeure un site de réserve du zinc pour l'organisme qui peut être mobilisable au besoin. Un statut déficient en zinc a été relié à une croissance et une maturation anormale de l'os. Le zinc est, entre autres, impliqué dans le processus de division cellulaire des ostéoblastes et des chondrocytes et est intimement corrélé avec la sécrétion d'IGF-1. Néanmoins, le rôle du zinc au sein de l'os est plutôt indirect puisqu'une étude réalisée chez des adolescentes en croissance supplémentées ou non avec du citrate de zinc pendant une courte période de six semaines a conclu que la supplémentation n'avait eu aucun effet sur les paramètres de croissance (taille et poids), les concentrations sanguines d'IGF-1 ainsi que sur les concentrations des marqueurs du remodelage osseux soit l'ostéocalcine sérique pour évaluer la formation osseuse et la deoxypyridinoline urinaire pour le processus de résorption (198).

iv) Cuivre

Le cuivre agit comme cofacteur de la lysyl oxydase, une enzyme nécessaire à la première étape de maturation du collagène de type I. L'induction d'une déficience en cuivre chez un modèle animal, réduit grandement la tension que peut supporter l'os, affectant ainsi ses propriétés mécaniques, ce qui confirme l'effet défavorable exercé par la déficience en cuivre sur la structure du collagène (199). De plus, les individus atteints de la maladie de Menke, caractérisé par une réduction de l'absorption intestinale de cuivre, présentent des défauts squelettiques (200).

v) *Sodium*

Le sodium entre minoritairement dans la composition de l'os. Toutefois, son implication dans la santé osseuse est plutôt de nature indirecte par l'effet négatif qu'il exerce sur la calciurie. Ainsi, un apport élevé de sodium entraîne des pertes urinaires appréciables de calcium, ce qui génère une balance calcique négative et est associé à un effet négatif sur la DMO chez les hommes et les femmes (201). Il est bon de noter que cet apport correspond à la quantité moyenne de sodium ingérée dans notre diète nord-américaine.

c) *Macroéléments*

i) *Protéines*

Les protéines ont souvent été citées comme éléments délétères sur la masse osseuse. En effet, un apport protéique élevé est associé à une excrétion urinaire accrue de calcium. Les protéines animales ont été particulièrement ciblées en partie à cause de leur composition élevée en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) dont le métabolisme entraîne une charge acide pour l'organisme. Puisque l'os est une réserve de substances alcalines, le processus de résorption osseuse est accrue dans le but de libérer ces substances pour neutraliser cette charge acide. Toutefois, il est important de préciser que certaines sources de protéines végétales telles les produits céréaliers et les légumineuses regorgent tout autant d'acides aminés soufrés. De plus, cet effet négatif des protéines alimentaires semble hautement dépendre de l'apport calcique pré-existant ainsi que de l'aliment considéré dans sa globalité. Ainsi, un faible apport de calcium ne permet pas de surpasser l'effet calciuriant des protéines alors qu'un apport calcique libéral neutralise leur effet négatif (202). De plus, si un aliment est riche en phosphore ou en potassium, ceci atténue l'effet calciuriant des protéines (203).

Les études actuelles visent à prouver que les protéines ont plutôt un effet positif sur la masse osseuse. Les protéines, comme constituant principal de la matrice osseuse, comptent

pour près de la moitié du volume de l'os. L'apport protéique est donc primordial pour le maintien de cette matrice. Ainsi, l'étude Framingham rapporte une corrélation inverse entre l'apport alimentaire de protéines et la perte de masse osseuse (204). Un apport insuffisant, particulièrement chez la personne âgée, peut contribuer à la morbidité élevée qui survient à la suite d'une fracture ostéoporotique (202). Les protéines jouent également un rôle anabolique indirect sur la masse osseuse en régulant la production hépatique et la concentration sérique d'IGF-1. Un apport insuffisant de protéines contribue à une réduction significative de la concentration sanguine d'IGF-1 (205). De plus, il a été démontré, chez des rats femelles, qu'un apport déficient en protéines alimentaires, cause un état de déficience ou de résistance aux estrogènes, ce qui affecte également la masse osseuse (205). Finalement, les protéines sont une composante essentielle du muscle squelettique et la conservation de la masse musculaire permet d'éviter les chutes et donc de contrer ce facteur de risque de fractures ostéoporotiques.

d) Autres éléments et Neutraceutiques : phytoestrogènes

Plusieurs autres éléments nutritifs ont été associés de façon directe ou indirecte au métabolisme osseux. Il s'agit des fibres alimentaires, des acides gras essentiels, du fer, de la caféine et des oligo-éléments tels le bore, le manganèse, le strontium et le silicium. Peu d'évidences scientifiques viennent supporter le rôle de l'un ou l'autre de ces éléments dans la régulation du remodelage osseux, dans la prévention ou l'accroissement des fractures et dans le maintien ou la perte de la DMO (10).

Les phytoestrogènes sont des composantes du règne végétal particulièrement étudiés pour leur implication dans la conservation de la masse osseuse chez les femmes post-ménopausées. Ils s'apparentent structurellement aux estrogènes endogènes et interagissent avec les mêmes récepteurs tissulaires, quoiqu'ils démontrent une affinité supérieure pour le

récepteur de type β (206). Toutefois, ces composés présentent une activité biologique de 1000 à 10000 fois plus faible et on présume qu'ils possèdent à la fois les effets souhaitables des estrogènes sans en présenter les désavantages. Ils agissent en fait comme des modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes à l'image du tamoxifen (207). Des études d'intervention de courte durée impliquant un faible nombre de sujets, ont montré un effet dose-dépendant des isoflavones sur le maintien et même le gain de DMO de la colonne lombaire de femmes post-ménopausées (208;209). Notons que le riche contenu en os trabéculaire de la colonne lombaire semble répondre plus favorablement aux isoflavones que l'os cortical (210). Finalement, plusieurs études *in vitro* réalisées sur des ostéoblastes et des ostéoclastes, ont montré que la génistéine, un isoflavone, possède des effets anaboliques en plus d'inhiber la résorption osseuse (211).

CHAPITRE 2. TRAVAUX DE RECHERCHE

HYPOTHÈSE EXPÉRIMENTALE

Le statut calcique extracellulaire et le système endocrinien de la D sont des régulateurs importants du contenu calcique des divers compartiments cellulaires et de la voie de signalisation du calcium intracellulaire de même que de la physiologie osseuse interdépendante des éléments impliqués dans la formation et le remodelage osseux tels le calcium, le phosphore, la D et sa forme hormonale, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ et la PTH.

OBJECTIFS GÉNÉRAUX

- 1) Vérifier l'influence du statut calcique extracellulaire et du système endocrinien de la D sur l'homéostasie du calcium intracellulaire par l'étude du contenu cytoplasmique en calcium, de la signalisation cellulaire IP_3 -dépendante et de la taille des réserves calciques.
- 2) Vérifier en utilisant un protocole de réplétion-redéplétion chez des animaux D-Ca- les conséquences de la manipulation du statut nutritionnel en calcium et en D sur l'homéostasie phosphocalcique ainsi que sur la réponse osseuse.

2.1 PREMIER VOLET : INFLUENCE DU STATUT CALCIQUE IN VIVO ET IN VITRO SUR L'HOMÉOSTASIE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

HYPOTHÈSE SPÉCIFIQUE

Le statut calcique extracellulaire et le système endocrinien de la D influencent fortement le contenu calcique des différents compartiments cellulaires de même qu'ils participent à la régulation de la voie de signalisation calcique.

BUT

Vérifier l'influence du statut calcique extracellulaire sur l'homéostasie du calcium intracellulaire. L'atteinte de cet objectif s'est faite par l'évaluation 1) de la concentration basale de calcium cytoplasmique ($[Ca^{2+}]_c$), 2) des réserves mobilisables par l'IP₃, 3) des mécanismes contrôlant l'entrée capacitative de calcium, 4) de l'évaluation de l'expression génique et protéique de la calréticuline, la principale protéine de liaison du calcium du RE et 5) de la taille fonctionnelle des réserves calciques.

PREMISSSES

Les prémisses sur lesquelles ces études reposent sont les observations suivantes :

- 1) L'hypocalcémie chronique couplée à la déficience en D est accompagnée d'anomalies de certaines fonctions biologiques dépendantes de la voie de signalisation calcique telles la sécrétion d'insuline et la croissance compensatrice du foie suite à une hépatectomie partielle (89;212;213).
- 2) Les patrons de réponse calcique à des agonistes mobilisateurs de calcium diffèrent chez les hépatocytes isolés d'animaux D-Ca- comparativement à celles obtenues d'animaux normocalcémiques (N) (214).

3) La $[Ca^{2+}]_c$ de base et la mobilisation des réserves calciques IP_3 -dépendantes par l'agent α_1 -adrénergique, phényléphrine (Phe), sont significativement abaissées, chez l'hépatocyte de rat, en présence d'un état D-Ca- (215).

4) Le foie n'est pas un organe traditionnellement impliqué dans le métabolisme calcique. Néanmoins, l'hépatocyte a été choisi comme modèle cellulaire pour les expériences de calcium intracellulaire pour les trois raisons suivantes:

a) Les patrons de réponse calcique à plusieurs agonistes mobilisateurs de calcium ont été bien caractérisés chez l'hépatocyte (76).

b) L'hépatocyte est une cellule qui s'isole facilement et qui conserve une viabilité cellulaire élevée *in vitro*. Les expériences de mesure de calcium intracellulaire peuvent donc être réalisées rapidement en présence d'une homéostasie calcique représentant fidèlement l'état cellulaire calcique *in vivo*.

c) Les hépatocytes sont conservés dans des conditions *in vitro* similaires à celles prévalant *in vivo*.

ARTICLE 1**INFLUENCE OF THE *IN VIVO* CALCIUM STATUS ON CELLULAR CALCIUM
HOMEOSTASIS AND THE LEVEL OF THE CALCIUM BINDING
PROTEIN CALRETICULIN IN RAT HEPATOCYTES**

**Geneviève Mailhot^{a,b}, Jean-Luc Petit^a, Christian Demers^a, and Marielle Gascon-
Barré^{a-c*}**

Centre de recherche^a, Hôpital Saint-Luc, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,
and Départements de Nutrition^b and Pharmacologie^c,
Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, CANADA

Key words: Hypocalcemia, calcium deficiency, $[Ca^{2+}]_i$, IP₃, calreticulin, calcium signalling, capacitative calcium entry, vitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃

*Corresponding author

Centre de recherche, Hôpital Saint-Luc,
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,
264 René-Lévesque Blvd. East,
Montreal (Quebec) CANADA, H2X 1P1

Tel.: (514) 281-2444 #5707 FAX: (514) 281-2492 E-mail: marielle.gascon.barre@umontreal.ca

Endocrinology, 141 : 891-900, 2000.

ABSTRACT

Little attention has been given to the consequences of the *in vivo* calcium status on intracellular calcium homeostasis despite several pathological states induced by perturbations of the *in vivo* calcium balance. The aim of these studies was to probe the influence of an *in vivo* calcium deficiency on the resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) and the IP_3 -sensitive Ca^{2+} pools. Studies were conducted in hepatocytes (a cell type well characterized for its cellular Ca^{2+} response) isolated from normal (N) and calcium deficient rats (Ca-) secondary to vitamin D depletion. Both resting $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and Ca^{2+} mobilization from IP_3 -sensitive cellular pools were significantly lowered by calcium depletion. In addition, Ca- was shown to significantly reduce calreticulin mRNA and protein levels but calcium entry through store-operated calcium channels remained unaffected by calcium deficiency indicating that the Ca^{2+} entry mechanisms are still fully operational in calcium deficiency. The effects of calcium deficiency on cellular calcium homeostasis were all found to be reversible by repletion with oral calcium feeding alone or by the administration of the calcium-regulating hormone $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ further strengthening the tight link between extra- and intracellular calcium. These data, therefore, challenge the currently prevailing hypothesis that extracellular Ca^{2+} has no significant impact on cellular Ca^{2+} by demonstrating that, despite the large Ca^{2+} gradient between extra- and intracellular Ca^{2+} concentration, calcium deficiency *in vivo* significantly alters the hormone-sensitive cellular calcium homeostasis.

FOOTNOTE

Abbreviations: 1,25(OH)₂D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or calcitriol; 1,25(OH)₂D₃+, hypocalcemic rats supplemented with 1,25(OH)₂D₃; ATP, adenosine triphosphate; BSA, bovine serum albumin; Ca-, hypocalcemic rats; Ca+, hypocalcemic rats supplemented with oral calcium; [Ca²⁺]_c, cytoplasmic Ca²⁺ concentration; [Ca²⁺]_e, extracellular Ca²⁺ concentration; [Ca²⁺]_i, intracellular Ca²⁺ concentration; CaBP, calcium binding protein; CF₅₀, half-maximum cumulative frequency or median; CRT, calreticulin; D, vitamin D; VDR_n, nuclear vitamin D receptor; EGTA, Ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl-ether)-N',N',N',N',-tetraacetic acid; ER, endoplasmic reticulum; FCCP, carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; IP₃, 1,4,5-inositol trisphosphate; ka, kilodalton; kb, kilobase; N, normal rats; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; se, serum; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; Tg, thapsigargin.

INTRODUCTION

To date little attention has been given to the consequences of the *in vivo* calcium status on intracellular calcium homeostasis despite the fact that chronic states of hypo- or hypercalcemia are often observed in humans at all ages. Pathologies such as rickets, osteoporosis, growth retardation, sub-optimal insulin secretion and nephrolithiasis are only a few of the abnormalities that are induced by perturbations in the *in vivo* calcium balance. They are associated with a wide range of conditions such as primary or secondary hyperparathyroidism, malabsorption syndrome, vitamin D (D) deficiency, cancer-induced hypercalcemia as well as the many disease states induced by mutations in the calcium-regulating hormone receptors and the calcium-sensing receptor which result in inappropriate cellular signalling leading to cellular defects in many tissues and organs (1-3).

We have lately reported that chronic calcium deficiency *in vivo* perturbs the qualitative and quantitative cytoplasmic Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_c$ response to several classes of calcium mobilizing agonists (4-7). It has also been reported that calcium and/or calcium-regulating hormone deficiency also leads to a decreased bile flow (8) and to inappropriate cellular responses associated with the hepatic regeneration process (6,9-11), and the induction of liver *foci* in a model of hepatocarcinogenesis (12). These observations have contributed to the hypothesis that calcium deficiency *in vivo* is not only associated with an abnormal calcium signalling but that the cellular calcium pools might also be significantly influenced by chronic hypocalcemia. To date, however, little experimental evidence has been put forward indicating that the hormone-sensitive intracellular Ca^{2+} pools are significantly sensitive to the *in vivo* calcium status.

The aim of the present studies was to probe the influence of chronic hypocalcemia on both the resting basal $[Ca^{2+}]_c$ and the inositol-1,4,5 tris-phosphate (IP_3)-sensitive Ca^{2+} pools, and to investigate the effect of calcium repletion in the presence or absence of the D_3 hormone 1,25-dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) on these pools in order to further illustrate the participation of the *in vivo* calcium status on their regulation.

We now report that calcium deficiency secondary to D depletion *in vivo* leads to significant decreases in the resting $[Ca^{2+}]_c$, the size of the IP_3 -sensitive Ca^{2+} pools and the abundance of one of the major endoplasmic reticulum (ER) calcium binding protein, perturbations which are all reversible by oral calcium feeding alone or by repletion with the calcium regulating hormone $1,25(OH)_2D_3$.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

Ionomycin, oligomycin, saponin, rotenone, IP_3 , Tg, Hepes buffer, FCCP, EGTA, and sodium pyrophosphate were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MI, USA); William's medium E from Gibco BRL (Burlington, ON, Canada); Heparin from Leo Laboratories, Ajax, ON, Canada); BSA, pepstatin, leupeptin, ATP, creatine phosphate, creatine kinase and NBT and X-phosphate reagents from Roche Diagnostics (Laval, Qc, Canada); Fura-2 AM, Fura-2 free acid, and mag-Fura-2-AM from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR); Nylon and ECL membranes, First-Strand cDNA synthesis kit was from Amersham Pharmacia Biothech (Baie d'Urfé, Qc, Canada);Taq PCR Mix from Qiagen (Mississauga, ON, Canada); pCR2.1 from Invitrogen (Carlsbad, CA); Rabbit polyclonal anti-human calreticulin antibody from Stressgen Biotechnologies Corp. (Victoria, BC, Canada); Anti-rabbit IgG linked to alkaline phosphatase from Pharmingen (San Diego, CA), NBT and X-phosphate reagents from Roche (Laval, Qué., Canada); PVDF membrane (Millipore, Mississauga, Ontario, Canada). $1,25(OH)_2D_3$ was a gift of the Hoffman-LaRoche Company (Nutley, NJ). All other materials were of analytical grade or better.

EXPERIMENTAL DESIGN

The influence of the *in vivo* calcium status on intracellular Ca^{2+} homeostasis was studied using hepatocytes isolated (13) from normal male Sprague-Dawley rat (Charles River Canada, Ltd., St.Constant, Qc, Canada) livers (N) equilibrated *in vitro* in culture medium adjusted at Ca^{2+} of 1.25 mM, a concentration similar to that observed *in vivo* (se Ca^{2+} : 1.26 ± 0.02 mM), and in hepatocytes obtained from chronically hypocalcemic rats (Ca-) (induced by a functional calcium depletion through D deficiency as previously

described (11,14)) kept *in vitro* at $[Ca^{2+}]_e$ of 0.8 mM, a concentration similar to the prevailing Ca^{2+} *in vivo* (se Ca^{2+} : 0.80 ± 0.01 mM, $p < 0.0001$ vs N). To investigate the reversibility of the calcium deficiency, Ca- rats were repleted with either oral calcium alone for 2 weeks with a 3% calcium gluconate solution as drinking water (Ca+), or $1,25(OH)_2D_3$ at a dose of 28 pmol/d delivered by osmotic mini-pump for 1 week ($1,25(OH)_2D_3+$) as previously described (11,14). Hepatocytes obtained from the two latter groups were equilibrated *in vitro* in culture medium adjusted at the normal $[Ca^{2+}]_e$ of 1.25 mM, a concentration comparable to the *in vivo* Ca^{2+} (se Ca^{2+} : 1.27 ± 0.01 for Ca+ and 1.28 ± 0.01 mM for $1,25(OH)_2D_3+$ respectively).

Hepatocytes were chosen as model cells because their cellular calcium metabolism is well characterized, and also because they can easily be obtained following *in vivo* conditioning and used shortly after their isolation procedure under primary culture conditions reflecting closely the *in vivo* situation, a condition which may be difficult to achieve with other cell types such as osteoblasts or other cell types in mineralized tissues. In the present studies, $[Ca^{2+}]_e$ was, therefore, adjusted at concentration similar to that observed *in vivo* in order not to disturb cellular Ca^{2+} homeostasis although a previous study clearly indicated that resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration is not influenced by *in vitro* $[Ca^{2+}]_e$ of 1.25 or 0.8 mM in hepatocytes isolated from hypo- as well as from normocalcemic rats (4).

Concentrations of ionized calcium in whole blood, and in culture and experimental solutions were measured with a ICA2 ionized calcium analyser (Radiometer, Copenhagen, Denmark). All experimental protocols were approved by the institutional animal ethics committee.

CYTOPLASMIC Ca^{2+} MEASUREMENTS AT THE SINGLE CELL LEVEL

Hepatocytes were plated onto collagen-coated coverslips in William's medium E containing 25 mM bicarbonate and 1% BSA, Ca^{2+} of 0.8 or 1.25 mM as mentioned above, pH 7.4, 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 60 min of culture, cells were loaded for 30 min at 20°C with 2 μM FURA 2-AM in bicarbonate-free William's medium E supplemented with 2.5% fetal bovine serum and 1% BSA. Cells were then transferred into a 100 μl plastic chamber to the stage of an inverted microscope (Nikon Diaphot, Nikon Corp., Tokyo, Japan) equipped for epifluorescence measurement and superfused (3 mL/min) with a Krebs-Henseleit buffer pH 7.4 equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, V:V) at 32°C. Basal resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration was evaluated at $[\text{Ca}^{2+}]_e$ of 0.8 (Ca-) or 1.25 mM Ca^{2+} (normocalcemic groups). Tg (5 μM) exposure was achieved in a calcium-free environment containing 0.2 mM EGTA while exposure to Phenylephrine (Phe) (5 μM) or to La^{3+} was achieved in a calcium-free environment without EGTA. Test compounds were perfused at a rate of 3 mL/min in a Krebs-Henseleit buffer pH 7.4 equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v) at 32°C. Experiments requiring La^{3+} were carried out in similar conditions with the exception that an HEPES buffer was used due to the poor solubility of La^{3+} in Krebs-Henseleit buffer.

Fluorescence signals were obtained from single hepatocytes with a MCID dual excitation spectrofluorometer system (Imaging Research Inc., St.Catherine, ON, Canada) and a refrigerated camera (Hamamatsu Photonics C4880, Hamamatsu-city, Japan) as imaging device. Excitation wavelengths were 340 and 380 nm and fluorescence emission was measured at 505 nm. Intracellular dye calibration was performed *in situ* by perfusion of 2.5 μM ionomycin in a solution containing 4 mM EGTA (R_{\min}) or 6 mM CaCl_2 , 10 μM FCCP and 2.5 μM ionomycin (R_{\max}). Signal ratios (F_{350}/F_{380}) were transformed into $[\text{Ca}^{2+}]_e$

according to Gryniewicz *et al.* (15). Intracellular dye spectra and loading capacities were equivalent in all groups.

IP₃-INDUCED [Ca²⁺]_i MOBILIZATION IN PERMEABILIZED HEPATOCYTE SUSPENSION

Two sets of experiments were carried out:

1. Ca²⁺ mobilization under steady-state conditions

Hepatocytes were incubated at 37° C in the stirred thermostated (37° C) cuvette of a SPEX model CMIT-11I dual excitation spectrofluorometer (Rayonics Scientific Inc., St.Laurent, Qc, Canada). Plasma membranes were permeabilized in medium containing 120 mM KCl, 30 mM HEPES, 1.0 mM MgCl₂, 100 µg/ml saponin, 1.0 mM ATP, and an ATP-generating system containing 25 mM creatine phosphate, 25 units/ml creatine kinase, 5 mM sodium pyrophosphate, 10 µM mitochondrial inhibitor FCCP, pH 7.3. Permeabilized cells were washed once, centrifuged, and resuspended in buffer without saponin at a density of 10⁷ hepatocytes/ml according to Missiaen *et al.* (16). IP₃-induced Ca²⁺ mobilization (1 to 25 µM) was carried in the presence of 10 µM Fura-2 free acid in a calcium-free medium.

2. Ca²⁺ mobilization following prior emptying of the IP₃-sensitive Ca²⁺ pools

To further evaluate the influence of the *in vivo* calcium status on the size of the IP₃-sensitive Ca²⁺ pools, hepatocytes were isolated and resuspended in calcium-free medium. They were then stimulated with 5 µM Phe for a period of 30 sec. in order to mobilize IP₃-sensitive Ca²⁺ pools. Cells were then centrifuged, resuspended as mentioned above and stimulated a second time with 5µM Phe. After centrifugation, hepatocytes were resuspended at a density of 10⁷ cells/ml. They were then permeabilized and mobilization of Ca²⁺ evaluated using IP₃ at doses of 0 to 25 µM as described above. Permeabilization of cells allowed the IP₃ -sensitive Ca²⁺ pools to recapture Ca²⁺ (buffer Ca²⁺: 300 nM). To

verify the specificity of Ca^{2+} uptake into cellular pools, replenishment of the IP_3 -sensitive Ca^{2+} pools was blocked by application of $10\mu\text{M}$ Tg during Phe application as well as during exposure to 300 nM Ca^{2+} .

INFLUENCE OF *IN VITRO* $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ON THE IP_3 -SENSITIVE Ca^{2+} POOLS

To verify whether the cellular Ca^{2+} pools might be influenced by the *in vitro* $[\text{Ca}^{2+}]_e$, paired hepatocytes from N and from Ca- rats were pre-incubated at 1.25 or 0.8 mM Ca^{2+} . Cellular Ca^{2+} pool content was monitored using $5\mu\text{M}$ mag-Fura-2-AM as probe according to Hofer *et al.* (17). After mag-Fura-2-AM loading (40 min. at 20°C), hepatocytes were exposed to $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ saponin for a period of 1 min. in a calcium-free buffer containing 125 mM KCl, 25 mM NaCl, 10 mM HEPES, 0.1 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, pH 7.3 at 37°C in order to achieve plasma membrane permeabilization. Ca^{2+} mobilization from internal pools was directly achieved with $10\text{ }\mu\text{M}$ IP_3 in the buffer mentioned above but in the absence of saponin. Fluorescence signals were obtained at the single cell level using the imaging system described to measure cytoplasmic Ca^{2+} concentrations. Data are presented as the signal ratios obtained at 340 and 380 nm.

STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY

Store-operated/capacitative Ca^{2+} entry was evaluated in N and Ca- rats by exposing cells to 0.4 to 3.0 mM extracellular Ca^{2+} following emptying of the IP_3 -sensitive calcium pools with two consecutive applications of $5\mu\text{M}$ Phe in a calcium-free environment. Ca^{2+} entry into cells was evaluated in single hepatocytes by monitoring the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_e$ during extracellular Ca^{2+} application.

EVALUATION OF THE CALRETICULIN GENE TRANSCRIPT AND PROTEIN LEVELS

Total liver RNA was blotted onto nylon membrane and processed for Northern analysis as described earlier (18). The radiolabelled probes were: calreticulin, a 1.7 kb rat cDNA fragment obtained by RT-PCR using primers based on the sequence of Murthy *et al.* (19); ribosomal 18S RNA, a 1.5 kb human cDNA insert from the EcoRI site of the pBluescript SK-vector (ATCC (#77242)). The Primers Software of Williamstone Enterprises (<http://www.williamstone.com>) was used to generate the calreticulin fragment. Briefly, 5µg total RNA were converted into cDNA using First-Strand cDNA synthesis Kit and 1.0 µl of RT reaction was amplified with Taq PCR Master Mix using a Touchdown Thermal Cycler (Hybaid, Teddington, UK). The PCR fragment was inserted into pCR 2.1 and the sequence confirmed by restriction analysis. The probes were labelled by random oligo-priming (20) using [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mol) and Klenow fragment. Blot hybridization, washing, exposure, and photodensitometric evaluation were performed as described previously (18).

Relative levels of immunoreactive calreticulin protein were determined by Western blot analysis. Liver samples were homogenized as described by Loyer *et al.* (21) and protein concentration determined according to Bradford (22). 20 µg proteins were loaded onto SDS-PAGE 5-15% acrylamide gradient gel and transferred on PVDF membranes. The membranes were incubated for 2h at 37°C with a rabbit polyclonal anti-human calreticulin antibody (1:1000) followed by incubation with an anti-rabbit IgG linked to alkaline phosphatase (1:1000). The antigen-antibody complex was visualized with NBT and X-phosphate reagents. Band quantification was achieved by densitometry scanning (18).

MATHEMATICAL AND STATISTICAL ANALYSES

Results are expressed as means \pm SEM. Basal resting $[Ca^{2+}]_c$ are, however, presented as cumulative frequency curves and medians due to the right skewed distribution of the observed $[Ca^{2+}]_c$ values. Fitting of data on the observed resting basal cytoplasmic Ca^{2+} concentration, and the IP_3 -sensitive Ca^{2+} mobilization from cellular pools was done according to the non-linear regression model of Motulsky and Ransnas (23). Statistically significant differences between group means were evaluated by analysis of variance or the χ^2 test as indicated in the Figure legends (24).

RESULTS

BASAL CYTOPLASMIC CALCIUM

Figure 1 presents the basal resting cytoplasmic Ca^{2+} concentrations in hepatocytes obtained from normal rats as well as from those submitted to a regimen leading to hypocalcemia, or following repletion with oral calcium alone or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. As illustrated, a highly significant shift to the left in the observed cumulative cytoplasmic Ca^{2+} concentration frequency curve was observed in cells obtained from hypocalcemic rats. Indeed, the median (cumulative frequency at 50%) resting cytoplasmic Ca^{2+} value was found to be 115.5 nM compared to a value of 150.5 nM in hepatocytes obtained from normal rats ($p < 0.0001$). Repletion with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ completely normalized resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration (median: 155 nM) while repletion with calcium alone led to a significant increase in basal cytoplasmic Ca^{2+} (median: 195 nM) not only above that observed in hypocalcemia ($p < 0.0001$ compared to Ca-) but also above that observed in N or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -repleted rats ($p < 0.0001$ compared to either N or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3+$) despite similar circulating Ca^{2+} concentration (Ca+: 1.27 ± 0.01 , N: 1.26 ± 0.02 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3+$: 1.28 ± 0.01 mM, N.S.).

EVALUATION OF THE HORMONE-SENSITIVE CALCIUM POOLS

1. RESPONSE TO THAPSIGARGIN

In an attempt to probe the cellular Ca^{2+} pools, three series of experiments were carried out. Hepatocytes were first exposed, in a calcium-free environment, to the SERCA inhibitor Tg (25) and the cytoplasmic Ca^{2+} response evaluated. Tg exposure prompted increases in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in all groups but the Ca^{2+} peak amplitude was significantly lower in cells obtained from Ca- animals than that observed in hepatocytes obtained from

normocalcemic rats ($p < 0.0001$) (Fig. 2). Repletion with calcium alone increased cytoplasmic Ca^{2+} during Tg exposure to a value similar to that observed in N while $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ repletion led to an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ to a level higher than that observed in hepatocytes obtained from rats supplemented with oral calcium alone. One striking difference between the various groups, however, was the frequency with which Tg induced an elevation in cytoplasmic Ca^{2+} . Indeed, detectable increases in cytoplasmic Ca^{2+} in response to Tg application were observed in 69 and 62% of the cells obtained from N and Ca^+ rats respectively (N.S.), and 47% of cells obtained from $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -repleted rats ($p < 0.001$ vs N, and $p < 0.01$ vs Ca^+). By contrast, only 14% of the Ca^- animals exhibited a detectable cytoplasmic Ca^{2+} response in the presence of Tg ($p < 0.0001$ vs all other groups). The absence of detectable responses to Tg did not, however, seem to be due to methodological problems as non responding cells were found to be fully responsive to stimulation with $5\mu\text{M}$ phenylephrine or 10 nM vasopressin (data not shown).

2. IP_3 -MEDIATED Ca^{2+} MOBILIZATION

To investigate further the impact of calcium deficiency on the hormone-sensitive calcium pools and to address the short-comings in the Tg experiments, permeabilized hepatocytes were directly probed with increasing concentrations of IP_3 under either steady-state conditions (Fig. 3), or following Ca^{2+} mobilization with two successive doses of Phe prior to IP_3 exposure (Fig.4). As shown in Figure 3A, calcium deficiency led to a highly significant decrease in IP_3 -dependent Ca^{2+} mobilization when compared to that observed in cells obtained from normal rats ($p < 0.0001$). Repletion with oral calcium or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ similarly increased IP_3 -dependent Ca^{2+} mobilization to a level slightly above (but not significantly) that observed in cells obtained from normals but to a level highly above that observed in Ca^- ($p < 0.0001$). Ca^{2+} mobilization in response to IP_3 exposure was completely blocked by heparin, an inhibitor of the IP_3 receptor (26,27) (Fig. 3B,C).

As illustrated in Figure 4A, the prior emptying of the IP₃-sensitive Ca²⁺ stores with two successive Phe applications followed by an acute replenishment of the pools in the presence of 300 nM Ca²⁺ also led to a highly significant decrease in IP₃-dependent Ca²⁺ mobilization in hepatocytes obtained from calcium deficient animals when compared to that observed in cells obtained from all other normocalcemic rats (p<0.0001). Repletion with oral calcium or 1,25(OH)₂D₃ increased IP₃-dependent Ca²⁺ mobilization to a level similar to that observed in cells obtained from normal animals. As illustrated in Figure 4B and C, prevention of the IP₃-sensitive Ca²⁺ pool replenishment with Tg completely blocked IP₃-induced Ca²⁺ mobilization while Ca²⁺ mobilization by the calcium ionophore ionomycin remained fully operational.

3. INFLUENCE OF THE *IN VITRO* [Ca²⁺]_e

The influence of the *in vitro* extracellular Ca²⁺ concentration on the IP₃-sensitive Ca²⁺ pools is presented in Figure 5. Data clearly show that, under our experimental conditions, preincubation of cells of either normal (Fig. 5A) or calcium deficient rat livers (Fig. 5B) at 0.8 or 1.25 mM [Ca²⁺]_e does not influence cellular Ca²⁺ pool content at both the resting state (before IP₃ application) as well as following IP₃-induced Ca²⁺ mobilization.

STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY

To study whether store-operated/capacitative Ca²⁺ entry mechanism(s) (17,28) might be responsible for the relative depletion state of the IP₃-sensitive calcium pools in hypocalcemia, Ca²⁺ entry during exposure to [Ca²⁺]_e following emptying of the IP₃-sensitive calcium pools with two consecutive applications of 5μM phenylephrine in a calcium-free environment was investigated in hepatocytes obtained from either N or Ca-rats. As illustrated in Figure 6A and B, Ca²⁺ entry from the external compartment was not

perturbed by hypocalcemia and was blocked in both N and Ca- by La^{3+} (Fig. 6C and D), a known blocker of the store-operated calcium channel (29).

CALRETICULIN GENE TRANSCRIPT AND PROTEIN LEVELS

As illustrated in Figures 7A and B, calcium depletion significantly lowered the steady state expression of the calreticulin gene transcript ($p < 0.01$ vs N) while repletion with calcium alone or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ significantly increased the CRT gene transcript to a level comparable to that observed in N. The calreticulin protein levels (Fig. 7B) were also found to be significantly lower in cells isolated from Ca- than in those obtained from the N ($p < 0.0001$). Repletion with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ or calcium alone contributed to significantly increase CRT levels above those observed in Ca- ($p < 0.001$ vs $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3+$; $p < 0.002$ vs Ca+), levels which were found not to be significantly different than those observed in hepatocytes isolated from normal animals.

DISCUSSION

Due to the large concentration gradient between extra- and intracellular Ca^{2+} , basal resting cytoplasmic Ca^{2+} is largely considered to be insensitive to the prevailing $[\text{Ca}^{2+}]_e$. However, to date, most studies have evaluated the impact of external Ca^{2+} in *in vitro* models most often using Ca^{2+} concentrations well outside the normal physiological range in cells or cell lines maintained *in vitro* for extended periods of time. In contrast, the present data were obtained using cells isolated from animals subjected to a well characterized protocol of calcium deficiency secondary to D depletion. In addition, great care has been taken to maintain cells *in vitro* at $[\text{Ca}^{2+}]_e$ similar to those prevailing *in vivo* and to keep the *ex vivo* period as short as possible in order not to disturb the *in vivo*-conditioned cellular Ca^{2+} homeostasis although under short-term incubation conditions, $[\text{Ca}^{2+}]_e$ has been shown not to be disturbed by *in vitro* Ca^{2+} variations in the range of 0.8 to 1.25 mM (4). The data obtained under these conditions clearly show that hypocalcemia significantly lowers the basal resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration. Our observations, therefore, indicate that, in otherwise normal animals (11,30), calcium deprivation is able to shift to the left the resting hepatocellular calcium concentration curve as well as the mean $[\text{Ca}^{2+}]_e$ when compared to the concentration observed in normal animals. Moreover, this shift was shown to be fully reversible by calcium repletion in association with the D hormone or by oral calcium repletion alone, the latter condition leading to an apparent supra-normal correction in the resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration. The observation that the resting hepatocytic $[\text{Ca}^{2+}]_e$ was found to be consistently higher in cells obtained from animals supplemented with oral calcium alone despite circulating Ca^{2+} concentrations similar to the two other normocalcemic groups is not presently known. However, the level of dietary calcium needed to maintain normal circulating Ca^{2+} concentration was much higher in the Ca^{2+}

group (3 % calcium gluconate in drinking water) than in the Normal (no added calcium in drinking water) and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ groups (0.5% calcium gluconate in drinking water). Hence, dietary calcium *per se* might be an important contributing factor to the resting $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Alternatively, it could be argued that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and/or the parathyroid hormone (PTH) may also be contributing factors as Ca^{2+} animals remained D depleted despite normalization of circulating Ca^{2+} , a state which is known not to completely normalize the secondary hyperparathyroidism induced by D depletion (31). The data obtained, hence, illustrate the impact of the *in vivo* Ca^{2+} status on the resting cellular Ca^{2+} homeostasis but, most importantly, they raise the question as to the impact of the *in vivo* calcium status, with its observed effect on the resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration, on the state of the intracellular calcium pools.

Both series of studies aimed at probing the size of the hormone-sensitive Ca^{2+} pools strongly suggest the presence of a significant reduction in the apparent content of these pools. In the Tg experiments, the absence of a Tg-induced elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in a significant number of cells may have been due to several variables such as a low Ca^{2+} pool content, a rapid Ca^{2+} uptake by adjacent organelles such as the mitochondria (32), or a lower Tg-induced passive Ca^{2+} leak from the ER in some groups (*i.e.* Ca- or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ +) than in others (33). The latter two conditions would lead to a significant under estimation of the size of the Tg-sensitive calcium pools in the affected groups. However, the IP_3 -mobilization studies circumvent the weaknesses of the Tg studies by directly probing the hormone-sensitive pools with IP_3 . These studies clearly demonstrate that, under both steady-state conditions and following emptying/replenishment, the IP_3 -dependent Ca^{2+} pools were significantly lowered by the hypocalcemic condition and fully restored by normalizing serum Ca^{2+} with calcium alone or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. The reason for the consistently higher Ca^{2+} mobilization under conditions of emptying/replenishment of the

IP₃-sensitive Ca²⁺ pools than under steady-state condition is not known but is postulated to be due to either a greater sensitivity of the IP₃ receptor induced by the prior exposure to Ca²⁺, or to an increase availability of Ca²⁺ following its acute uptake into cellular pools. Here again, the *in vitro* incubation conditions (0.8 and/or 1.25 mM Ca²⁺) were shown not to influence pool size as clearly indicated using mag-Fura-2 as probe to evaluate the IP₃-sensitive Ca²⁺ pool content. These data, thus, clearly indicate that, in rat hepatocytes, the *in vivo* calcium status is a major determinant of the size of the IP₃-mobilizable Ca²⁺ pool as the IP₃ concentrations used led to receptor saturation and were within a range able to mobilize both the sensitive as well as the less sensitive Ca²⁺ units (34,35).

The mechanisms by which the *in vivo* calcium status is involved in the regulation of cellular calcium homeostasis is not presently known as circulating Ca²⁺ has been well documented not to freely enter cells. However, Ca²⁺ has been shown to enter cells following agonist stimulation or emptying of the IP₃-sensitive calcium pools through store-operated or capacitative calcium channels, a mechanism aimed at replenishing calcium pools following agonist stimulation (17,28). The data obtained during the present studies indicating that Ca²⁺ entry following Phe exposure was totally operational in cells obtained from hypocalcemic animals indicate that the mechanism(s) responsible for Ca²⁺ entry following agonist stimulation, the capacitative calcium entry, are not intrinsically perturbed by calcium deficiency. Furthermore, our studies also clearly show that Ca²⁺ can, not only enter the cytoplasmic compartment, but can also accumulate into cellular stores as indicated by the IP₃-induced Ca²⁺ mobilization following emptying/recharging of the hormone-sensitive pools, a recharging which was completely blocked by Tg. These observations indicate that, in calcium deficiency, cells can adequately take up and accumulate Ca²⁺ into cellular pools. However, optimum pool replenishment may be limited by the available concentration of extracellular Ca²⁺ which in hypocalcemia is significantly

lower than in normocalcemia. In addition to Ca^{2+} entry, cellular Ca^{2+} homeostasis is also regulated by its extrusion at the plasma membrane. A previous study from our laboratory has shown that the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase which is responsible for Ca^{2+} extrusion from the cell is also unperturbed by calcium and/or D depletion (4). Collectively these observations indicate that both Ca^{2+} entry and calcium extrusion do not seem to be the mechanisms responsible for the decrease in the size of the hormone-sensitive Ca^{2+} pools associated with calcium deficiency although, as mentioned above, the level of $[\text{Ca}^{2+}]_e$ may, *per se*, be a limiting factor particularly during long lasting calcium deficiency.

In the light of the data indicating the presence of lower cellular Ca^{2+} pools in calcium deficiency, it was postulated that cellular calcium accumulation in hormone-sensitive pools might involve protein(s) known to bind Ca^{2+} within the ER which have been reported to be able to modulate the functional size of the cellular calcium pools (36-38). Lately, several laboratories have published data indicating that calreticulin, a high-capacity, low affinity CaBP located in the lumen of the ER, is able to play such a role (38-41). To study whether calreticulin might be influenced by hypocalcemia, investigation of the steady state expression of its gene transcript as well as associated protein was carried out in hepatocytes from the four experimental groups. The data obtained indicate that chronic hypocalcemia is not only accompanied by a lowering of the IP_3 -dependent Ca^{2+} pools but also by a significant but reversible decrease in the calreticulin gene transcript. Moreover, its immunoreactive protein level was found to be normalized by the repletion protocols at the time-point studied during the present experiments. Ongoing studies in our laboratory (unpublished) show that the calreticulin gene transcript rapidly responds to dietary calcium suggesting a possible regulation by calcium availability.

The data illustrate that calreticulin, a major luminal CaBP known to be mainly located in Tg- and IP_3 -sensitive calcium stores (39,40,42) and suspected to act as major

regulator of the size of the ER hormone-sensitive calcium pools is significantly influenced by the *in vivo* calcium status (37,39,40). In addition, the latter observation suggest that restoring the *in vivo* calcium status by oral calcium alone is sufficient to normalize the level of the ER CaBP calreticulin as judged by the levels of its mRNA and immunoreactive protein. The predominant role of calcium in the modulation of the cellular calcium pools in the present model as judged by the size of the functional IP₃-sensitive Ca²⁺ pools is congruent with the reported low level of nuclear vitamin D receptor (VDR_n) in hepatocytes (43-45). Interestingly, preliminary data from our laboratory also indicate that similar effects on cellular calcium pools are observed by varying the [Ca²⁺]_e alone in the VDR_n positive osteoblastic cell line ROS 17/2.8 (46) suggesting that the data obtained on hepatocytes during the present studies may well reflect the influence of the calcium status on cells known to be targets for the calcium/vitamin D endocrine system.

In conclusion, the five criteria chosen to evaluate the impact of the extracellular calcium status on cellular calcium homeostasis clearly illustrate that a state of calcium deficiency *in vivo* significantly alters cellular calcium homeostasis by lowering both the basal [Ca²⁺]_c as well as the IP₃-dependent Ca²⁺ pools, a lowering which cannot be attributed to perturbations in the mechanisms responsible for Ca²⁺ entry through the store-operated calcium channels, or extrusion of Ca²⁺ at the plasma membrane as reported previously (4). The decrease in the size of the cellular calcium pool was, however, shown to be accompanied by a significant decrease in the steady state levels of the calreticulin transcript as well as of its protein which were both shown to promptly respond to oral calcium repletion alone independently of 1,25(OH)₂D₃ administration. Collectively, these data which were obtained using a well characterized physiological model of calcium deficiency in otherwise normal rats, illustrate that the *in vivo* calcium status is a main determinant of cellular calcium, a notion which gives rise to a paradigm shift in our understanding of

cellular calcium homeostasis and regulation. These observations may contribute to our understanding of several pathologies associated with sub-optimal calcium status particularly in the context of the aging population where a poor calcium and D status is often reported (47-50), and in the investigation of its role in the development of debilitating diseases such as osteoporosis, inappropriate insulin secretion and others (50-54).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Ms. Manon Livernois for her excellent secretarial assistance. These studies were supported by the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. **Mooren FC, Kinne RKH** 1998 Cellular calcium in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1406:127-151
2. **Zaloga GP, Chernow B** 1986 Hypocalcemia in critical illness. *JAMA* 256:1924-1929
3. **Nordin BEC** 1997 Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 13:664-686
4. **Gascon-Barré M, Haddad P, Provencher SJ, Bilodeau S, Pecker F, Lotersztajn S, Vallières S** 1994 Chronic hypocalcemia of vitamin D deficiency leads to lower resting intracellular calcium concentrations in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 93:2159-2167
5. **Éthier C, Goupil D, Demers C, Hendy GN, Gascon-Barré M** 1993 Hypocalcemia, regardless of the vitamin D status, decreases epidermal growth factor receptor density and autophosphorylation in rat livers. *Endocrinology* 133:780-792
6. **Bilodeau M, Provencher S, Néron S, Haddad P, Vallières S, Gascon-Barré M** 1995 Hypocalcemia decreases the early and late responses to epidermal growth factor in rat hepatocytes. *Hepatology* 21:1576-1584
7. **Gascon-Barré M, Petit JL, Éthier C, Bilodeau S** 1997 Hypocalcemia modifies the intracellular calcium response to the α_1 -adrenergic agent phenylephrine in rat hepatocytes. *Cell Calcium* 22:343-356
8. **Gascon-Barré M, Gamache M** 1991 Contribution of the biliary pathway to the homeostasis of vitamin D₃ and of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 129:2335-2344
9. **Rixon RH, MacManus JP, Whitfield JF** 1979 The control of liver regeneration by calcitonin, parathyroid hormone and 1 α -dihydroxycholecalciferol. *Mol Cell Endocrinol* 15:79-89

10. **Sikorska M, Whitfield JF, Rixon RH** 1983 The effects of thyroparathyroidectomy and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on changes in the activities of some cytoplasmic and nuclear protein kinases during liver regeneration. *J Cell Physiol* 115:297-304
11. **Éthier C, Kestekian R, Beaulieu C, Dubé C, Havrankova J, Gascon-Barré M** 1990 Vitamin D depletion retards the normal regeneration process following partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology* 126:2947-2959
12. **He RK, Gascon-Barré M** 1997 Influence of the vitamin D status on the early response to carcinogen exposure in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 281:464-469
13. **Berry MN, Friend DS** 1969 High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 43:502-506
14. **Haddad P, Gascon-Barré M, Brault G, Plourde V** 1986 Influence of calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D₃ supplementation on the hepatic microsomal and *in vivo* metabolism of vitamin D₃ in vitamin D-depleted rats. *J Clin Invest* 78:1529-1537
15. **Gryniewicz G, Poeni M, Tsien RY** 1986 A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450
16. **Missiaen L, Taylor CW, Berridge MJ** 1991 Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature* 352:241-244
17. **Hofer AM, Fasolato C, Pozzan T** 1998 Capacitative Ca²⁺ entry is closely linked to the filling state of internal Ca²⁺ stores: A study using simultaneous measurement of I_{CRAC} and intraluminal [Ca²⁺]. *J Cell Biol* 140:325-334
18. **Demers C, Lemay J, Hendy GN, Gascon-Barré M** 1997 Comparative *in vivo* expression of the calcitriol-24-hydroxylase gene in kidney and intestine. *J Mol Endocrinol* 18:37-48

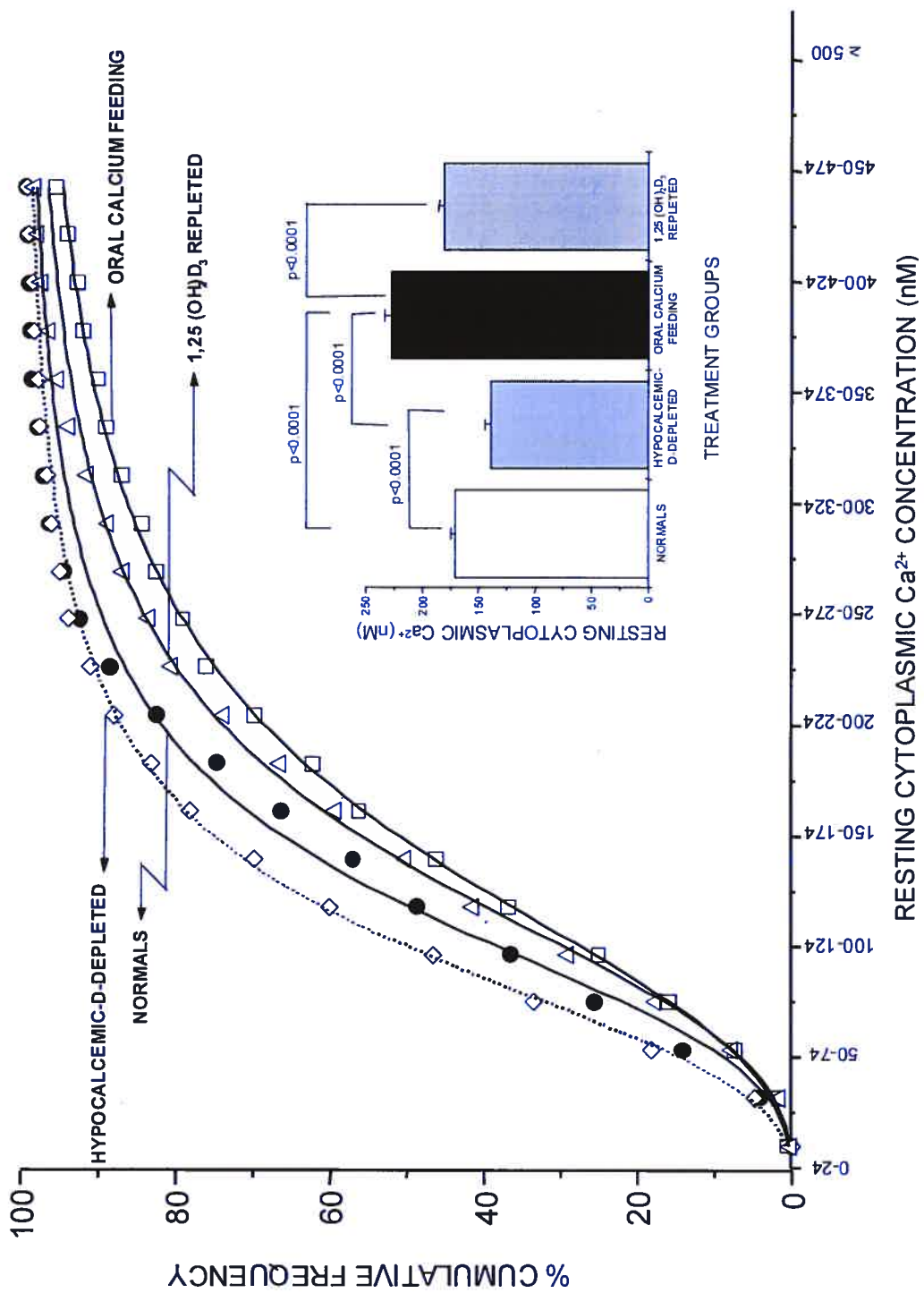
19. **Murthy KK, Banville D, Srikant CB, Carrier F, Holmes C, Bell A, Patel YC** 1990 Structural homology between the rat calreticulin gene product and the *Onchocerca volvulus* antigen ral-1. Nucl Acid Res 18:4933
20. **Feinberg AP, Vogelstein B** 1983 A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity activity. Anal Biochem 132:6-13
21. **Loyer P, Glaise D, Carious S, Baffet G, Meijer L, Guguen-Guillouzo C** 1993 Expression and activation of cdks (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. J Biol Chem 269:1-10
22. **Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254
23. **Motulsky HJ, Ransnas LA** 1987 Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. FASEB J 1:365-374
24. **Glantz SA, Slinker BK** 1990 Primer of applied regression and analysis of variance. McGraw-Hill, Inc. New York,
25. **Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP** 1990 Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Proc Natl Acad Sci USA 87:2466-2470
26. **Hansen CA, Yang L, Williamson J** 1991 Mechanisms of receptor-mediated Ca^{2+} signaling in rat hepatocytes. J Biol Chem 266:18573-18579
27. **Ehrlich BE, Kaftan E, Bezprozvannaya S, Bezprozvanny I** 1994 The pharmacology of intracellular Ca^{2+} -release channels. TiPS 15:145-149
28. **Putney JM, Jr.** 1986 A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium 7:1-12

29. **Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T** 1994 Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? *TiPS* 15:77-83
30. **Dubé C, Vallières S, Éthier C, Benbrahim N, Tremblay C, Gascon-Barré M** 1991 In micronodular cirrhosis, hepatocytes retain a normal C-25 hydroxylation capacity toward vitamin D_3 : A study using the rat CCl_4 -induced cirrhotic model. *Hepatology* 13:489-499
31. **Demers C, Hatami A, Hendy GN, D'Amour P, Bilodeau S, Gascon-Barré M** 1997 Involution of secondary hyperparathyroidism in the nutritional model of vitamin D depletion in the rat. *Proceedings of the 10th Workshop on Vitamin D* 234
32. **Jouaville LS, Ichas F, Holmuhamedov EL, Camacho P, Lechleiter JD** 1995 Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377:438-441
33. **Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J** 1994 Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74:595-636
34. **Bootman MD, Berridge MJ, Taylor CW** 1992 All-or-nothing Ca^{2+} mobilization from the intracellular stores of single histamine-stimulated HeLa cells. *J Physiol (Lond)* 450:163-178
35. **Missiaen L, De Smedt H, Parys JB, Sienaert I, Sipma H, Vanlingen S, Casteels R** 1997 Slow kinetics of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release: is the release "quantal" or "non-quantal" ? *Biochem J* 323:123-130
36. **Treve S, De Mattei M, Lanfredi M, Villa A, Green NM, MacLennan DH, Meldolesi J, Pozzan T** 1990 Calreticulin is a candidate for a calsequestrin-like function in Ca^{2+} -storage compartments (calciosomes) of liver and brain. *Biochem J* 271:473-480

37. **Liu N, Fine RE, Simons E, Johnson RJ** 1994 Decreasing calreticulin expression lowers the Ca^{2+} response to bradykinin and increases sensitivity to ionomycin in NG-108-15 cells. *J Biol Chem* 269:28635-28639
38. **Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J** 1997 BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca^{2+} . *J Biol Chem* 272:30873-30879
39. **Bastianutto C, Clementi E, Codazzi F, Podini P, De Giorgi F, Rizzuto R, Meldolesi J, Pozzan T** 1995 Overexpression of calreticulin increases the Ca^{2+} capacity of rapidly exchanging Ca^{2+} stores and reveals aspects of their luminal microenvironment and function. *J Cell Biol* 130:847-855
40. **Mery L, Mesaeli N, Michalak M, Opas M, Lew DP, Krause KH** 1996 Overexpression of calreticulin increases intracellular Ca^{2+} storage and decreases store-operated Ca^{2+} influx. *J Biol Chem* 271:9332-9339
41. **Sontheimer RD, Nguyen TQ, Cheng ST, Lieu TS, Capra JD** 1995 The unveiling of calreticulin. A clinically relevant tour of modern cell biology. *J Invest Med* 43:362-370
42. **Enyedi P, Szabadkai G, Krause KH, Lew DP, Spat A** 1993 Inositol 1,4,5-trisphosphate binding sites copurify with the putative Ca-storage protein calreticulin in rat liver. *Cell Calcium* 14:485-492
43. **Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF** 1979 Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 206:1188-1190

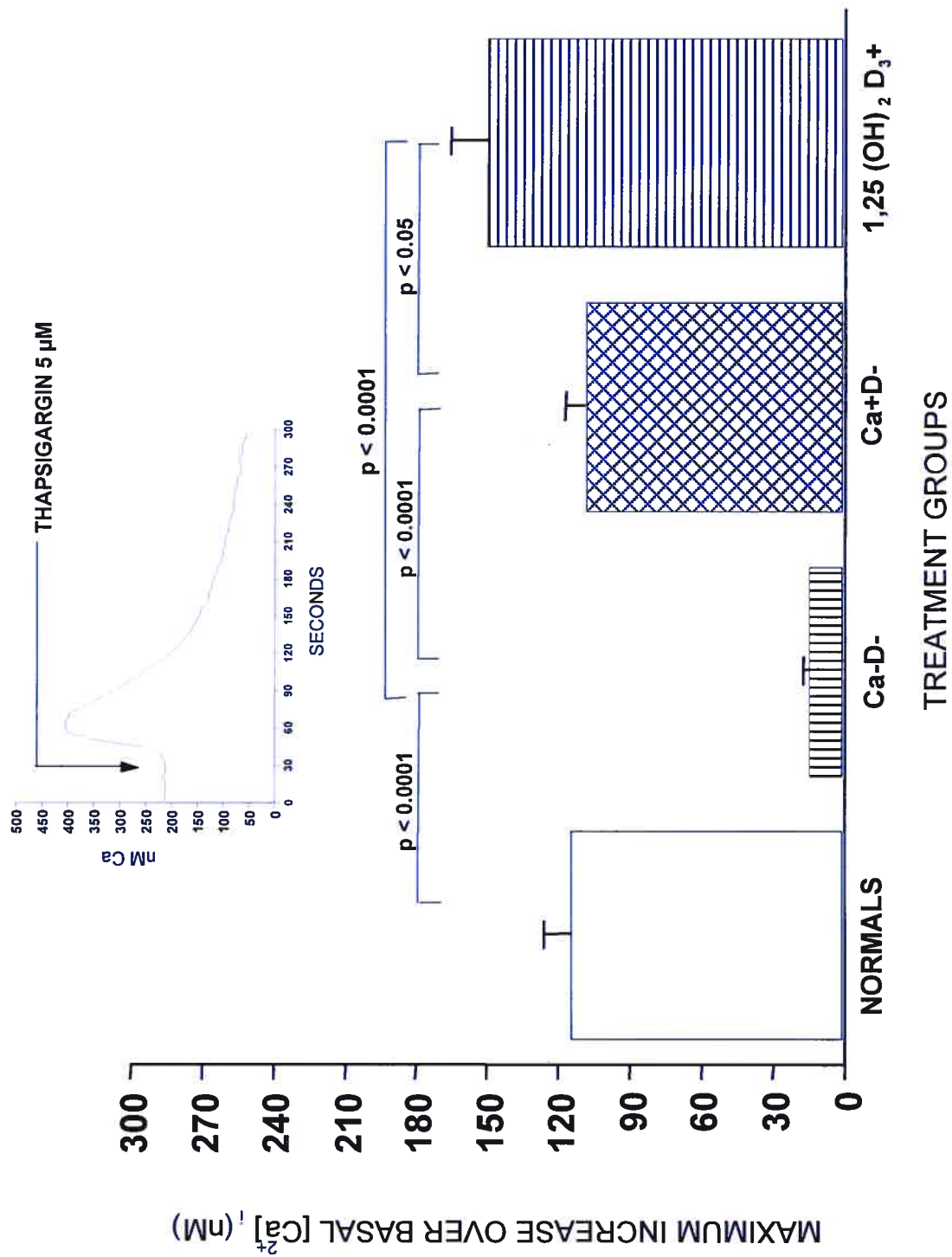
44. **Sandgren ME, Bronnegard M, DeLuca HF** 1991 Tissue distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the male rat. *Biochem Biophys Res Commun* 181:611-616
45. **Mirshahi A, Demers C, Néron S, Gascon-Barré M** 1999 In rat liver, the vitamin D receptor (VDR_n) and the 25(OH)D₃-1 α hydroxylase (CYP_{1 α}) are localized to the sinusoidal cell populations while hepatocytes are negative for both VDR_n and CYP_{1 α} . *J Bone Mineral Res* 14:S548
46. **Mailhot G, Petit JL, Demers C, Gascon-Barré M** 1999 Influence of the calcium and vitamin D status on Ca²⁺ signaling, the state of the IP₃-sensitive Ca²⁺ pools, and endoplasmic reticulum calcium binding proteins. *J Bone Mineral Res* 14:S219
47. **Gloth FM, Gundberg CM, Hollis BW, Haddad JG, Tobin JD** 1995 Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *J Am Med Ass* 274:1683-1686
48. **Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, Vamvakas EC, Dick IM, Prince RL, Finkelstein JS** 1998 Hypovitaminosis D in medical in patients. *N Engl J Med* 338:777-783
49. **Reid IR** 1996 Vitamin D and its metabolites in the management of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds) *Osteoporosis*. Academic Press, p 1169-1190
50. **Brazier M, Kamel S, Maamer M, Agbomson F, Elesper I, Garabedian M, Desmet G, Sebert JL** 1995 Markers of bone remodeling in the elderly subject: Effects of vitamin D insufficiency and its correction. *J Bone Mineral Res* 10:1753-1761
51. **Chapuy MC, Meunier PJ** 1997 Vitamin D insufficiency in adults and the elderly. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW (eds) *Vitamin D*. Academic Press, p 679-693

52. **Fardellone P, Sebert JL, Garabedian M, Bellony R, Maamer M, Agbomson F, Brasier M** 1995 Prevalance and biological consequences of vitamin D deficiency in elderly institutionalized subjects. *Rev Rhum Engl Ed* 62:576-581
53. **Levin ME, Boisseau VC, Avioli LV** 1976 Effects of diabetes mellitus on bone mass in juvenile and adult-onset diabetes. *N Engl J Med* 294:241-245
54. **Shore RM, Chesney RW, Mazess RB, Rose PG, Bargman GJ** 1981 Osteopenia in juvenile diabetes. *Calcif Tissue Int* 33(5):455-457



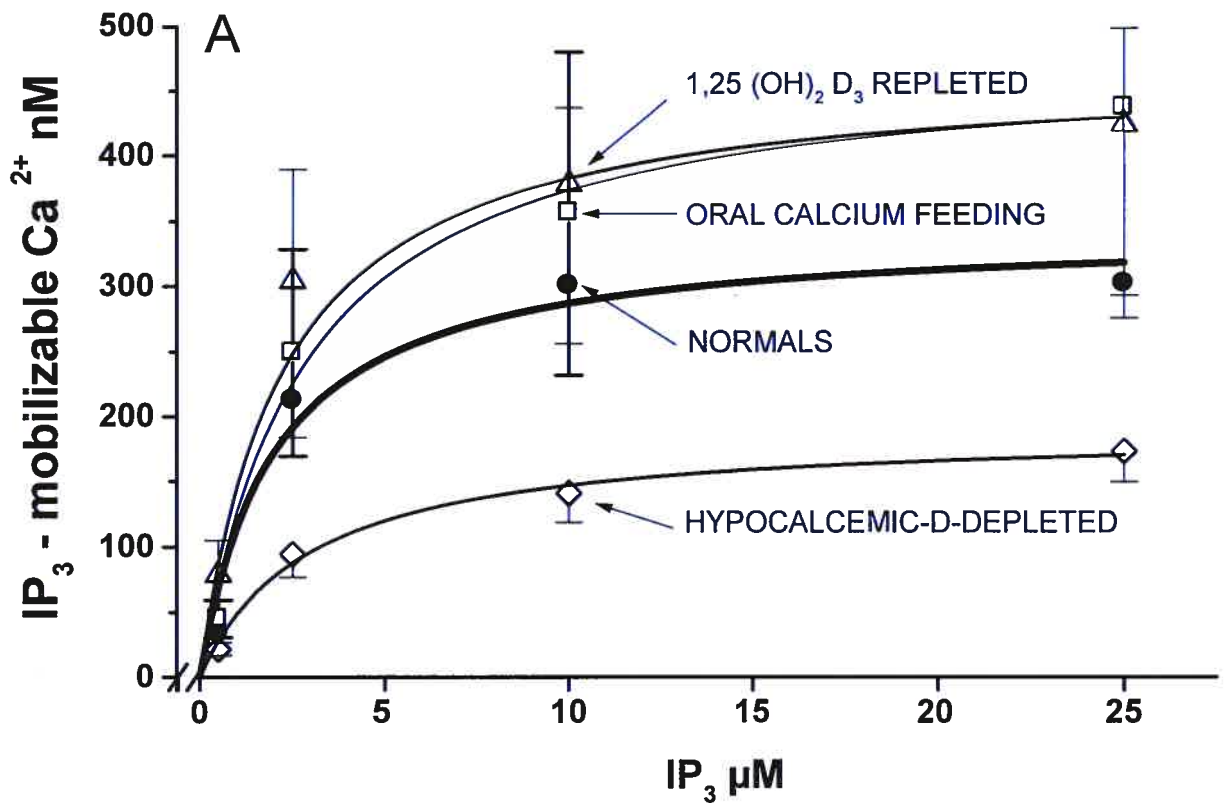
LEGEND TO FIGURE 1

Influence of the *in vivo* calcium status on basal resting $[Ca^{2+}]_c$ in rat hepatocytes. Hepatocytes were isolated from livers of N, Ca-, Ca+, or $1,25(OH)_2D_3+$ rats and kept in short-term primary culture containing $[Ca^{2+}]_e$ similar to that prevailing *in vivo*. Data show the distribution as cumulative percentage frequency of observed $[Ca^{2+}]_c$ in basal unstimulated conditions for all preparations studied. N: n = 944 cells obtained from 12 animals; Ca-: n = 817 cells obtained from 12 animals; Ca+: n = 867 cells obtained from 12 animals; $1,25(OH)_2D_3+$: n = 806 cells obtained from 11 animals. Significant differences between the four sigmoidal cumulative frequency curves was analysed using non linear regression modelling: between-group difference ($p < 0.0001$). The median (CF_{50}) was found to be 150.5, 115.5, 155 and 195 nM in N, Ca-, $1,25(OH)_2D_3+$ and Ca+ respectively (N vs Ca-, $p < 0.0001$; N vs $1,25(OH)_2D_3+$, N.S.; Ca+ vs Ca-, N or $1,25(OH)_2D_3+$, $p < 0.0001$). Statistically significant differences between group means were evaluated by ANOVA and individual contrast by the Tukey test. Mean resting $[Ca^{2+}]_c$ were found to be: 169.8 ± 3.2 , 152.1 ± 3.6 , 200.5 ± 4.4 and 221.4 ± 5.0 nM in N, Ca-, $1,25(OH)_2D_3+$ and Ca+ respectively, main effect, $p < 0.001$, and Ca- vs N, $1,25(OH)_2D_3+$ or Ca+: $p < 0.01$.

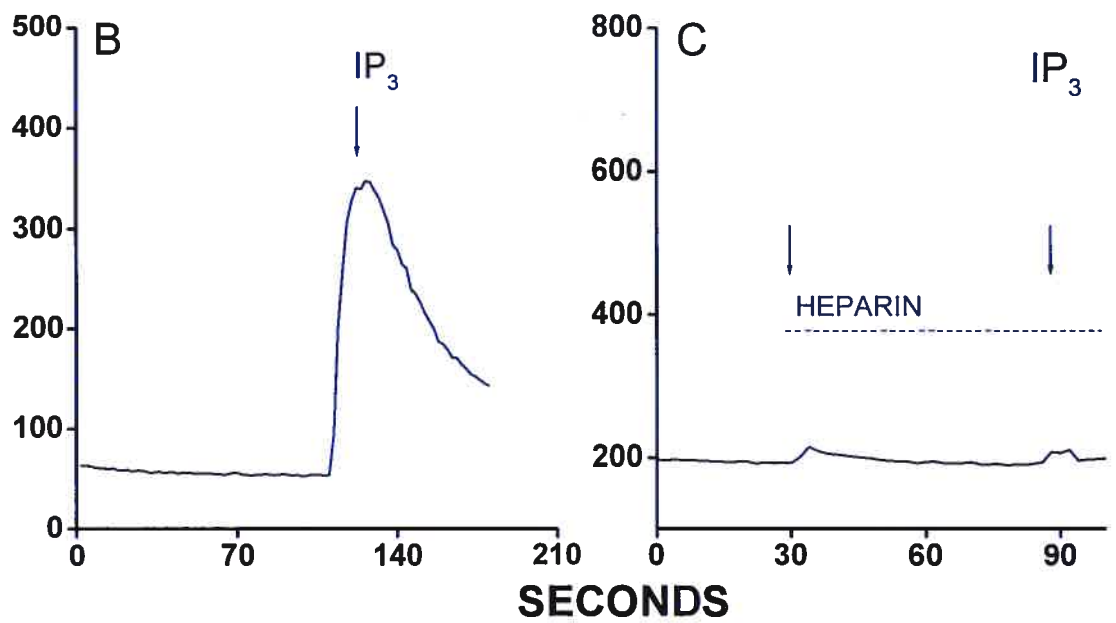


LEGEND TO FIGURE 2

Influence of the *in vivo* calcium status on the amplitude of the initial $[Ca^{2+}]_c$ during exposure to Tg in calcium-free buffer. Hepatocytes were isolated from rat livers of N (n = 250 cells obtained from 6 rats), Ca- (n = 242 cells obtained from 8 rats), Ca+ (n = 221 cells obtained from 10 rats), or $1,25(OH)_2D_3+$ (n = 229 cells obtained from 8 rats) and kept in short term primary culture containing $[Ca^{2+}]_c$ similar to that prevailing *in vivo* before Tg application. The increases in $[Ca^{2+}]_c$ were evaluated in single hepatocytes using the Ca^{2+} -sensitive Ca^{2+} probe Fura-2 AM. The insert represents a typical $[Ca^{2+}]_c$ response to Tg exposure in a single hepatocyte obtained from a normal rat hepatocyte. Significant differences between group means were analysed by ANOVA with individual between-group comparisons done by the Tukey test. Main effect: $p < 0.0001$, effect of group: $p < 0.0001$. Analysis of the number of cells exhibiting a detectable increase in $[Ca^{2+}]_c$ (see text) was done using the χ^2 .

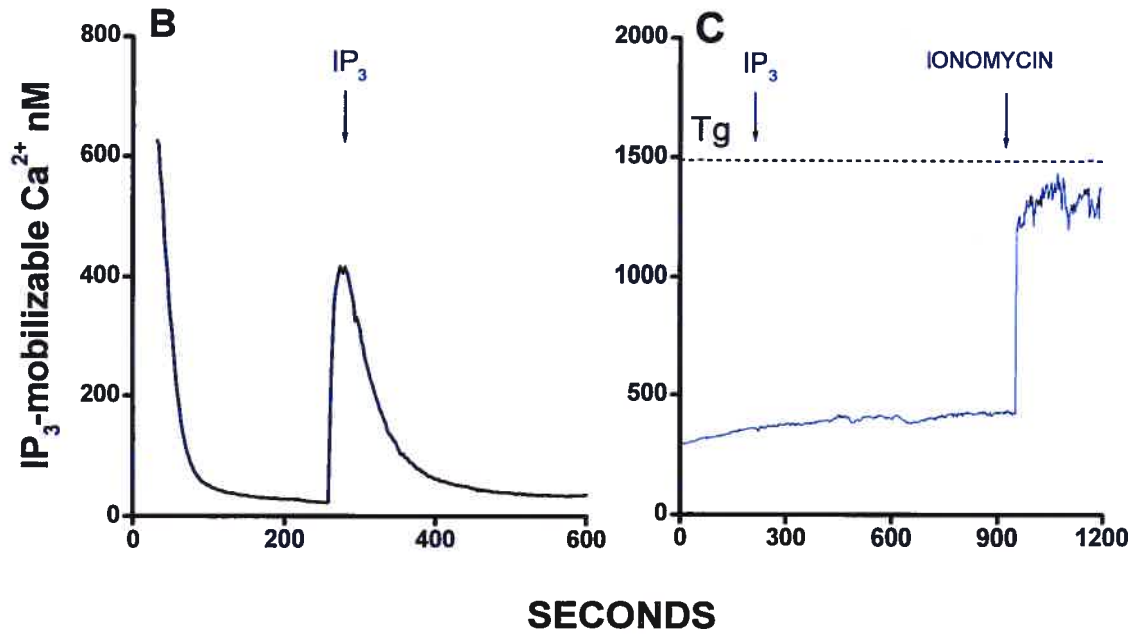
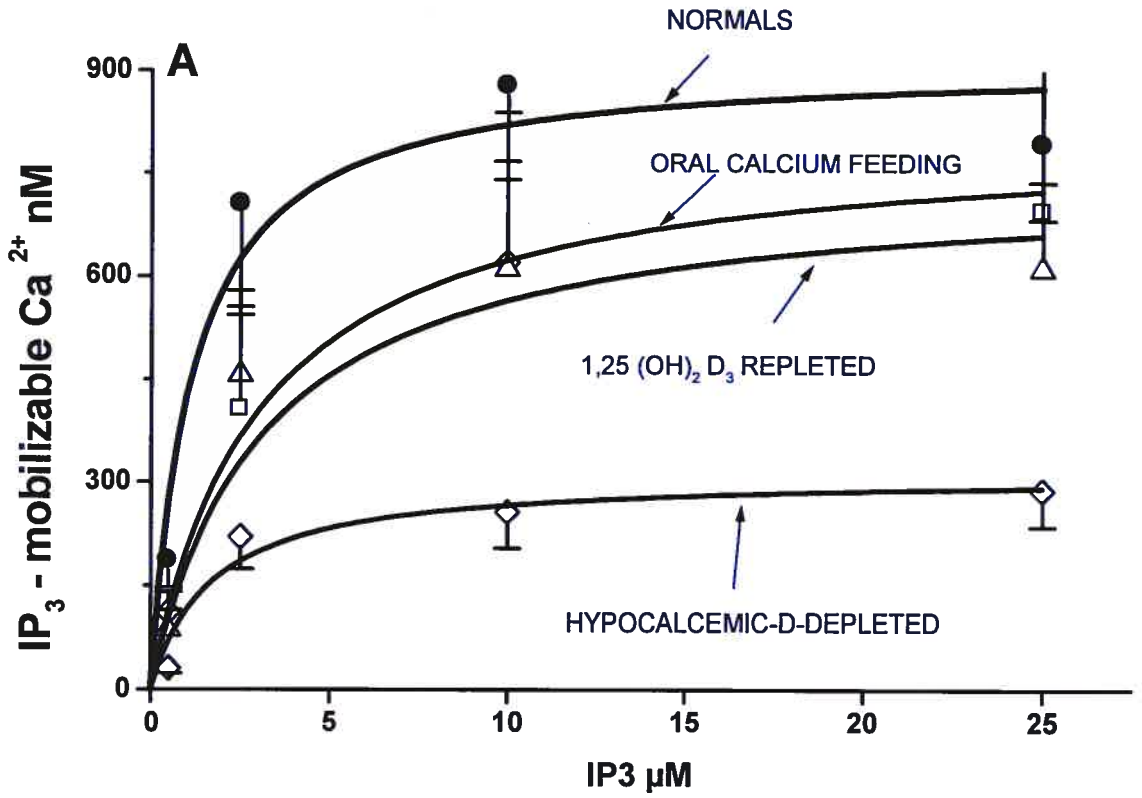


IP₃ - mobilizable Ca²⁺ nM



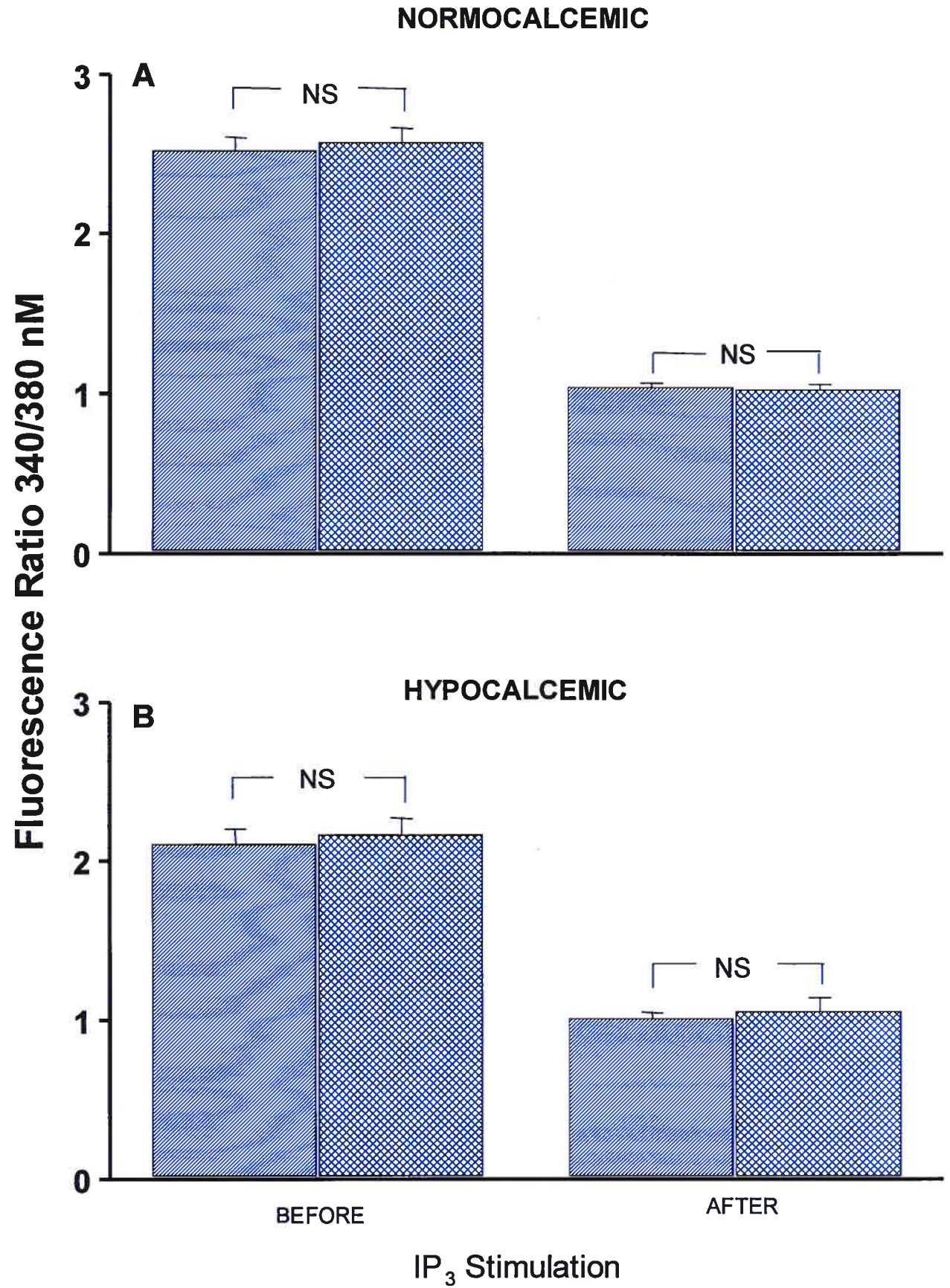
LEGEND TO FIGURE 3

Influence of the *in vivo* calcium status on the IP₃-induced Ca²⁺ mobilization in permeabilized hepatocytes. **A.** Data present a dose-response curve (1-25 μM) to IP₃ in hepatocytes (10⁷/mL) obtained from N, Ca-, Ca+ or 1,25(OH)₂D₃+ rats. The Ca²⁺-sensitive probe Fura-2 acid was used to evaluate the Ca²⁺ mobilized by exposure to increasing concentrations of IP₃. Significant differences between group means were analysed using non linear regression modelling: Ca- vs all other groups: p<0.0001; difference between normocalcemic groups, N.S. **B.** Representative trace illustrating the Ca²⁺ mobilized following application of 25μM IP₃ in permeabilized hepatocytes. **C.** Effect of heparin (50μg/ml) on the mobilization of Ca²⁺ following 25 μM IP₃ application.



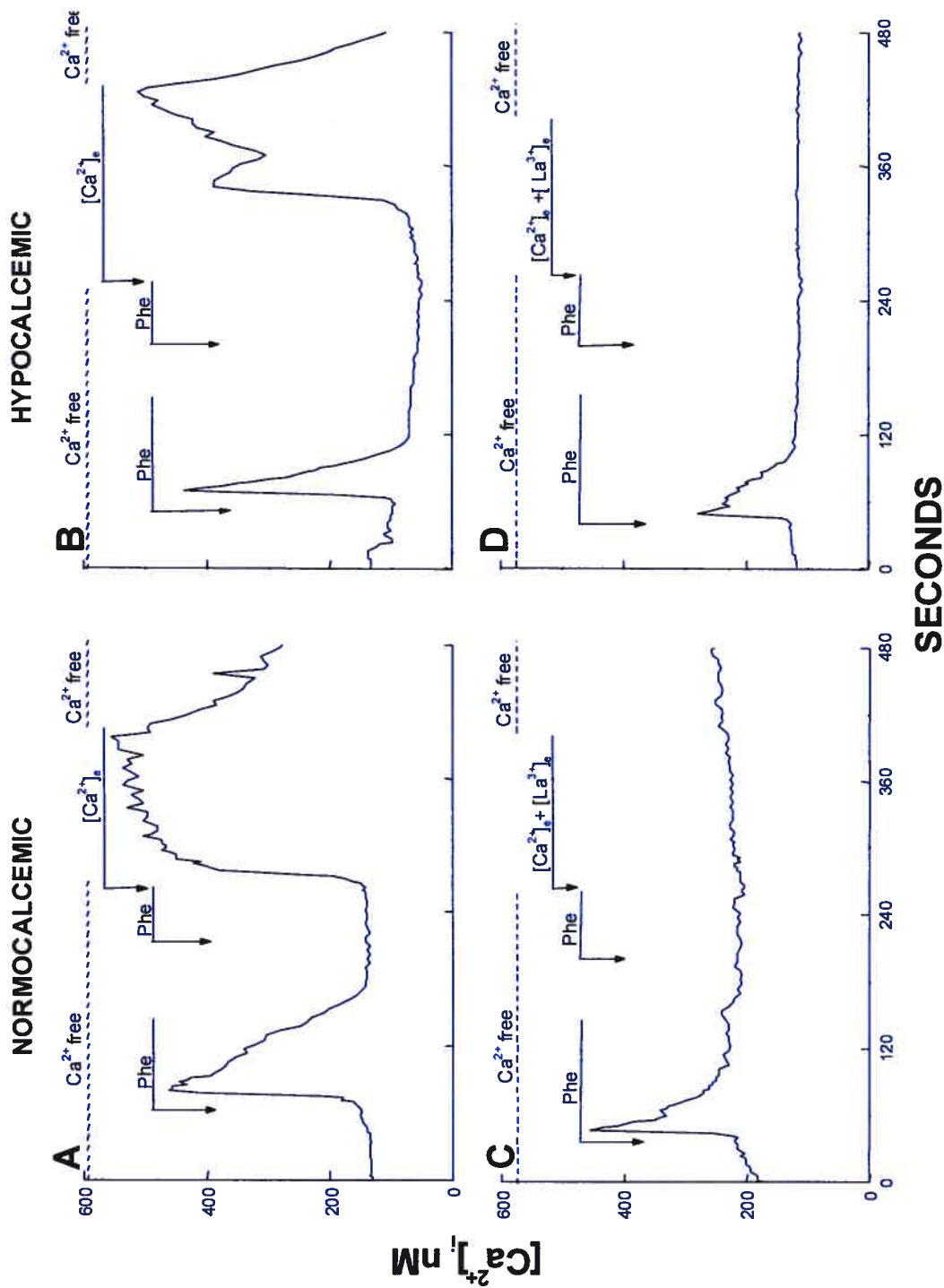
LEGEND TO FIGURE 4

Influence of the *in vivo* calcium status on the IP₃-induced Ca²⁺ mobilization in permeabilized hepatocytes following emptying/recharging of the IP₃-sensitive Ca²⁺ pools by two successive 5 μM Phe applications followed by exposition to 300 nM Ca²⁺. Data present a dose-response curve (1-25 μM) to IP₃ in hepatocytes (10⁷/mL) obtained from N, Ca-, Ca+ or 1,25(OH)₂D₃+ rats. The Ca²⁺-sensitive probe Fura-2 acid was used to evaluate the Ca²⁺ mobilized by exposure to increasing concentrations of IP₃. Significant differences between group means were analysed using non linear regression modelling: Ca- vs all other groups: p<0.0001; difference between normocalcemic groups, N.S. **B.** Representative trace illustrating the Ca²⁺ mobilized following application of 25μM IP₃ in permeabilized hepatocytes following emptying/replenishment of the IP₃-sensitive Ca²⁺ pools. **C.** Effect of Tg (10 μM) on the mobilization of Ca²⁺ following 25 μM IP₃ application. Note the absence of effect of Tg on Ca²⁺ mobilization induced by the calcium ionophore ionomycin.



LEGEND TO FIGURE 5

Evaluation of the Ca^{2+} content of the IP_3 -sensitive pools under *in vitro* incubation of 0.8 μM or 1.25 mM Ca^{2+} in hepatocytes obtained from the same rat liver. The mean signal ratios of the mag-fura-2 Ca^{2+} -sensitive probe was obtained before as well as after IP_3 application. **A.** Normocalcemics (n, hepatocytes obtained from three rats; before IP_3 application, n=119 hepatocytes; after IP_3 application, n=67 hepatocytes). **B.** Hypocalcemics, hepatocytes obtained from three rats (before IP_3 application, n=110 hepatocytes; after IP_3 application, n=52 hepatocytes). Statistically significant differences between group means were analyzed by Student's *t* test.

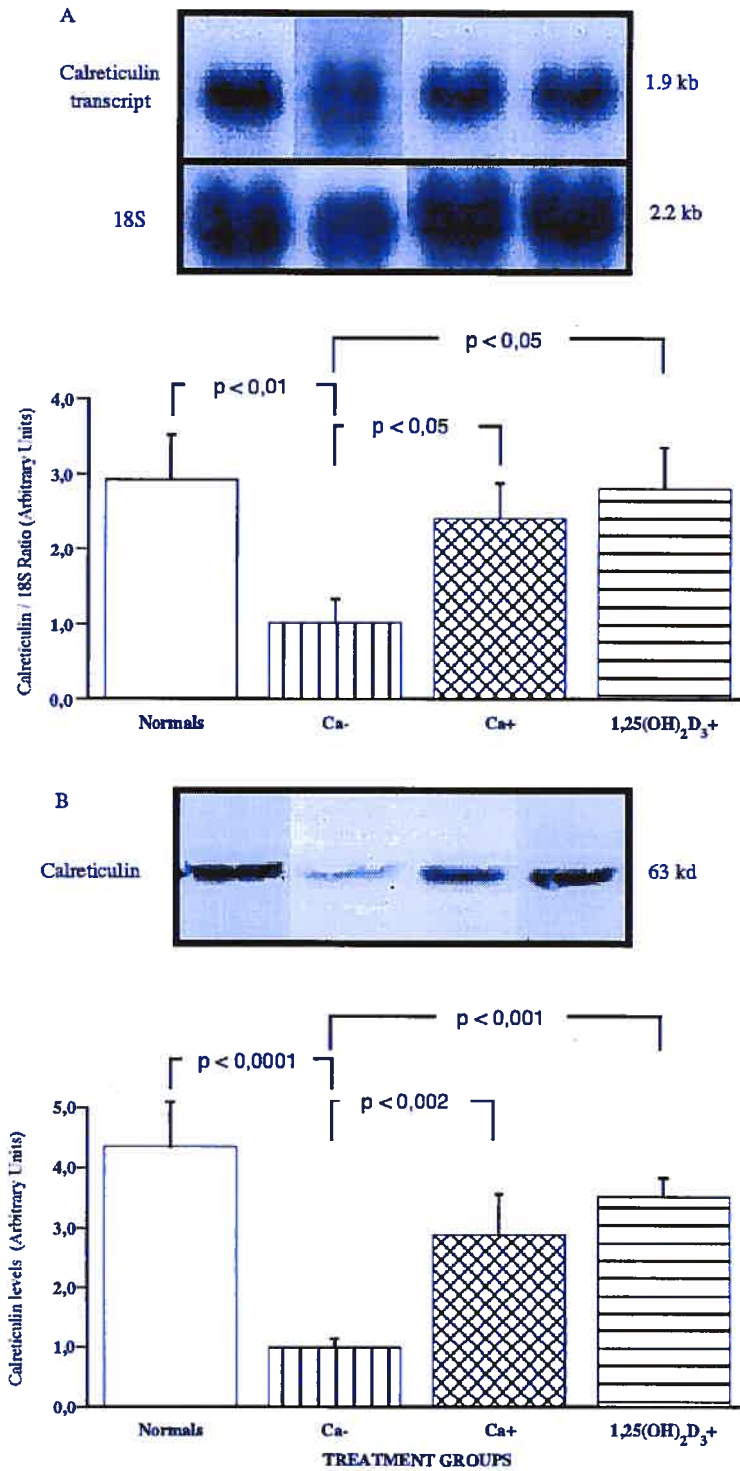


$[Ca^{2+}]_i$, nM

SECONDS

LEGEND TO FIGURE 6

Influence of the *in vivo* calcium status on store-operated/capacitative Ca^{2+} entry in hepatocytes obtained from N or $\text{Ca}^{\bar{}}$ rats. In both groups, hepatocytes were kept in short term culture containing $[\text{Ca}^{2+}]_e$ similar to that prevailing *in vivo* before the Ca^{2+} entry studies. Hepatocytes were stimulated with two successive dose of 5 μM Phe to empty the IP_3 -sensitive Ca^{2+} stores and then were exposed to $[\text{Ca}^{2+}]_e$. The store operated/capacitative Ca^{2+} entry was monitored by evaluating the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_e$ during exposure to $[\text{Ca}^{2+}]_e$ using the fura-2/AM calcium-sensitive probe in single hepatocytes (A and B). In hepatocytes obtained from both groups, Ca^{2+} entry during exposure to $[\text{Ca}^{2+}]_e$ after emptying of the IP_3 -sensitive Ca^{2+} pools by 5 μM Phe could be blocked by exposure to 2.0 mM La^{3+} (C and D).



LEGEND TO FIGURE 7

Influence of the *in vivo* calcium status on the steady state expression of the calreticulin gene transcript (**A**) and the immunoreactive protein level (**B**) in rat liver. **A**. Fifteen micrograms of total liver RNA were submitted to Northern analysis as indicated in the text. To normalize for unequal loading of RNA to the gel, the filter was stripped and rehybridized to the ribosomal 18S [α - 32 P]cDNA probe. Representative Northern blot analysis from a single animal from each group is shown. The numbers of rats used were: N, n=10; Ca⁻, n=6; Ca⁺, n=5; and 1,25(OH)₂D₃⁺, n=6. **B**. Twenty micrograms of protein were submitted to Western analysis as described in the text. A representative Western blot from a single animal from each group is shown (N, n=6; Ca⁻, n=5; Ca⁺, n=7; and 1,25(OH)₂D₃⁺, n=6). All significant differences between group means in A and B were analyzed by ANOVA, with individual contrasts evaluated by the Fisher test.

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

I- Influence de l'hypocalcémie chronique sur la cinétique de réplétion et redéplétion calcique de l'hépatocyte

1. Cinétique de réplétion calcique

a) Hypothèse spécifique

Les études entreprises reposent sur l'hypothèse selon laquelle la normalisation de l'homéostasie du calcium cellulaire ($[Ca^{2+}]_c$, mobilisation des réserves cellulaires IP_3 -dépendantes, $[Ca^{2+}]_{RE}$ et expression du gène et de la protéine de la calréticuline) par une réplétion en calcium alimentaire suivra la cinétique du statut calcique extracellulaire mais cette dernière présentera un déplacement vers la droite comparativement à celle du calcium extracellulaire.

b) But

Vérifier, chez des animaux carencés en D, si la normalisation du calcium extracellulaire par le calcium alimentaire seul entraîne une normalisation du calcium cellulaire parallèle à celle de la calcémie.

c) Prémisses

1) Suivant l'observation chez des hépatocytes de rat en culture primaire et d'hépatocytes perméabilisés en suspension isolés d'un animal D-Ca- que la carence calcique abaisse la $[Ca^{2+}]_c$ de base, la mobilisation des réserves IP_3 -dépendantes et les niveaux d'expression du gène et de protéine de la calréticuline (216).

2) Considérant le fait que l'influence de la carence calcique sur l'homéostasie du calcium intracellulaire sur les paramètres énumérés ci-hauts est complètement réversible par une

supplémentation de calcium et/ou de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ d'une durée de 14 et sept jours respectivement (216).

d) Matériel et Méthodes

Le protocole expérimental est le même que celui décrit dans l'article 1. Toutefois, les animaux ont été sacrifiés après 2,3,5,7 et 14 jours de réplétion en calcium alimentaire. Les techniques de mesure du calcium intracellulaire par spectrofluorométrie utilisant la sonde FURA-2 AM et les techniques de biologie moléculaire sont les mêmes que celles décrites à l'article 1.

Une série d'expériences a également été réalisée sur des animaux D-Ca- de deuxième génération. Ces animaux sont obtenus de femelles D-Ca- âgées de 10 semaines accouplées avec des mâles N.

La mesure de la concentration sérique de calcium ionisé a été effectuée tel que décrit dans l'article 1. Les concentrations sanguines de phosphore ont été déterminées par technique standard de laboratoire. Les concentrations sériques de PTH ont été mesurées à l'aide d'une trousse commerciale (Alpco Diagnostics, Windham, NH, E.U.) reconnaissant spécifiquement l'hormone de rat. Les mesures de $25(\text{OH})\text{D}_3$ et de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ont été faites à l'aide de trousse commerciales (Immunodiagnostic Systems Ltd, Bolton, Angleterre).

e) Résultats

i) Paramètres sériques

Le tableau II compare les paramètres sériques du métabolisme phosphocalcique d'animaux N et D-Ca- de première et deuxième génération. Ainsi, à l'instar des animaux D-Ca- de première génération, les animaux de seconde génération présentent une hypocalcémie et des concentrations sanguines indétectables de 25(OH)D₃. Toutefois, leur phosphatémie est significativement abaissée comparativement à celle des animaux N et D-Ca- de première génération. Finalement, les animaux D-Ca- de deuxième génération présentent une hyperparathyroïdie secondaire plus sévère et une concentration sanguine de 1,25(OH)₂D₃ plus faible que les rats D-Ca- de première génération.

Tableau II. Paramètres sériques indicatifs du métabolisme phosphocalcique chez des animaux normocalcémiques et hypocalcémiques de première et deuxième génération

PARAMÈTRES SÉRIQUES	GROUPEs		
	N	D-Ca-1 ^{ère} génération	D-Ca 2 ^{ème} génération
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.29±0.01 [#]	0.78±0.02	0.76±0.01
25(OH)D (nmol/L)	117±11	Non-détectable	Non-détectable
1,25(OH) ₂ D ₃ (pmol/L)	144±9 [#]	60±7	33±2
PTH (pmol/L)	20±1 [#]	192±10	282±33
Phosphore (mmol/L)	2.82±0.05 [#]	3.57±0.11 [#]	2.35±0.25 [#]

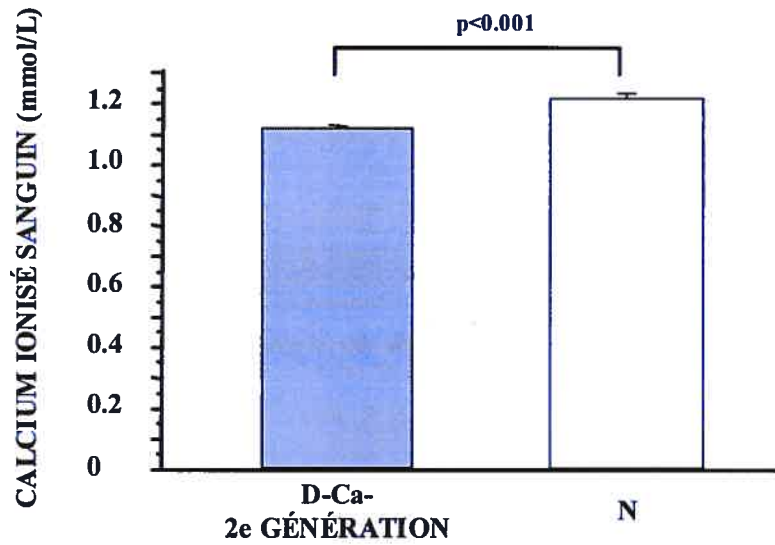
LÉGENDE DU TABLEAU II

Comparaison des différents paramètres sériques du métabolisme phosphocalcique d'animaux N, D-Ca- de première génération et D-Ca- de deuxième génération. Les données représentent les concentrations sériques moyennes obtenues de : 9-19 animaux N âgés de 6 à 9 semaines, 5-20 animaux D-Ca- de première génération âgés de 7 à 9 semaines et 4-15 animaux D-Ca- de deuxième génération âgés de 6 à 8 semaines. Pour le dosage de 25(OH)D sérique, le seuil de détection de la trousse commerciale est < 3 nmol/L. Les différences entre les moyennes des groupes ont été déterminées par analyse de variance unidimensionnelle, différence globale significative, $p < 0.001$ pour tous les paramètres. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Tukey, $\#p < 0.05$ vs les deux autres groupes.

ii) Évolution de la calcémie

Tel qu'illustré à la figure 2.1A, la calcémie des fœtus après 20 jours de gestation est significativement abaissée lorsque les animaux proviennent d'une femelle hypocalcémique chronique et carencée en D comparativement à celle de fœtus issus d'une femelle gestante normocalcémique. La concentration sérique de calcium ionisé du premier groupe est de 1.13 ± 0.01 mM alors qu'elle est de 1.22 ± 0.02 mM chez les animaux N. La figure 2.1B compare, sur une période de trois à quatre semaines, l'évolution des calcémies des animaux N et D-Ca- de première et deuxième génération. Contrairement aux animaux N qui maintiennent une concentration normale de Ca^{2+} , les animaux D-Ca- de première génération subissent, dès le sevrage, une diminution progressive et significative ($p < 0.001$) de leur calcémie pour atteindre une concentration hypocalcémique à sept semaines de vie. Les animaux D-Ca- de deuxième génération, quant à eux, sont déjà hypocalcémiques au moment du sevrage. Leur calcémie demeure stable pendant quatre semaines mais devient significativement différente des animaux D-Ca- de première génération après huit semaines de vie.

A- CALCÉMIES DE FOETUS DE 20 JOURS



B- ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION SANGUINE DE CALCIUM IONISÉ AU MOMENT DU SEVRAGE

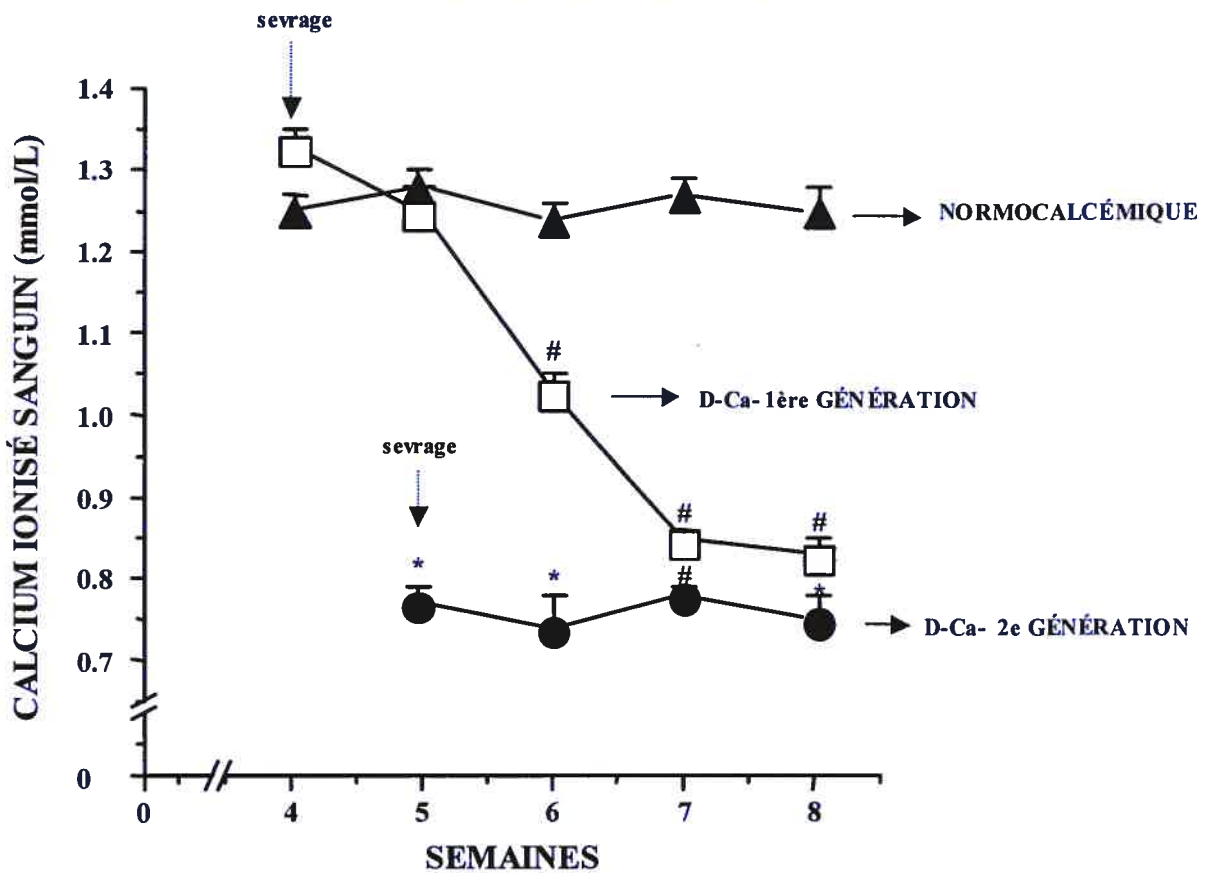


FIGURE 2.1 CALCÉMIES D'ANIMAUX NORMOCALCÉMIQUES ET D-Ca- DE PREMIÈRE ET DEUXIÈME GÉNÉRATION

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.1

A- Concentrations sanguines moyennes de fœtus N et D-Ca- de deuxième génération mesurées à 20 jours de gestation suite à l'accouchement par césarienne des femelles gestantes. Le sang a été prélevé par exsanguination des fœtus quelques minutes suivant leur naissance. D-Ca- 2^e génération (■), n=54 et N (□), n=12 fœtus. Les différences entre les moyennes des groupes ont été déterminées par le test "t" de Student tel qu'indiqué sur le graphique.

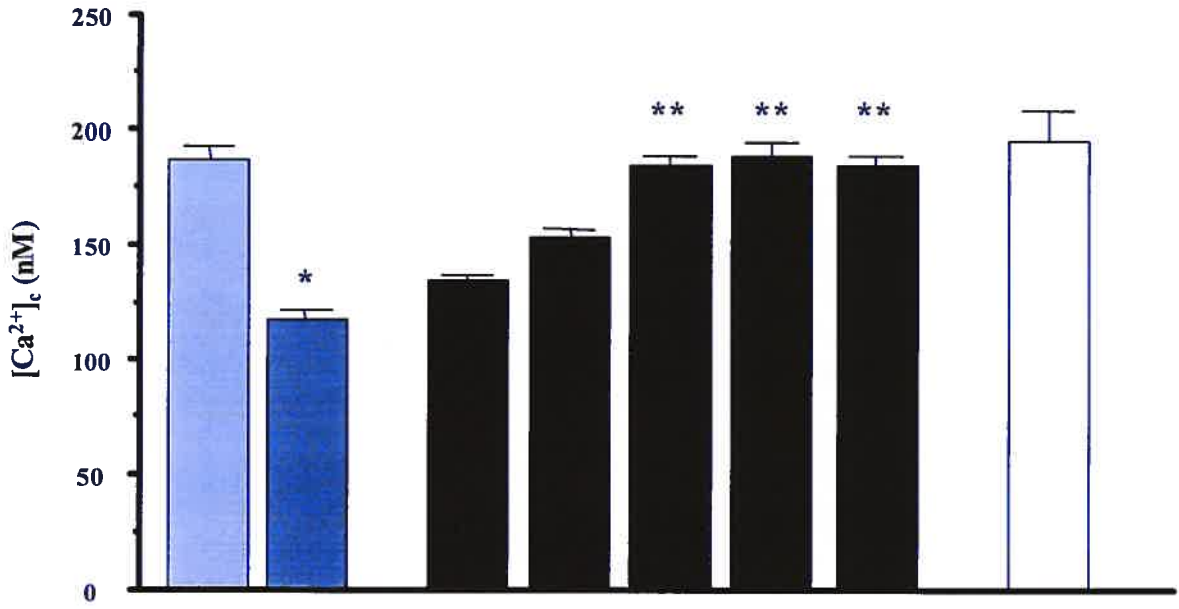
B- Évolution des calcémies des rats N et D-Ca- de première et deuxième génération sur une période de 3 à 4 semaines débutant au sevrage. Le sevrage des animaux N et D-Ca- de première génération survient à l'âge de 4 semaines alors que les rats D-Ca- de deuxième génération sont sevrés à 5 semaines de vie. D-Ca- de première génération □-□ n=10-27 rats; N ▲-▲ n=9-13 rats ; D-Ca de deuxième génération, ●-● n=5-9 rats. Les différences entre les moyennes de groupes ont été déterminées par analyse de variance bidimensionnelle ; effet de groupe : $p < 0.001$, effet du temps : $p < 0.001$ et interaction significative : $p < 0.001$. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Tukey, * $p < 0.001$ vs les deux autres groupes ; # $p < 0.001$ vs N.

iii) Concentration cytoplasmique basale de calcium

La figure 2.2A compare les $[Ca^{2+}]_c$ basales d'hépatocytes isolés d'animaux N, D-Ca- de première et deuxième génération et réplétés en calcium alimentaire. Les hépatocytes d'animaux D-Ca- de première génération présentent une $[Ca^{2+}]_c$ basale qui est plus faible que celle mesurée chez les animaux N. Toutefois, les animaux D-Ca- de deuxième génération ont une $[Ca^{2+}]_c$ basale (188 ± 4 nM) qui se compare à celle des cellules provenant d'animaux réplétés depuis au moins cinq jours en calcium (185 ± 4 nM) et d'animaux N (191 ± 6 nM). La réplétion en calcium induit une hausse progressive du contenu cytoplasmique de calcium qui atteint un plateau au jour 5. A noter qu'après trois jours de réplétion calcique, le statut calcique extracellulaire est tout à fait normalisé (1.35 ± 0.04 mM).

iv) Mobilisation des réserves calciques IP_3 -dépendantes par la phényléphrine

Les animaux N démontrent de loin une mobilisation des réserves IP_3 -dépendantes supérieure à tous les autres groupes incluant les cellules issues d'animaux qui ont un statut calcique extracellulaire en apparence tout à fait normalisé. La Phe mobilise significativement moins de calcium chez les cellules isolées d'animaux D-Ca- de deuxième génération comparativement aux cellules d'animaux D-Ca- de première génération. La réplétion en calcium alimentaire induit une hausse progressive de la mobilisation des réserves IP_3 -dépendantes qui, à l'instar du $[Ca^{2+}]_c$ basale, atteint un sommet après cinq jours de réplétion.



B- MOBILISATION DES RÉSERVES CELLULAIRES
PAR LA PHÉNYLÉPHRINE

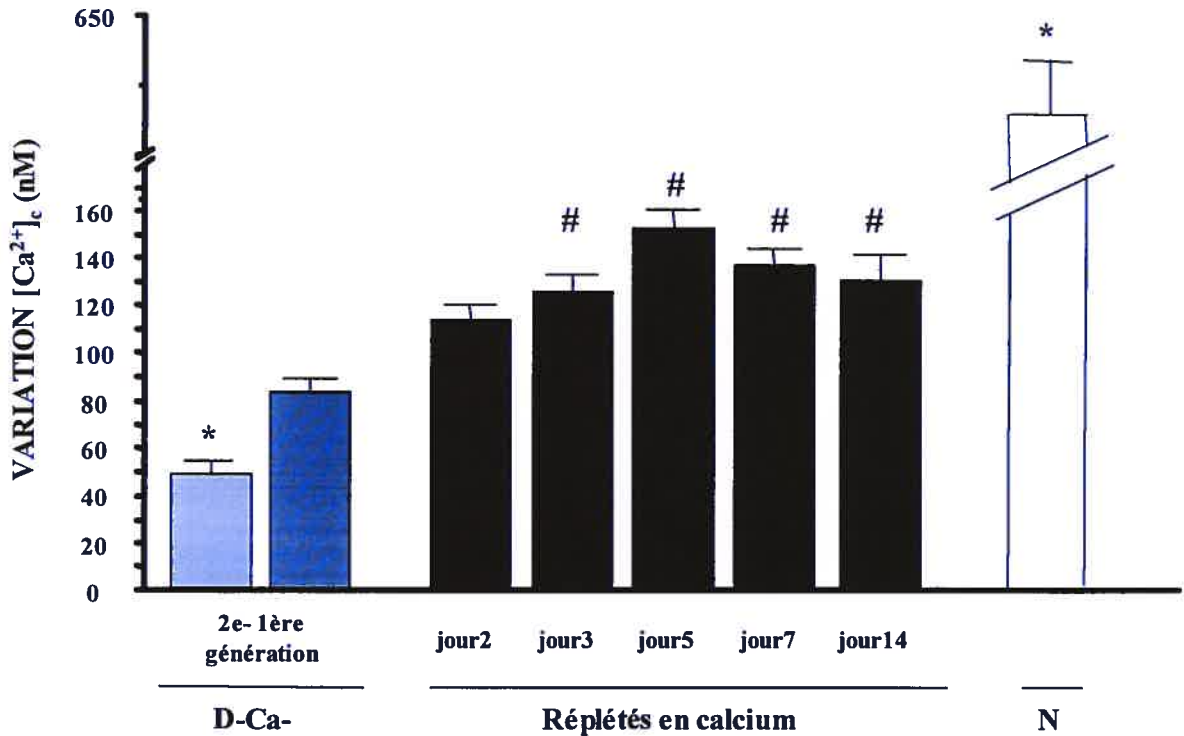


FIGURE 2.2 INFLUENCE DU STATUT CALCIQUE ET DE LA RÉPLÉTION CALCIQUE SUR LA CONCENTRATION CYTOPLASMIQUE BASALE DE CALCIUM ET SUR LA MOBILISATION DES RÉSERVES CALCIQUES IP₃-DÉPENDANTES D'HÉPATOCTES DE RAT

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.2

A- $[Ca^{2+}]_c$ basale d'hépatocytes isolés d'animaux N (□), D-Ca- de première (■) et deuxième génération (▣) et D-Ca- de première génération réplétés en calcium (■) pendant 2,3,5,7, et 14 jours. Les animaux sont tous âgés entre 6 et 9 semaines. La technique de préparation de cellules est celle présentée à l'article 1. n= D-Ca- deuxième génération : 408 cellules issues de 46 expériences; D-Ca- première génération : 295 cellules issues de 25 expériences; Ca₊₃ jour2, 675 cellules issues de 68 expériences; Ca₊₃ jour3 : 404 cellules issues de 30 expériences; Ca₊₃ jour5 : 365 cellules issues de 28 expériences; Ca₊₃ jour7 : 365 cellules issues de 27 expériences; Ca₊₃ jour14 : 659 cellules issues de 58 expériences et N : 221 cellules issues de 29 expériences. Les différences entre les moyennes des groupes ont été déterminées par analyse non-paramétrique (Kruskal-Wallis), effet global, p<0.001. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Dunn * p<0.05 vs tous les autres groupes; ** p<0.05 vs Ca₊₃ jour 2 et jour3.

B- Mobilisation de la $[Ca^{2+}]_c$ en réponse à l'agent α_1 -adrénergique, Phe, d'hépatocytes isolés d'animaux N (□), D-Ca- de première (■) et deuxième génération (▣) et D-Ca- de première génération réplétés en calcium (■) pendant 2,3,5,7, et 14 jours. La technique de préparation de cellules est celle présentée à l'article 1. n= D-Ca- deuxième génération : 101 cellules issues de 10 expériences menées sur 5 rats; D-Ca- première génération : 88 cellules issues de 7 expériences menées sur 4 rats; Ca₊₃ jour2, 193 cellules issues de 15 expériences menées sur 7 rats; Ca₊₃ jour3 : 117 cellules issues de 9 expériences menées sur 4 rats; Ca₊₃ jour5 : 137 cellules issues de 8 expériences menées sur 4 rats; Ca₊₃ jour7 : 132 cellules issues de 7 expériences menées sur 4 rats ; Ca₊₃ jour14 : 240 cellules issues de 19 expériences menées sur 9 rats et N : 263 cellules issues de 20 expériences menées sur 10 rats. Les différences entre les moyennes des groupes ont été déterminées par une analyse

non-paramétrique (Kruskal-Wallis), effet global, $p < 0.001$. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Dunn, * $p < 0.05$ vs tous les autres groupes; # $p < 0.05$ vs D-Ca-1^{ère} génération.

v) *Expression génique de la calréticuline dans le foie entier*

La figure 2.3 représente l'expression du gène de la calréticuline déterminée à partir du foie entier d'animaux D-Ca de première et deuxième génération et réplétés en calcium alimentaire. Globalement, l'expression du gène de la calréticuline est significativement augmentée par la supplémentation de calcium alimentaire selon une cinétique graduelle ($p < 0.01$). L'expression du gène dans le foie d'animaux D-Ca- de deuxième génération diffère, quant à elle, significativement de celle du foie de rats réplétés en calcium pendant 14 jours.

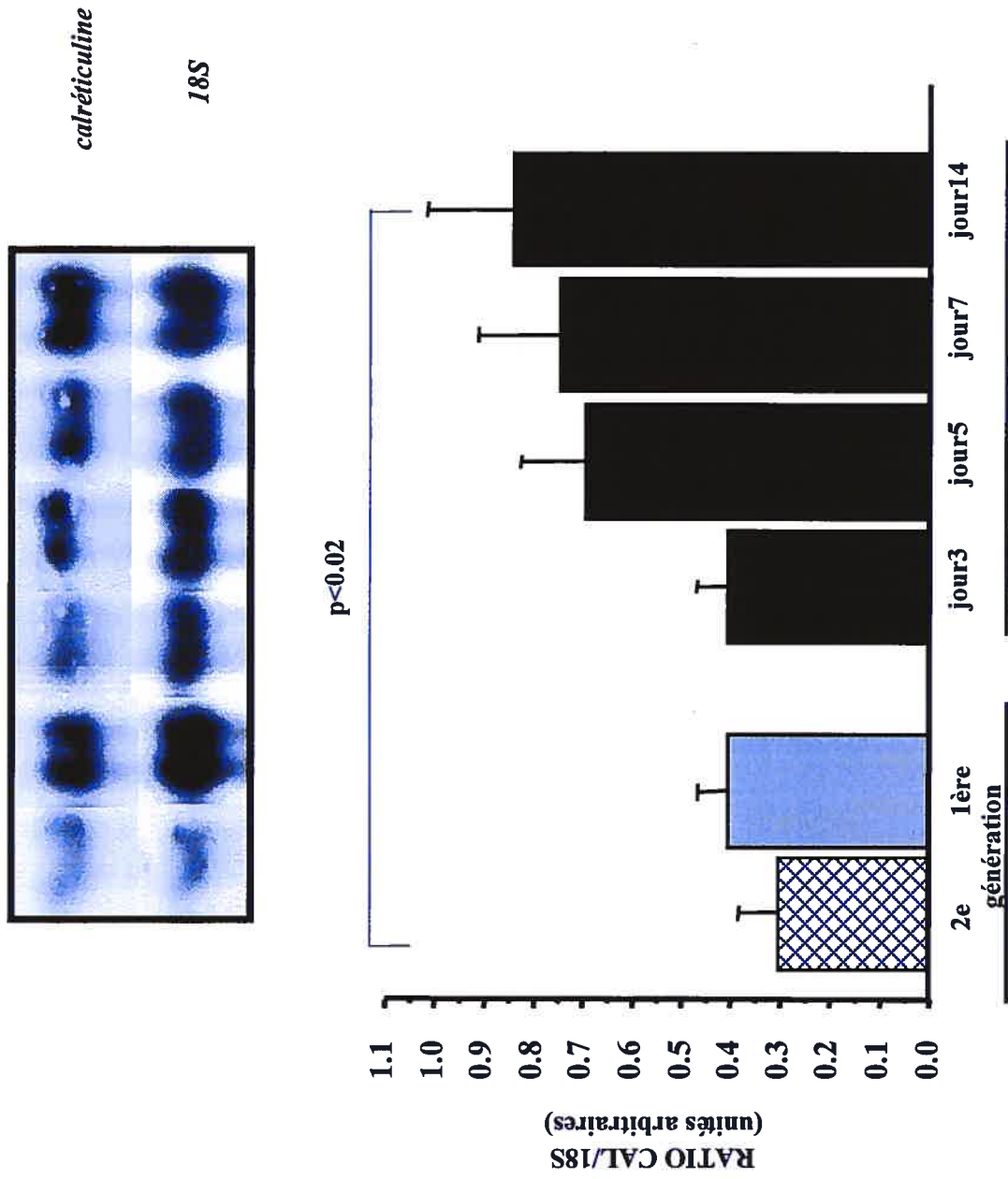


FIGURE 2.3 INFLUENCE DU STATUT HYPOCALCÉMIQUE ET DE LA RÉPLÉTION EN CALCIUM ALIMENTAIRE SUR L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE DE LA CALRÉTICULINE DU FOIE ENTIER

D-Ca- Réplétés en calcium

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.3

Expression génique de la calréticuline du foie d'animaux D-Ca- de deuxième (☒) et première génération (■) et D-Ca- de première génération réplétés en calcium (■) pendant 3,5,7, et 14 jours. Les concentrations d'ARN_m à l'équilibre ont été déterminées par analyse de Northern et exprimées sous forme de ratio en fonction d'un gène contrôle. n= D-Ca- deuxième génération : 5 rats, D-Ca- première génération : 9 rats; Ca₃+ 3 jours : 3 rats; Ca₃+ 5 jours : 4 rats; Ca₃+ 7 jours : 4 rats; Ca₃+ 14 jours : 4 rats et N : 5 rats. Les différences entre les moyennes de groupes ont été déterminées par ANOVA unidimensionnelle; effet global, p<0.01. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Tukey tel qu'indiqué sur le graphique.

f) Discussion

Ces expériences avaient pour but de vérifier si la supplémentation en calcium alimentaire d'animaux carencés en D de première génération normalisait l'homéostasie du calcium intracellulaire selon une cinétique progressive comparable à celle de la calcémie. En mode de réplétion calcique, l'influence du statut calcique extracellulaire sur les compartiments intracellulaires suit assurément un enchaînement bien précis. En effet, la normalisation de la calcémie après trois jours de réplétion précède l'accroissement de la $[Ca^{2+}]_c$ basale et la réplétion des réserves cellulaires qui surviennent après cinq jours de supplémentation. Contrairement aux paramètres précédents, l'expression génique de la calréticuline du foie entier augmente graduellement et de façon constante sans toutefois atteindre de plateau après 14 jours de réplétion. Cette observation est intéressante dans la mesure où elle indique qu'à l'état cellulaire, la supplémentation de calcium alimentaire de 14 jours ne parvient pas à normaliser complètement la taille fonctionnelle des réserves calciques et ce, malgré la normalisation de la $[Ca^{2+}]_c$ basale. Ce résultat rejoint ceux de travaux précédents qui montrent que l'hyperparathyroïdie secondaire n'est que partiellement corrigée par une supplémentation de calcium alimentaire de 14 jours (217). L'entrée massive de calcium dans l'organisme causée par la supplémentation de calcium induit un flot continu de calcium dans le milieu extracellulaire dont celui baignant les cellules du foie. Les cellules, alors habituées à un mode de fonctionnement sous-optimal induit par le statut hypocalcémique, deviennent avides de calcium et se réplètent progressivement au gré de cette quantité de calcium qui afflue. L'identification récente d'un CaSR sur l'hépatocyte, dont la fonction n'a toutefois pas été bien définie dans ce type de cellule, pourrait contribuer à contrôler l'entrée de calcium dans la cellule (25). La hausse du calcium cytoplasmique réplète à son tour les autres réserves calciques, dont le noyau, site de régulation de l'expression génique de la calréticuline. Certains auteurs ont démontré

antérieurement la présence d'un élément de réponse au calcium sur le site promoteur du gène de la calréticuline(61). Cette observation vient appuyer nos résultats qui montrent un accroissement graduel et constant des niveaux d'ARN_m de la calréticuline du foie entier suite à une réplétion calcique.

Parallèlement à ces deux modes de réplétion, nous avons investigué l'influence d'une carence précoce en calcium et en D sur les différents paramètres de l'homéostasie calcique cellulaire. Pour ce faire, nous avons étudié des animaux D-Ca- de deuxième génération. Ces animaux présentent après 20 jours de vie intra-utérine une calcémie diminuée comparativement à celle d'animaux N du même âge. De plus, ils se distinguent des animaux D-Ca- de première génération par le fait qu'ils sont déjà hypocalcémiques au moment du sevrage et présentent une phosphatémie significativement diminuée comparativement aux animaux N . Ainsi, ces animaux sont exposés dès la vie intra-utérine à un environnement sévèrement déficient en calcium et en D. L'homéostasie calcique cellulaire de ces animaux se caractérise par une perturbation encore plus marquée que celle observée chez les animaux D-Ca- de première génération. Ainsi, à l'exception de la $[Ca^{2+}]_c$ basale qui est significativement plus élevée, la mobilisation des réserves IP₃-dépendantes ainsi que l'expression génique de la calréticuline est abaissée comparativement à ce qui est observé chez les rats D-Ca- de première génération. La hausse de la $[Ca^{2+}]_c$ basale peut provenir d'une fuite de calcium du RE vers le cytoplasme qui est causée par la réduction de la capacité de liaison du calcium dans cet organelle tel que démontré par la réduction de l'expression génique de la calréticuline Le calcium ne pouvant être emmagasiné dans le RE est alors redirigé vers le compartiment cytoplasmique. De plus, les animaux D-Ca- de deuxième génération survivent rarement au-delà de huit semaines de vie. Ils présentent une tétanie hypocalcémique conduisant rapidement à la mort des animaux. Ainsi, l'élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ basale des hépatocytes peut aussi être un signe avant-coureur de perturbations

sévères de l'homéostasie cellulaire calcique précédant l'apparition des symptômes de tétanie.

2. Cinétique de redéplétion calcique

a) Hypothèse spécifique

Les études entreprises reposent sur l'hypothèse selon laquelle la redéplétion calcique succédant à une réplétion en calcium d'une durée de 14 jours d'animaux D-Ca- de première génération entraînera une déplétion équivalente des concentrations cellulaires de calcium selon une cinétique graduelle mais décroissante.

b) But

Vérifier l'influence du statut calcique extracellulaire sur l'homéostasie calcique intracellulaire lors de la redéplétion calcique chez des animaux carencés en D.

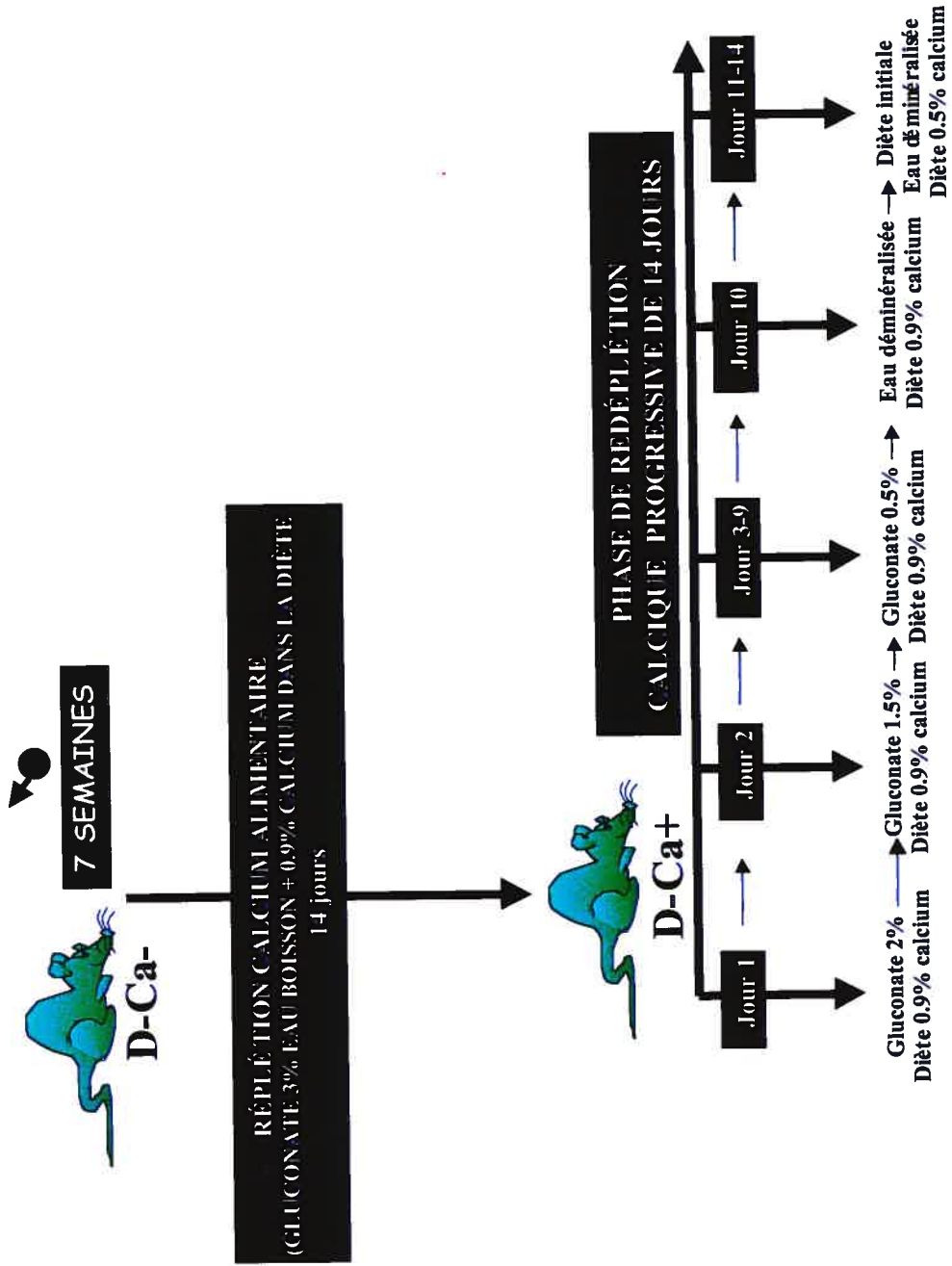
c) Prémisses

Les résultats de la section précédente indiquent que la cinétique de réplétion de calcium cellulaire reflète bien l'influence des concentrations du calcium extracellulaire sur la $[Ca^{2+}]_c$, la mobilisation des réserves IP_3 -dépendantes par la Phe et l'expression génique de la calréticuline.

d) Matériel et Méthodes

Les mêmes techniques expérimentales décrites dans l'article 1 (pages 104-110) ont été utilisées. Comparativement au protocole décrit dans l'article 1, le modèle expérimental utilisé pour l'obtention des résultats présentés dans cette section implique une réplétion calcique de 14 jours avec du calcium alimentaire (3% de gluconate de calcium dans l'eau de boisson et 0.9% de calcium dans la diète) suivie d'une phase de redéplétion calcique progressive d'une durée de 14 jours. Cette phase est caractérisée par la diminution graduelle, sur une période de neuf jours, du contenu en calcium de l'eau de boisson et de la diète. Après neuf jours de redéplétion, les animaux ont reçu de l'eau déminéralisée et la

diète initiale (protocole D-Ca-, article 1) pendant les cinq derniers jours de redéplétion. Ce protocole est illustré à la figure 2.4.





e) *Résultats*

i) *Statut calcique extracellulaire*

La figure 2.5 illustre la concentration sanguine moyenne de Ca^{2+} des animaux en phase de redéplétion catégorisés par intervalle de concentration sérique de Ca^{2+} . A l'amorce de la phase de redéplétion calcique, les animaux présentaient une calcémie moyenne de 1.27 ± 0.01 mM (article 1, page 111). Pour chaque intervalle, le nombre moyen de jours de redéplétion requis pour atteindre cette concentration est également indiqué.

ii) *Concentration cytoplasmique basale de calcium*

La figure 2.6 illustre l'influence de la redéplétion calcique sur la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basale des hépatocytes. Malgré la réduction graduelle de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, aucune diminution parallèle de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basale n'est observée. La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basale moyenne des animaux réplétés en calcium alimentaire au jour 0 de la phase de redéplétion était de 221 ± 5 nM (article 1, page 130) soit significativement plus élevé que le groupe >1.1 mM (180 ± 4 nM; $p < 0.001$) mais toutefois inférieure au groupe 0.8-0.89 (233 ± 7 nM).

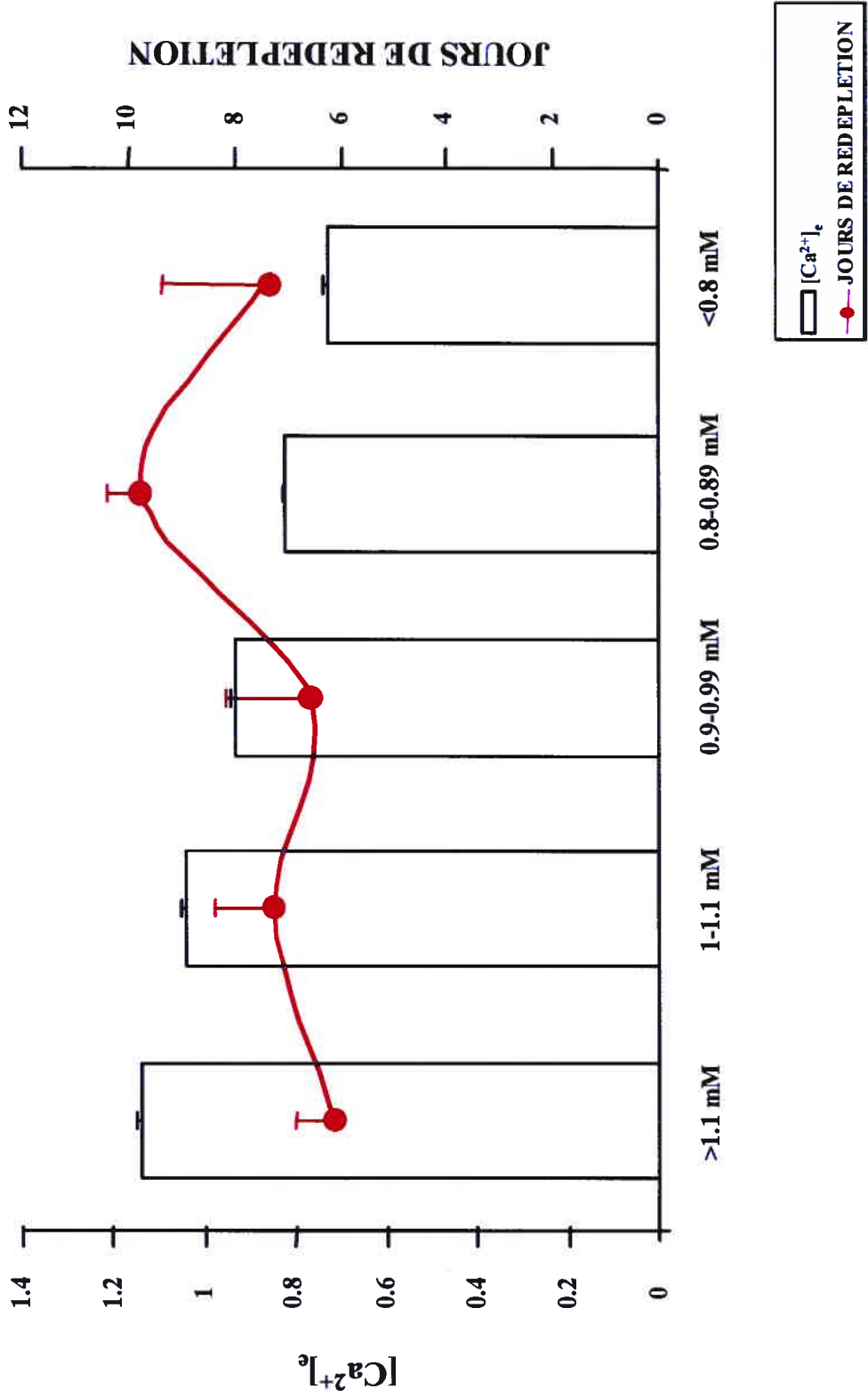


FIGURE 2.5. CATÉGORISATION DES GROUPES ÉTUDIÉS EN PHASE DE REDÉPLÉTION CALCIQUE PROGRESSIVE

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.5

Catégorisation des groupes étudiés durant la phase de redéplétion calcique progressive en fonction de la concentration sérique moyenne de Ca^{2+} des rats. Le nombre de jours de redéplétion requis pour l'atteinte de ces concentrations sériques moyennes est également illustré. Des rats D-Ca- de première génération ont été réplétés en calcium alimentaire pendant 14 jours puis redéplétés selon le protocole illustré à la figure 2.4. >1.1 mM, n=8 rats; 1-1.1 mM, n=11 rats; 0.9-0.99 mM, n=7 rats; 0.8-0.89 mM, n=4 rats; <0.8 mM, n=3 rats. Les concentrations sériques moyennes et le nombre de jours de redéplétion requis pour les atteindre sont les suivants : >1.1 mM : 1.14 ± 0.01 mM atteint en moyenne après 6.1 ± 0.7 jours; 1-1.1 mM : 1.04 ± 0.01 mM atteint en moyenne après 7.3 ± 1.1 jours; 0.9-0.99 mM : 0.93 ± 0.03 mM atteint en moyenne après 6.6 ± 1.6 jours; 0.8-0.89 mM : 0.82 ± 0.01 mM atteint en moyenne après 9.8 ± 0.6 jours et <0.8 mM : 0.73 ± 0.01 mM atteint en moyenne après 7.3 ± 2.2 jours. Le calcul du coefficient de détermination (r^2) entre le statut calcique extracellulaire moyen et le nombre de jours de redéplétion indique une corrélation négative de 0.33.

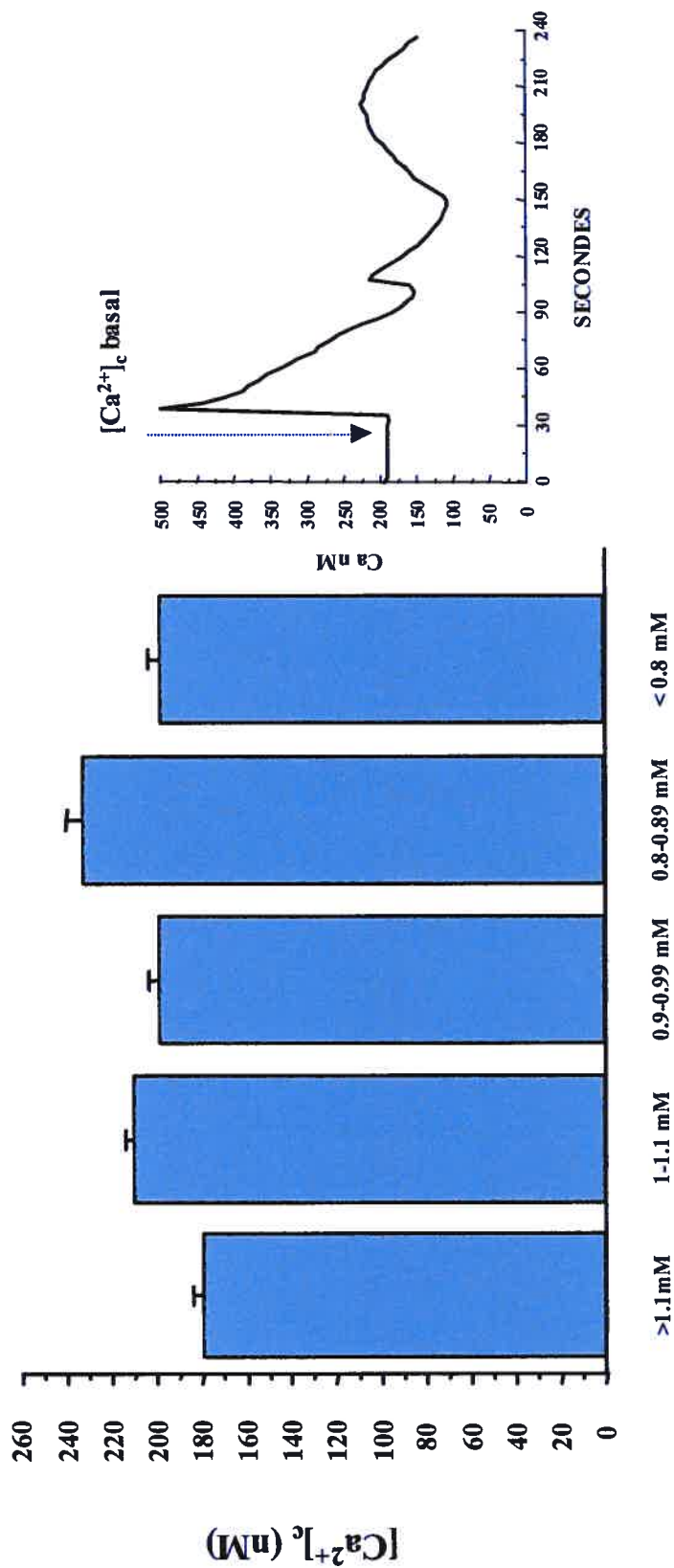


FIGURE 2.6 INFLUENCE DE LA REDEPLÉTION CALCIQUE PROGRESSIVE SUR LA CONCENTRATION CYTOPLASMIQUE BASALE DE CALCIUM

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.6

Concentration cytoplasmique basale d'hépatocytes isolés d'animaux D-Ca- de première génération, réplétés en calcium pendant 14 jours puis redéplétés selon le protocole illustré à la figure 2.4. Les résultats sont illustrés en fonction du statut calcique extracellulaire. La technique de préparation de cellules est celle présentée à l'article 1. >1.1 mM, n=649 cellules obtenues de 8 rats; 1-1.1 mM, n=871 cellules obtenues de 11 rats; 0.9-0.99 mM, n=636 cellules obtenues de 7 rats; 0.8-0.89 mM, n=241 cellules obtenues de 4 rats; <0.8 mM, n=367 cellules obtenues de 3 rats. Un tracé illustrant la courbe de réponse de la $[Ca^{2+}]_c$ d'un hépatocyte isolé d'animal redéplété, en réponse à l'application de l'agent α_1 -adrénergique, Phe, démontre la $[Ca^{2+}]_c$ basale. Les différences entre les moyennes de groupes ont été déterminées par une analyse de variance unidimensionnelle (ANOVA); effet global, $p < 0.05$.

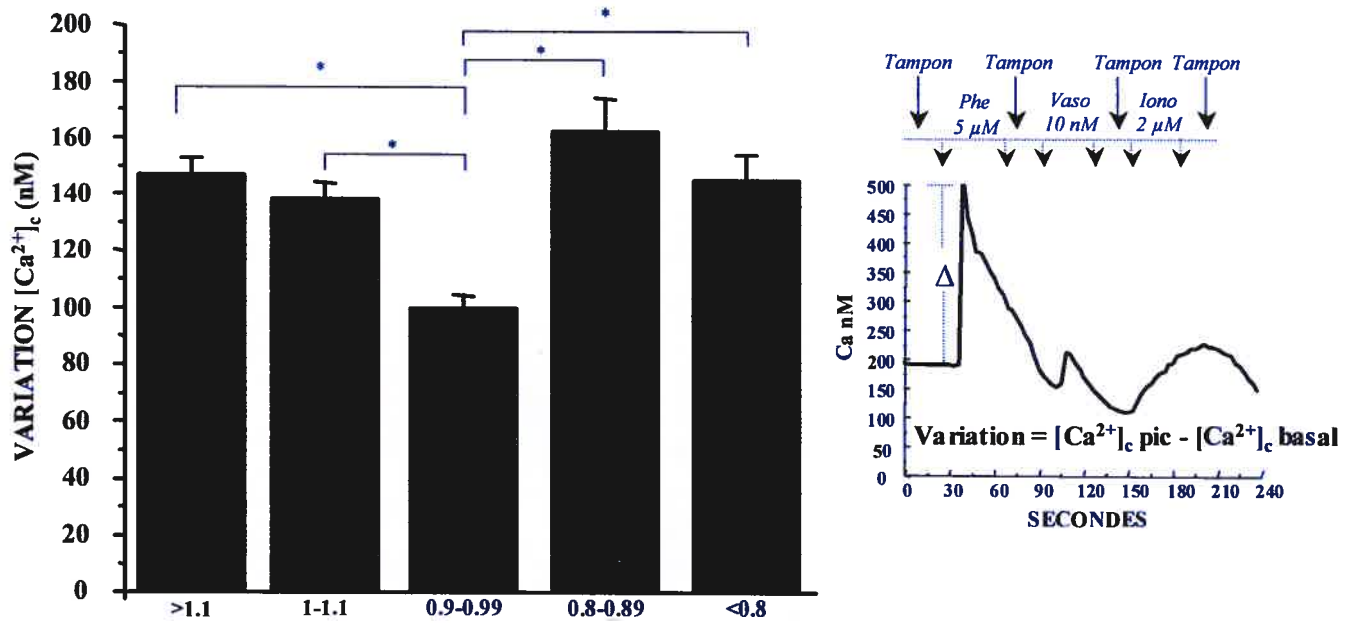
iii) Mobilisation des réserves calciques IP₃-dépendantes par la phényléphrine

La figure 2.7A illustre la mobilisation des réserves calciques IP₃-dépendantes en réponse à la phényléphrine. Au jour 0 de redéplétion calcique, soit après 14 jours de réplétion, la variation moyenne de $[Ca^{2+}]_c$ des hépatocytes en réponse à la phényléphrine est de 158 ± 11 nM. Elle diminue significativement par la suite pour atteindre la valeur la plus basse chez les cellules issues des animaux du groupe 0.9-0.99 mM. Toutefois, la mobilisation des réserves calciques demeure plus élevée chez les hépatocytes provenant d'animaux ayant les calcémies les moins élevées pour atteindre une valeur comparable et même supérieure aux groupes qui présentent des statuts calciques extracellulaires supérieurs à 1mM.

iv) Contenu calcique des réserves cellulaires d'hépatocytes perméabilisés

Les résultats obtenus sur hépatocytes perméabilisés par la technique de spectrofluorométrie recourant à la sonde MAGFURA sont illustrés sous forme de ratio de base à la figure 2.7B. À l'amorce de la phase de redéplétion, le ratio de base moyen était de 1.41 ± 0.07 chez les hépatocytes isolés d'animaux réplétés en calcium alimentaire pendant 14 jours. On note que ce ratio s'élève lors de la redéplétion calcique pour culminer chez les deux groupes situés dans l'intervalle 0.8-0.99 mM. Toutefois, le ratio mesuré chez les hépatocytes des animaux ayant une calcémie inférieure à 0.8 mM est significativement plus faible que celui de tous les autres groupes et se compare à celui mesuré chez les animaux réplétés en calcium alimentaire pendant 14 jours avant l'introduction de la phase de redéplétion calcique.

A- MOBILISATION DES RÉSERVES CELLULAIRES PAR LA PHENYLEPHRINE



B- RATIO DE BASE (RÉSERVES CELLULAIRES CALCIFIQUES)

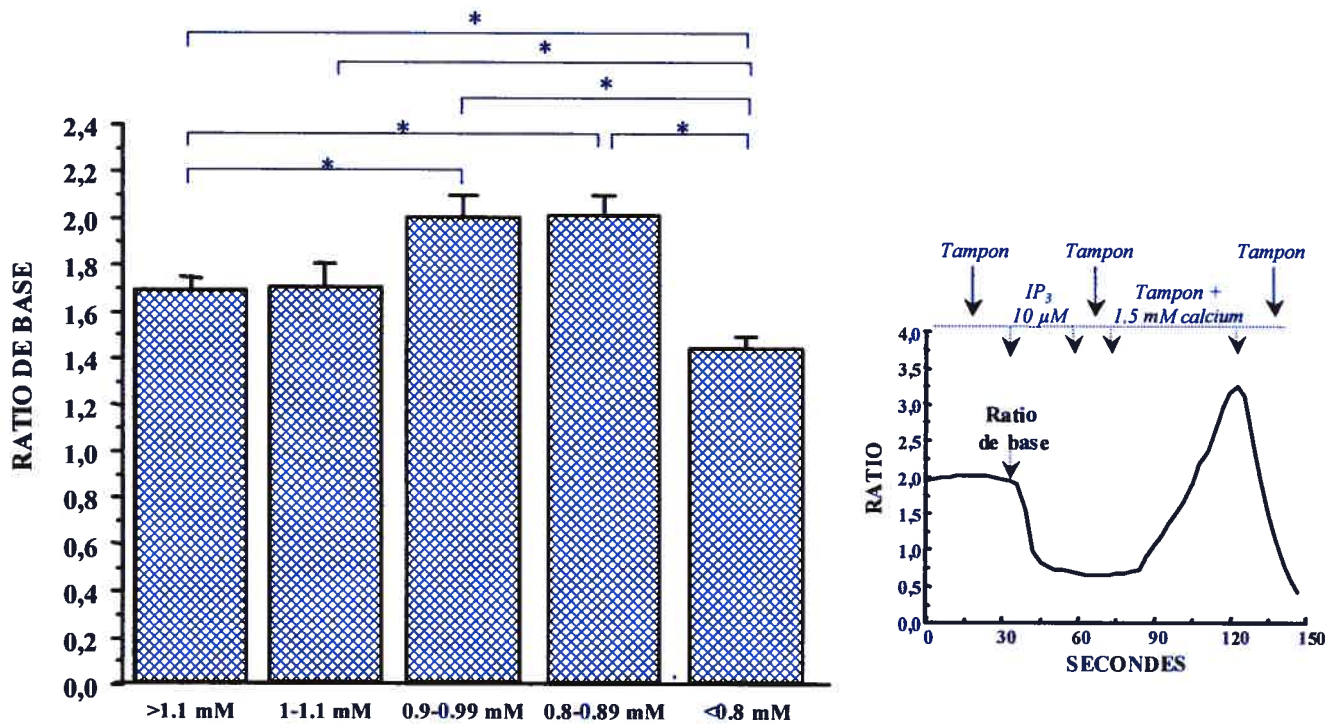


FIGURE 2.7 MOBILISATION DES RÉSERVES IP_3 -DÉPENDANTES PAR LA PHÉNYLEPHRINE ET RATIO DE BASE DES RÉSERVES CALCIFIQUES EN PÉRIODE DE RE-DÉPLÉTION CALCIFIQUE PROGRESSIVE

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.7

A- Mobilisation de la $[Ca^{2+}]_c$ suite à l'application de l'agent α_1 -adrénergique, phényléphrine (5 μ M) d'hépatocytes isolés d'animaux D-Ca- réplétés en calcium pendant 14 jours puis redéplétés selon le protocole illustré à la figure 2.4. Les résultats sont illustrés en fonction du statut calcique extracellulaire. La technique de préparation de cellules est celle présentée à l'article 1. La variation de $[Ca^{2+}]_c$ représente la différence entre le pic de $[Ca^{2+}]_c$ atteinte et la $[Ca^{2+}]_c$ basale. >1.1 mM, n=227 cellules réparties sur 16 expériences et obtenues de 8 rats; 1-1.1 mM, n=241 cellules réparties sur 23 expériences et obtenues de 11 rats; 0.9-0.99 mM, n=168 cellules réparties sur 14 expériences et obtenues de 7 rats; 0.8-0.89 mM, n=76 cellules réparties sur 7 expériences et obtenues de 4 rats; <0.8 mM, n=146 cellules réparties sur 7 expériences et obtenues de 3 rats. Un tracé illustrant la courbe de réponse de la $[Ca^{2+}]_c$ d'un hépatocyte isolé d'animal redéplété, en réponse à l'application de l'agent α_1 -adrénergique, Phe, illustre le calcul de la variation de $[Ca^{2+}]_c$. Les différences entre les moyennes de groupes ont été déterminées par une analyse de variance unidimensionnelle (ANOVA); effet global, $p < 0.001$. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Tukey, $*p < 0.001$

B- Ratio de base mesuré dans les réserves calciques d'hépatocytes perméabilisés et isolés d'animaux D-Ca- réplétés en calcium pendant 14 jours puis redéplétés selon le protocole illustré à la figure 2.4. Les résultats sont illustrés en fonction du statut calcique extracellulaire. La technique de préparation de cellules est celle présentée à l'article 1. La détermination du ratio de base s'est faite par la technique de spectrofluorométrie utilisant la sonde MAG-FURA. Ce ratio est un indicateur de la quantité intraluminale de Ca^{2+} des réserves cellulaires avant toute stimulation visant à mobiliser ces réserves.

>1.1 mM, n=115 cellules réparties sur 25 expériences et obtenues de 5 rats; 1-1.1 mM, n=43 cellules réparties sur 14 expériences et obtenues de 3 rats; 0.9-0.99 mM, n=80 cellules réparties sur 21 expériences et obtenues de 4 rats; 0.8-0.89 mM, n=73 cellules réparties sur 16 expériences et obtenues de 3 rats; <0.8 mM, n=186 cellules réparties sur 19 expériences et obtenues de 5 rats. Un tracé illustre une courbe représentative d'un hépatocyte perméabilisé provenant d'un animal redéplété, en réponse à l'IP₃. Les différences entre les moyennes de groupes ont été déterminées par une analyse de variance unidimensionnelle (ANOVA); effet global, $p < 0.001$. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Tukey, $*p < 0.002$.

f) Discussion

Nos études indiquent que les paramètres associés à l'homéostasie calcique intracellulaire réagissent différemment en phase de réplétion et de redéplétion calcique. En effet, contrairement au patron de réponse observé en réplétion calcique, la redéplétion calcique des animaux n'entraîne pas la déplétion des compartiments extra- et intracellulaires de calcium selon une cinétique graduelle décroissante homogène. On note la présence d'une forte hétérogénéité individuelle pour ce qui est de la réponse du métabolisme calcique à la réintroduction de la diète déficiente en calcium. En effet, le calcul du coefficient de corrélation entre la calcémie et le nombre de jours de redéplétion nous indique que la variabilité de la concentration sérique de Ca^{2+} n'est en fait expliquée qu'à 33% par la durée de la phase de redéplétion. A titre d'exemple, pour atteindre une même concentration sérique de Ca^{2+} , trois jours de redéplétion sont nécessaires à certains animaux alors que d'autres rats ne l'atteignent qu'après huit jours. Ainsi, la réponse homéostatique de l'organisme à la déplétion progressive de l'apport calcique alimentaire semble très individuelle. Ce phénomène peut, entre autres, s'expliquer par la variation des concentrations sériques de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ chez les rats hypocalcémiques chroniques. Les animaux qui arborent initialement une concentration supérieure de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pourraient présenter une meilleure utilisation de leur voie active d'absorption intestinale de calcium lors du retrait progressif de calcium alimentaire, ce qui leur permettrait de maintenir leur calcémie sur une plus longue période. Il est postulé que l'hétérogénéité individuelle peut également se manifester dans la sensibilité du CaSR et la réponse parathyroïdienne aux variations de calcium extracellulaire de même que dans la réponse des organes périphériques, tels l'os et le rein, aux effets de la PTH. De plus, comme chaque groupe est catégorisé selon le statut calcique extracellulaire, on retrouve regroupés au sein d'une même catégorie, des animaux dont l'âge peut varier entre 7 et 9 semaines. L'âge des

animaux dont l'âge peut varier entre 7 et 9 semaines. L'âge des animaux peut aussi avoir un impact sur les besoins calciques de l'organisme et expliquer la grande variabilité individuelle observée.

Ce phénomène d'hétérogénéité se manifeste également au sein des différents paramètres de l'homéostasie calcique cellulaire. Contrairement à ce qui a été observé durant la phase de réplétion calcique, la $[Ca^{2+}]_c$ basale de même que la mobilisation et le ratio de base des réserves calciques des hépatocytes n'obéissent pas à une cinétique décroissante de redéplétion. Lors de la phase de réplétion calcique, la cellule emmagasine et retient efficacement le calcium, se protégeant ainsi contre la venue d'une autre période de déficience. En effet, nous avons observé un accroissement de la $[Ca^{2+}]_c$ basale, des réserves cellulaires calciques ainsi que des niveaux d'expression du gène et de la protéine de la calréticuline après 14 jours de réplétion calcique, signe que la taille fonctionnelle des réserves calciques s'est accrue (article 1). Il est postulé qu'une fois l'atteinte d'un stade normocalcémique, la cellule peut déployer certains mécanismes de défense dans le but de préserver cet état et de séquestrer via les protéines de liaison du Ca^{2+} (*i.e.* calréticuline) plus efficacement le calcium dans la cellule, ce qui pourrait expliquer qu'aucune réduction progressive ni du contenu cytoplasmique, ni du contenu des réserves cellulaires ne soit observée lors de la période précoce de privation calcique. Finalement, les deux techniques de spectrofluorométrie utilisées, soit celle appliquée sur cellules entières à l'aide de la sonde fluorescente FURA-2AM (figure 12A) et l'autre sur cellules perméabilisées avec la sonde MAG-FURA-2 (figure 12B) n'évaluent pas les mêmes paramètres. La technique utilisant le FURA-2AM a servi à évaluer la mobilisation calcique par la Phe, un agoniste qui entraîne la production d'IP₃. Cette technique cible un seul type de réserves localisées dans le RE. La technique utilisant le ratio de base mesuré à l'aide de la sonde MAG-FURA-2 a servi à évaluer le contenu

global des réserves calciques mobilisables. Elle est donc un reflet des réserves cellulaires sans distinction. Elle demeure une mesure plus directe, quoique qualitative, de l'état des réserves calciques cellulaires. La mobilisation des réserves du RE par la Phe est plutôt un indice de la réponse à un agoniste couplé à un récepteur dont la réponse dépend de la mobilisation des réserves calciques IP₃-dépendantes. De plus, comme ces expériences sont réalisées sur cellules entières, donc pourvues de leur machinerie cellulaire intacte, les événements survenant en aval de la mobilisation des réserves, soit l'extrusion de calcium hors de la cellule ou encore la recapture du calcium par la mitochondrie ou par le RE lui-même peuvent contribuer à la sous-estimation de la réponse quoique la mobilisation initiale est considérée comme un reflet fidèle de l'intensité de la réponse. Fait intéressant, on observe que lorsque le Ca²⁺ extracellulaire se situe entre 0.9-0.99 mM, le ratio de base des hépatocytes figure parmi les plus élevés alors que la mobilisation des réserves par la Phe est la plus faible. Ce résultat peut être indicateur que la séquestration du calcium dans le RE est accentuée ou que le processus de recapture ou de sortie du calcium du compartiment cytoplasmique est particulièrement efficace.

Nos travaux antérieurs nous indiquent que suite à une hypocalcémie chronique, la concentration basale du Ca²⁺ cytoplasmique est significativement abaissée comparativement à celle observée chez les animaux normaux. Durant la phase de redéplétion calcique, nous observons plutôt une tendance à la hausse de la [Ca²⁺]_c basale. Ainsi lors de cette phase transitoire, la capture/recapture du Ca²⁺ par les pools cellulaires et/ou l'extrusion du Ca²⁺ par l'ATPase de la membrane plasmique pourraient être abaissées. Cette baisse aurait, ainsi, pour conséquence de mener à une augmentation transitoire du Ca²⁺ cytoplasmique.

Ainsi, en conclusion, nos observations indiquent que l'introduction d'une phase de redéplétion calcique progressive ne déplete pas les compartiments cellulaires de calcium de façon parallèle à la cinétique de la chute du Ca^{2+} extracellulaire. Plusieurs facteurs inhérents aux animaux ainsi qu'aux mécanismes homéostatiques régissant le métabolisme calcique cellulaire, également, peuvent venir expliquer l'hétérogénéité observée au sein des paramètres étudiés.

II- Influence du statut calcique extracellulaire sur l'homéostasie cellulaire calcique de l'ostéoblaste

1. Hypothèse spécifique

Les études reposent sur l'hypothèse selon laquelle l'homéostasie cellulaire calcique de l'ostéoblaste sera influencée par le statut calcique extracellulaire et ce, de façon comparable aux résultats obtenus sur les hépatocytes isolés en culture primaire.

2. But

Démontrer que l'influence du statut calcique extracellulaire sur l'homéostasie du calcium intracellulaire est un phénomène qui s'étend à plusieurs modèles cellulaires dont, entre autres, un type cellulaire associé au métabolisme phosphocalcique, l'ostéoblaste.

3. Prémises

1) L'homéostasie calcique intracellulaire de l'hépatocyte de rat est fortement perturbée par un statut D-Ca- mais elle est normalisée par une supplémentation de calcium alimentaire de 14 jours (216). Toutefois, l'hépatocyte n'est pas une cellule associée au métabolisme phosphocalcique.

2) La signalisation cellulaire calcique de l'ostéoblaste est importante dans le processus de remodelage osseux ainsi que dans la réalisation de plusieurs fonctions cellulaires telles la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la sécrétion.

4. Matériel et Méthodes

a) Culture cellulaire

i) Ostéoblastes isolés de tibia de rat

Pour cette série d'expériences, les ostéoblastes ont été isolés de tibia d'animaux N et D-Ca- de deuxième génération âgés de 6 à 8 semaines. Les animaux ont été sacrifiés par exsanguination et les tibias excisés puis dépourvus de la peau et du muscle recouvrant l'os pour ensuite être découpés. L'isolation des ostéoblastes s'est faite selon une modification

de la technique de digestion séquentielle à la collagénase telle que décrite précédemment (218;219). Brièvement, les morceaux d'os ont été mis dans un milieu additionné de collagénase dans le but de digérer le tissu conjonctif entourant les ostéoblastes et permettre ainsi leur isolation des autres populations cellulaires de l'os. Les ostéoblastes ainsi isolés ont été cultivés pendant 48 heures dans un milieu de culture additionné de sérum de veau fœtal et reflétant le statut calcique *in vivo* ajusté à 0.8 (animaux D-Ca-) ou 1.25 mM Ca^{2+} (animaux N). Afin d'étudier l'influence de la concentration de calcium extracellulaire sur l'homéostasie calcique cellulaire, les cellules ont été équilibrées pendant 24 heures dans un milieu de culture dépourvu de calcium extracellulaire. Cette phase a été suivie d'une période de réplétion calcique où chaque milieu de culture a été aléatoirement réparti en cinq groupes représentant cinq conditions calciques extracellulaires différentes. Les cellules ont été cultivées dans ces conditions pendant une période allant de cinq à sept jours afin de bien rééquilibrer le statut calcique.

ii) Lignée cellulaire ostéoblastique ROS 17/2.8

Des expériences similaires ont également été réalisées sur un lignée cellulaire immortalisée issue d'un ostéosarcome de rat. Cette lignée de cellules a su conserver le phénotype ostéoblastique en plus de posséder un VDR_n fonctionnel (220). Le protocole expérimental de culture cellulaire est comparable à celui employé pour les ostéoblastes isolés de tibia. Il est illustré à la figure 2.8.

b) Paramètres mesurés

La mesure de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basale et de la mobilisation des réserves calciques IP_3 -dépendantes s'est faite par spectrofluorométrie sur cellules entières en utilisant la sonde FURA-2AM tel que décrit à l'article 1. Plusieurs agonistes mobilisateurs de calcium ont été utilisés dont la bradykinine (1 μM) et l'ionomycine (2 μM) pour les ostéoblastes en culture primaire et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-7}M) et l'ionomycine (2 μM) pour les cellules *ROS 17/2.8*. Tel que décrit à

l'article 1, la mobilisation du calcium intracellulaire a été réalisé dans un milieu extracellulaire dépourvu de calcium afin d'éviter toute influence du milieu extérieur sur les flux calciques intracellulaires.

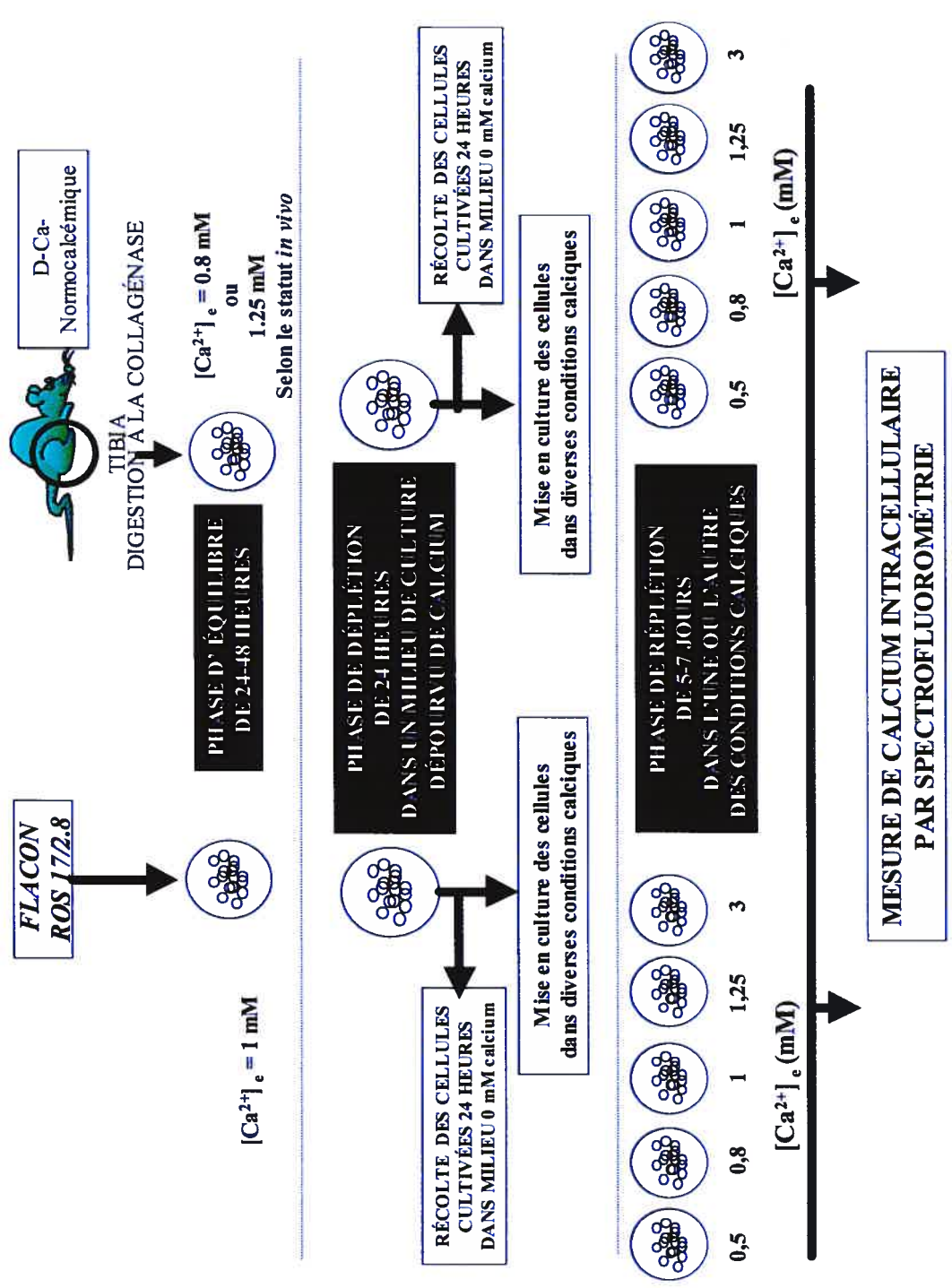


FIGURE 2.8 SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE POUR LES ETUDES SUR CELLULES OSSEUSES

5. Résultats

a) Cellules ROS 17/2.8

i) Influence extracellulaire sur la concentration cytoplasmique basale de calcium

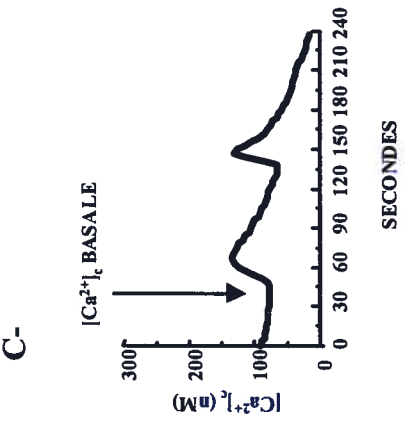
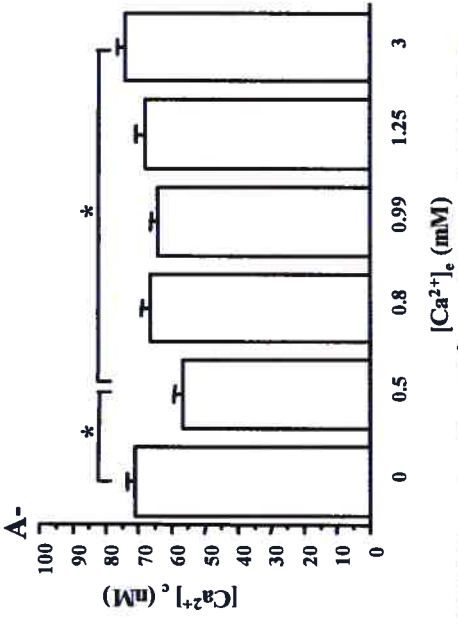
Tel qu'illustré à la figure 2.9A, la concentration de calcium extracellulaire (0.5 à 3 mM) augmente progressivement la $[Ca^{2+}]_c$ basale des cellules ROS 17/2.8. Paradoxalement, l'équilibre des cellules en milieu sans calcium semble augmenter la $[Ca^{2+}]_c$ basale comparativement à celle observée en présence de 0.5 mM Ca^{2+} .

ii) Influence extracellulaire sur la mobilisation des réserves calciques cellulaires par la 1,25(OH)₂D₃ et l'ionomycine.

Malgré une influence plutôt faible du calcium extracellulaire sur la $[Ca^{2+}]_c$ basale, la mobilisation des réserves cellulaires calciques est grandement influencée par la $[Ca^{2+}]_e$. Ainsi, une première mobilisation des réserves IP₃-dépendantes, par la 1,25(OH)₂D₃, tout comme la mobilisation de réserves cellulaires additionnelles par l'ionomycine, sont significativement influencées ($p < 0.001$) par la $[Ca^{2+}]_e$ (Figure 2.9B). Ainsi, les cellules cultivées dans un milieu pourvu d'une concentration de calcium extracellulaire supérieure à 0.8 mM montre une mobilisation calcique significativement plus élevée que les cellules cultivées dans le milieu dépourvu ou contenant 0.5 mM de calcium extracellulaire. Un plateau, à la fois pour la 1,25(OH)₂D₃ et l'ionomycine est atteint à une $[Ca^{2+}]_e$ de 1.25 mM.

CELLULES ROS 17/2.8

A-CALCIUM CYTOPLASMIQUE BASAL



B- MOBILISATION DES RÉSERVES CELLULAIRES PAR LA 1,25(OH)₂D₃ SUIVIE DE L'IONOMYCINE

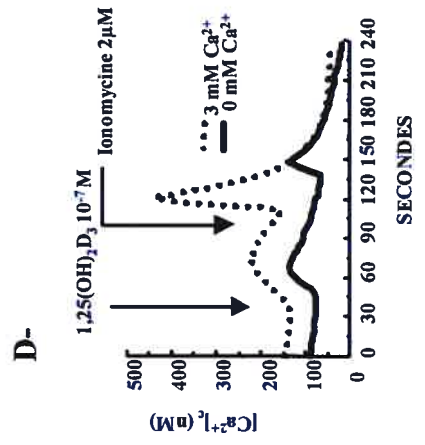
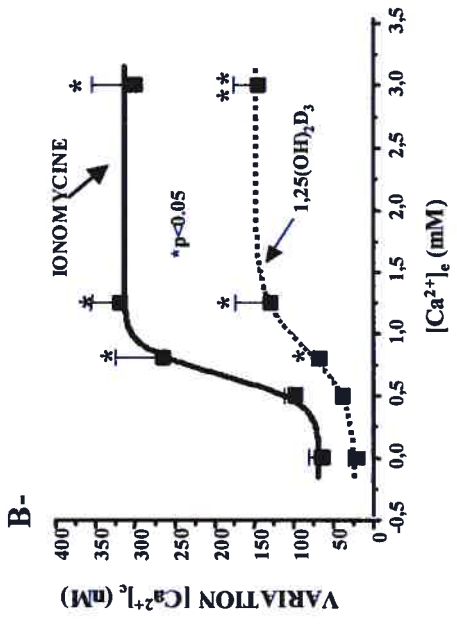


FIGURE 2.9 EFFET DU STATUT CALCIQUE IN VITRO SUR LA CONCENTRATION CYTOPLASMIQUE BASALE DE CALCIUM ET SUR LA MOBILISATION DES RÉSERVES CALCIQUES CELLULAIRES CHEZ LES CELLULES ROS 17/2.8.

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.9

A- Concentration cytoplasmique basale de calcium des cellules *ROS 17/2.8* soumises à un protocole de déplétion-réplétion calcique tel qu'illustré à la figure 2.8. La $[Ca^{2+}]_c$ basale représente la moyenne de 180 cellules pour les cellules cultivées 24 heures dans 0 mM Ca^{2+} ; 67 cellules pour les cellules cultivées cinq jours dans 0.5 mM Ca^{2+} ; 101 cellules pour les cellules cultivées cinq jours dans 0.8 mM Ca^{2+} ; 92 cellules pour les cellules cultivées cinq jours dans 0.99 mM Ca^{2+} ; 122 cellules pour les cellules cultivées cinq jours dans 1.25 mM Ca^{2+} et 108 cellules pour les cellules cultivées cinq jours dans 3 mM Ca^{2+} . Un tracé illustrant la courbe de réponse de la $[Ca^{2+}]_c$ d'une cellule *ROS 17/2.8* cultivée dans le milieu 0 mM Ca^{2+} , en réponse à l'application de 10^{-7} M de $1,25(OH)_2D_3$, démontre la $[Ca^{2+}]_c$ basale (**C**). Les différences entre les moyennes de groupes ont été déterminées par une analyse de variance unidimensionnelle (ANOVA); effet global, $p < 0.007$. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Tukey, $*p < 0.05$. Le calcul du coefficient de détermination (r^2) en excluant la valeur mesurée dans le milieu dépourvu de calcium est de 0.74.

B- Mobilisation moyenne de $[Ca^{2+}]_c$ suite à l'application de 10^{-7} M de $1,25(OH)_2D_3$, suivi de $2\mu M$ d'ionomycine. Les résultats sont illustrés en fonction des concentrations extracellulaires de calcium. La variation de $[Ca^{2+}]_c$ représente la différence entre le pic de $[Ca^{2+}]_c$ atteinte et la $[Ca^{2+}]_c$ basale en réponse à la $1,25(OH)_2D_3$ (première sortie) et à l'ionomycine (deuxième pic). 0 mM, $n=63$ cellules réparties sur 12 expériences; 0.5 mM, $n=29$ cellules réparties sur 2 expériences; 0.8 mM, $n=69$ cellules réparties sur 3 expériences; 1.25 mM, $n=38$ cellules réparties sur 4 expériences; 3 mM, $n=70$ cellules réparties sur 5 expériences. Un tracé illustre les courbes de réponse de la $[Ca^{2+}]_c$ des cellules *ROS 17/2.8* cultivées dans 0 et 3 mM Ca^{2+} , en réponse à 10^{-7} M de $1,25(OH)_2D_3$ suivi de $2\mu M$ d'ionomycine (**D**). Les différences entre les moyennes de groupes ont été

déterminées par analyse non-paramétrique (Kruskal-Wallis), effet global, $p < 0.001$ et $p < 0.001$ pour la mobilisation par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et par l'ionomycine respectivement. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Dunn, $*p < 0.05$ vs 0 mM Ca^{2+} et $**p < 0.05$ vs 0.5 mM Ca^{2+} .

b) Ostéoblastes en culture primaire

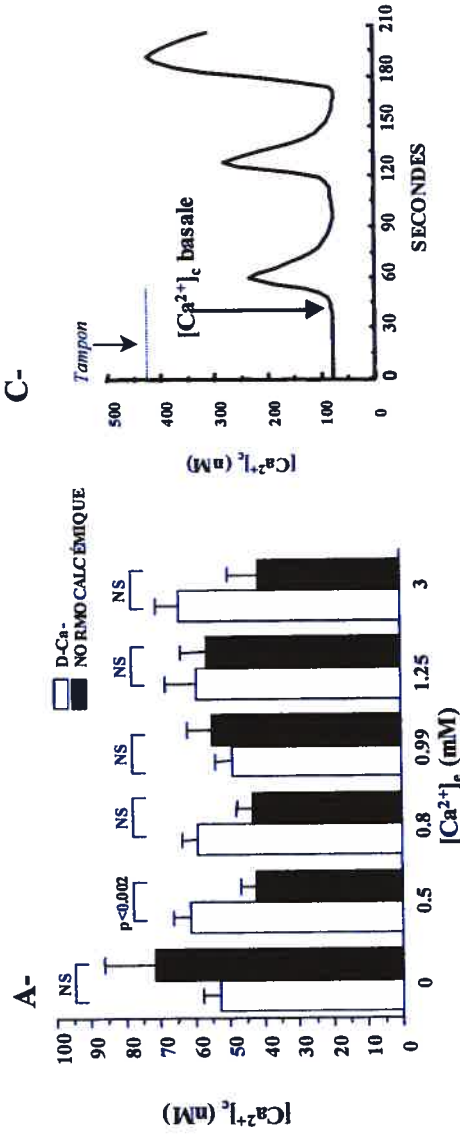
i) Influence extracellulaire sur la concentration cytoplasmique basale de calcium

La figure 2.10A illustre la $[Ca^{2+}]_c$ basale des ostéoblastes en culture primaire issus d'animaux N et D-Ca- de deuxième génération et soumis à un protocole d'équilibre en milieu sans calcium suivi d'une rééquilibration à des concentrations de Ca^{2+} variant de 0.5 à 3 mM. On observe que chez les animaux D-Ca-, les concentrations de calcium extracellulaire n'influence pas la concentration de la $[Ca^{2+}]_c$ basale. Par ailleurs, chez les N, on note que l'absence de calcium dans le milieu extracellulaire contribue à augmenter la valeur de la $[Ca^{2+}]_c$ basale. L'ajout de calcium extracellulaire (0.5 à 1.25 mM) contribue à augmenter, quoique non-significativement, la $[Ca^{2+}]_c$ basale alors qu'une baisse est observée lorsque la $[Ca^{2+}]_e$ est de 3 mM Ca^{2+} .

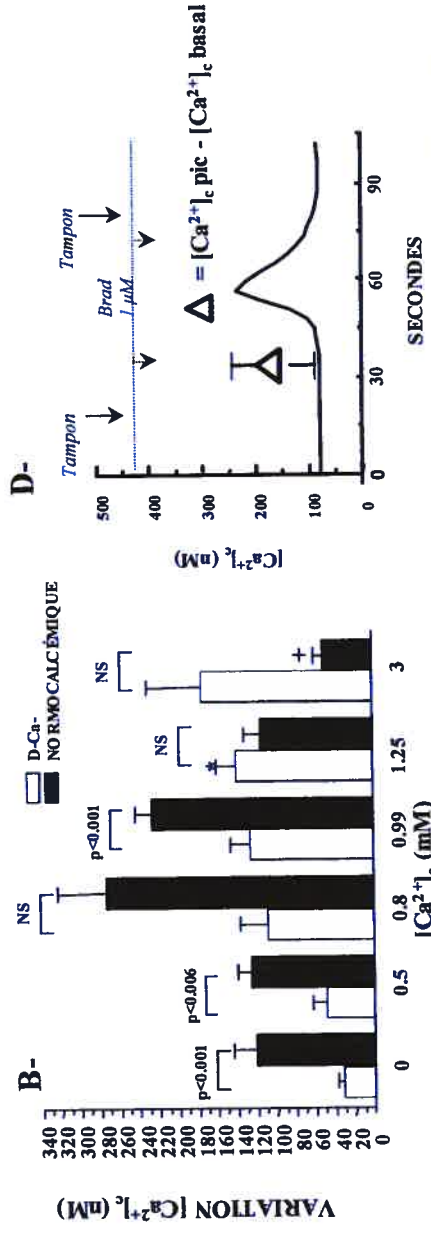
ii) Influence extracellulaire sur la mobilisation des réserves IP_3 -dépendantes par la bradykinine

Tel qu'illustré à la figure 2.10B, une influence significative du calcium extracellulaire sur la mobilisation des réserves calciques par la bradykinine est observée et ce, peu importe le statut calcique *in vivo* (normo- vs hypocalcémique). Toutefois, le patron de cette influence diffère selon les groupes. En effet, les cellules isolées d'animaux normaux démontrent une mobilisation calcique qui atteint un sommet (274.64 ± 48.72 nM) à 0.8 mM pour ensuite redescendre (1.25 mM : 115.89 ± 16.14 nM) et atteindre à 3 mM de Ca^{2+} (51.11 ± 8.98 nM) une valeur inférieure à celle des cellules cultivées dans le milieu sans calcium (122.24 ± 22.59 nM, $p < 0.05$). Les cellules issues d'animaux D-Ca- exhibent une mobilisation calcique qui augmente lorsque le statut calcique extracellulaire s'accroît avec l'atteinte d'un sommet à 3 mM de $[Ca^{2+}]_e$ (175.58 ± 55.63 nM ; $r^2 = 0.77$).

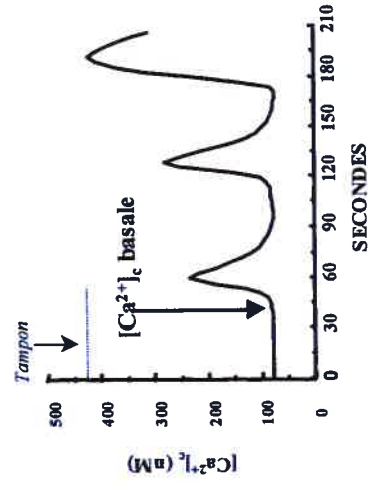
**OSTÉOBLASTES CULTURE PRIMAIRE (TIBIA)
A-CALCIUM CYTOPLASMIQUE BASAL**



B- MOBILISATION DES RÉSERVES CELLULAIRES PAR LA BRADYKININE



C-



D-

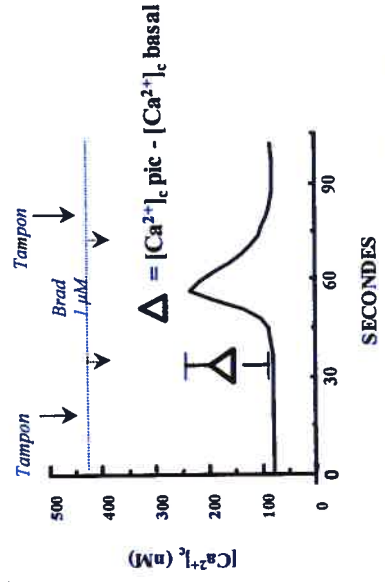


FIGURE 2.10 EFFET DU STATUT CALCIQUE IN VITRO SUR LA CONCENTRATION CYTOPLASMIQUE BASALE DE CALCIUM ET SUR LA MOBILISATION DES RÉSERVES CALCIQUES CELLULAIRES CHEZ DES OSTÉOBLASTES EN CULTURE PRIMAIRE

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.10

A- Concentration cytoplasmique basale des ostéoblastes de tibia provenant d'animaux N (■) et D-Ca- de deuxième génération (□). Les cellules ont été soumises à un protocole de déplétion-réplétion calcique tel qu'illustré à la figure 2.8. La $[Ca^{2+}]_c$ basale représente la moyenne de 7 (■) et 14 (□) cellules cultivées 24 heures dans 0 mM Ca^{2+} ; 20 (■) et 35 (□) cellules cultivées cinq jours dans 0.5 mM Ca^{2+} ; 10 (■) et 15 (□) cellules cultivées cinq jours dans 0.8 mM Ca^{2+} ; 8 (■) et 20 (□) cellules cultivées cinq jours dans 0.99 mM Ca^{2+} ; 14 (■) et 2 (□) cellules cultivées cinq jours dans 1.25 mM Ca^{2+} et 8 (■) et 18 (□) cellules cultivées cinq jours dans 3 mM Ca^{2+} . Un tracé illustre la courbe de réponse de la $[Ca^{2+}]_c$ d'un ostéoblaste cultivé cinq jours dans 1mM Ca^{2+} en réponse à l'application 1 μ M de bradykinine (C). Les différences entre les moyennes des groupes ont été déterminées par analyse de variance unidimensionnelle; effet global: NS pour N et D-Ca-. Les comparaisons deux-à-deux entre les moyennes des N et D-Ca- pour chaque concentration extracellulaire de calcium, telles qu'indiquées sur la figure, ont été réalisées en utilisant le test « t » de Student avec une correction de Bonferroni.

B- Mobilisation moyenne de $[Ca^{2+}]_c$ suite à l'application de 1 μ M de bradykinine. Les résultats sont illustrés en fonction des concentrations extracellulaires de calcium. La variation de $[Ca^{2+}]_c$ représente la différence entre le pic de $[Ca^{2+}]_c$ atteinte en réponse à la bradykinine et la $[Ca^{2+}]_c$ basale. Les effectifs pour chacun des groupes sont : 0 mM, (■) 11 cellules provenant de 6 rats et réparties sur 6 expériences et (□) 17 cellules provenant de 4 rats et réparties sur 17 expériences; 0.5 mM, (■) 25 cellules provenant de 3 rats et réparties sur 3 expériences et (□) 12 cellules provenant de 6 rats et réparties sur 6 expériences; 0.8 mM, (■) 8 cellules et (□) 10 cellules provenant de 3 rats et réparties sur 4 expériences; 1.25 mM, (■) 16 cellules et (□) 21 cellules provenant de 5 rats et réparties sur 5 expériences; 3 mM, (■) 8 cellules et (□) 11 cellules provenant de 4 rats et réparties sur 4

expériences. Un tracé illustre la courbe de réponse de la $[Ca^{2+}]_c$ d'un ostéoblaste cultivé cinq jours dans 1mM Ca^{2+} en réponse à l'application de 1 μ M de bradykinine (**D**). Les différences entre les moyennes des groupes ont été déterminées par analyse non-paramétrique (Kruskal-Wallis); effet global, $p < 0.001$ et $p < 0.002$ pour N et D-Ca- respectivement. Les comparaisons deux à deux ont été réalisées par le test de Dunn, * $p < 0.05$ vs 0 mM Ca^{2+} et + $p < 0.05$ vs 0.8 et 0.99 mM Ca^{2+} . Les différences deux-à-deux entre les moyennes des N et D-Ca- pour chaque concentration extracellulaire de calcium, telles qu'indiquées sur la figure, ont été réalisées en utilisant le test de Mann-Whitney avec une correction de Bonferroni.

6. Discussion

Lorsqu'on établit un parallèle avec l'hépatocyte, l'impact du statut calcique extracellulaire sur la $[Ca^{2+}]_c$ basale est plus faible chez les cellules osseuses. En effet, chez les deux types de cellules osseuses étudiées, on note un différentiel de $[Ca^{2+}]_c$ extrêmement faible (environ 20 nM) entre les cellules cultivées dans un milieu pourvu de 0.5 et 3 mM Ca^{2+} . De façon analogue aux hépatocytes isolés d'animaux en redéplétion calcique (page 165), l'équilibre des cellules dans un milieu dépourvu de Ca^{2+} pendant 24 heures contribue à la hausse de la $[Ca^{2+}]_c$ basale des cellules *ROS 17/2.8* de même que des ostéoblastes en culture primaire issus d'animaux N. Il est important de mentionner que l'équilibre des cellules en milieu dépourvu de calcium entraîne une perturbation de l'intégrité membranaire de ces cellules et que leur morphologie s'en trouve gravement altérée, ce qui suggère une perturbation importante de l'homéostasie et des fonctions cellulaires. Ceci peut se traduire par une hausse de la $[Ca^{2+}]_c$ basale qui est souvent un signe précurseur de nécrose ou d'apoptose. Toutefois, l'observation de cet effet uniquement chez les cellules en culture primaire isolées d'animaux N suggère que les cellules issues d'animaux D-Ca- exhibent soit une meilleure résistance aux effets d'un milieu extracellulaire sans calcium ou encore qu'elles présentent une meilleure adaptation face à l'absence de concentration extracellulaire de calcium extracellulaire puisqu'elles sont isolées d'animaux au statut calcique déficient.

La mobilisation des réserves calciques semble, quant à elle, fortement influencée par le statut calcique extracellulaire chez les deux types de cellules osseuses. Ces résultats sont appuyés par le fait que nous avons utilisé plusieurs agonistes mobilisateurs de calcium agissant par des mécanismes d'action distincts (récepteurs membranaires et ionophore) et qui ciblent des réserves cellulaires différentes (réserves IP_3 -dépendantes et mitochondrie). Ainsi, en réponse à ces divers agonistes, la mobilisation des réserves calciques des cellules *ROS 17/2.8* et des ostéoblastes issus d'animaux D-Ca- démontrent une cinétique croissante

hautement dépendante du statut calcique extracellulaire. Néanmoins, la mobilisation calcique des cellules *ROS 17/2.8* exhibe un plateau à 1.25 mM Ca^{2+} alors que ce plateau est inexistant chez les ostéoblastes D-Ca- qui démontrent plutôt une hausse graduelle et progressive de la mobilisation calcique des réserves cellulaires. Ces résultats rejoignent ceux obtenus avec les hépatocytes isolés d'animaux D-Ca- soumis à une réplétion calcique où la mobilisation des réserves IP_3 -dépendantes par la Phe suit une cinétique croissante. Cette dernière n'est toutefois pas reproduite chez les ostéoblastes isolés d'animaux N. Chez ces derniers, la mobilisation des réserves calciques IP_3 -dépendantes est fortement influencée par la concentration de calcium extracellulaire mais selon un patron de réponse biphasique. La mobilisation des réserves calciques augmente graduellement jusqu'à une $[\text{Ca}^{2+}]_e$ de 0.8 mM, concentration à partir de laquelle, elle décroît. Cette réponse biphasique peut s'expliquer par une certaine résistance de la cellule face à une élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, hausse qui peut constituer un danger pour son intégrité et sa survie. La cellule peut, en effet, accroître la séquestration du calcium dans la mitochondrie résultant en une réduction de la mobilisation des pools du RE. Il est intéressant de constater que la mobilisation du calcium des réserves IP_3 -dépendantes atteint un sommet à une $[\text{Ca}^{2+}]_e$ inférieure à celle retrouvée *in vivo*. En effet, la mobilisation calcique des cellules cultivées dans un milieu se rapprochant le plus du statut calcique *in vivo*, soit 1.25 mM, est grandement réduite. Néanmoins, il faut garder en perspective que ces résultats concernent des cellules osseuses, souvent situées à proximité d'un front de résorption osseuse ou d'une unité de minéralisation et donc habituées à faire face à des concentrations de calcium extracellulaire extrêmement élevées mais aussi très variables. Théoriquement, chez l'ostéoblaste, l'activation de la voie de signalisation intracellulaire du calcium est nécessaire à la sécrétion de facteurs ostéoclastiques visant à stimuler leur prolifération, leur différenciation et/ou leur fonction. Ainsi, en regard de cette hypothèse, les résultats observés sur les

ostéoblastes isolés d'animaux N sont très intéressants. En démontrant que l'homéostasie calcique de ces cellules s'ajuste à la $[Ca^{2+}]_e$, ceci suggère que lorsque cette dernière s'élève, tel au front de résorption osseuse, la mobilisation des réserves calciques en réponse à des agonistes diminue. La réponse physiologique qui s'ensuit, soit la sécrétion de facteurs ostéoclastiques, en sera conséquemment réduite afin de diminuer ou faire cesser le processus de résorption osseuse.

Les animaux D-Ca- vivent un état hypocalcémique sévère doublé d'une hyperparathyroïdie secondaire où la source de calcium pour combler les besoins calciques demeure l'os et la réabsorption tubulaire. Le processus de résorption osseuse chez ces animaux est déjà fortement stimulé. Ainsi, les résultats obtenus chez les ostéoblastes issus de ces animaux viennent appuyer cette observation. En effet, l'augmentation du statut calcique extracellulaire cause un accroissement graduel et continu de la mobilisation calcique des ostéoblastes D-Ca-, permettant ainsi de maintenir la sécrétion de facteurs ostéoclastiques. Ceci préserve le processus de résorption osseuse nécessaire pour combler les besoins calciques de ces animaux sévèrement hypocalcémiques. Il demeure intéressant de constater que ces résultats se reproduisent également chez les cellules ROS 17/2.8. Ces cellules sont caractérisées par la présence du VDR_n mais la mobilisation des réserves calciques par la $1,25(OH)_2D_3$ laisse sous-entendre la présence d'un récepteur membranaire liant l'hormone. Toutefois, les fonctions physiologiques découlant de la liaison de la $1,25(OH)_2D_3$ à son récepteur restent à être déterminées. On peut donc affirmer que le statut calcique extracellulaire *in vivo* influence grandement l'homéostasie calcique cellulaire d'une population d'ostéoblastes en culture primaire et que ce phénomène se reflète *in vitro*. En conclusion, contrairement, à l'hépatocyte, la mobilisation des réserves calciques des cellules osseuses semble démontrer plus de sensibilité au statut calcique extracellulaire que la $[Ca^{2+}]_c$ basale. On peut présumer que l'altération de l'homéostasie intracellulaire de

calcium aura une incidence sur la réalisation des fonctions biologiques de l'ostéoblaste dépendantes de la voie de signalisation intracellulaire de calcium telles la sécrétion de facteurs agissant sur les ostéoclastes par voie paracrine.

2.2. DEUXIÈME VOLET : PERSISTANCE DES EFFETS DE LA CORRECTION D'UN ETAT D'HYPOCALCÉMIE CHRONIQUE IN VIVO

HYPOTHÈSE SPÉCIFIQUE

Les études reposent sur l'hypothèse selon laquelle le calcium, la D₃ et la 1,25(OH)₂D₃ normalisent le statut calcique chez l'animal présentant une hypocalcémie secondaire à une carence en D. Toutefois, l'étendue de cette normalisation sur le système endocrinien de la D et du calcium et sur l'os variera selon l'intervention et pourra être clairement mis en évidence lors d'une phase de redéplétion calcique.

BUT

Évaluer, chez le rat hypocalcémique déplété en D, l'effet de la réplétion en calcium, en D₃ ou en 1,25(OH)₂D₃ sur la cinétique de normalisation (phase de réplétion) et le rétablissement de l'état de carence (phase de redéplétion) sur l'os et les paramètres sériques et urinaires du métabolisme phosphocalcique.

PRÉMISSSES

- 1) Suite à l'observation que l'homéostasie calcique cellulaire de l'hépatocyte et de l'ostéoblaste est altérée en présence d'une déficience en calcium et en D et que l'application d'un mode de réplétion calcique contribue à corriger ces perturbations selon une cinétique propre au modèle cellulaire étudié.
- 2) Selon les travaux antérieurs qui montrent que la redéplétion calcique progressive succédant à une phase de réplétion calcique n'influence pas l'homéostasie calcique de l'hépatocyte selon une cinétique décroissante et graduelle.

**ENDOCRINE AND BONE CONSEQUENCES OF CHRONIC
HYPOCALCEMIA REVERSAL IN THE RAT***An in vivo depletion-repletion-redepletion study***Geneviève Mailhot,^{1,2} Jean-Luc Petit,^{1,3} Natalie Dion,^{1,4} Claire Deschênes,^{1,4} Louis-Georges Ste-Marie,^{1,4} and Marielle Gascon-Barré^{1,2,3}**

**Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal,¹ and
Départements de Nutrition², Pharmacologie³ et Médecine⁴, Faculté de Médecine,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada**

Short title: Hypocalcemia reversal**Key words:** Vitamin D₃, 1,25(OH)₂D₃, calcium supplementation, D deficiency, rickets, bone histomorphometry**Corresponding author:**

Marielle Gascon-Barré, PhD, MBA

Centre de recherche, Hôpital Saint-Luc, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,
264 René-Lévesque Blvd. East, Montreal (Quebec) CANADA, H2X 1P1

Tel.: (514) 890-8310 #35707 / FAX: (514) 412-7314

E-mail: marielle.gascon.barre@umontreal.ca

ABSTRACT

Chronic hypocalcemia secondary to vitamin D₃ (D₃) depletion (D-Ca-) perturbs not only extra- but also intracellular Ca²⁺ homeostasis. Our aim was to investigate the lasting effects of calcium supplementation, D₃ or 1,25(OH)₂D₃ on Ca²⁺ and bone metabolism using a depletion-repletion-redepletion protocol as experimental paradigm. D-Ca- rats were repleted with calcium alone (3% (Ca+₃) or 0.5% (Ca+_{0.5})), D₃, or 1,25(OH)₂D₃ for 14 d. They were then switched back to the original D-Ca- diet. Normal rats paired for age or weight served as Controls. All repletion protocols, except Ca+_{0.5}, normalized serum (Se) Ca²⁺, parathyroid hormone (PTH) and urinary (U) calcium concentrations but Ca+₃ rats exhibited growth retardation, hypophosphatemia and low Se D₃ metabolites compared to the D₃, CT and Controls groups. Ca+₃ also led to increased U Ca²⁺ excretion compared to D₃ or CT. Upon redepletion, Se and U calcium rapidly decreased in Ca+₃ while Se PTH increased but all animals died within 3 to 5 days. No death was observed in the Ca+_{0.5}, D₃ or CT groups. Investigation of whole body bone mineral density (BMD) and content (BMC) revealed normalization by D₃, CT and Ca+_{0.5} but not by Ca+₃ where no accretion over D-Ca- and rickets were observed. Thus, oral calcium repletion alone with a high dose of calcium does not improve BMD and BMC in D-depleted rats despite normalization of Se Ca²⁺ and PTH suggesting an impairment in bone Ca²⁺ accretion due to cellular defects most likely secondary to hypophosphatemia. It is postulated that the incapacity of the bone Ca²⁺ reservoir to provide sufficient calcium to sustain Se Ca²⁺ during calcium deprivation may be the cause of death in these animals.

INTRODUCTION

Despite adequate availability of vitamin D (D), D insufficiency is still prevalent in all segments of the population. The latter is well exemplified by reports of D insufficiency in healthy subjects consuming liberal amounts of dietary D as well as in medical inpatients (1-4). Moreover, contributing factors such as inadequate D intake, insufficient sun light exposure, renal, gastrointestinal or liver diseases as well as genetic abnormalities targeting the D endocrine system are known to lead to hypovitaminosis D resulting in perturbations of the calcium endocrine system with its associated alterations in several essential biological functions. Subnormal circulating 25-hydroxyvitamin D (25OHD) leading to a progressive decline in the circulating Ca^{2+} concentration, secondary hyperparathyroidism, blunted growth in children, muscle weakness, osteopenia, fractures, rickets and osteomalacia are among the most frequent clinical features of D insufficiency (1;5).

Chronic hypocalcemia secondary to D depletion (D-Ca-) perturbs not only extra- but also intracellular Ca^{2+} homeostasis as indicated by a significant reduction in the resting cytoplasmic Ca^{2+} concentration, the Ca^{2+} content of IP_3 -sensitive cellular pools and the expression levels of calreticulin (the major microsomal Ca^{2+} -binding protein) gene transcript and its associated protein (6;7). Similar findings were also noted *in vitro* in both long-term cultures of osteoblasts isolated from tibiae of rats born of D deficient dams, and in the ROS 17/2.8 osteoblastic cell line submitted to an *in vitro* calcium deprivation regimen (8). These observations are evoked as contributing factors in the observed perturbation of several Ca^{2+} -dependent biological functions such as insulin secretion and the hepatic regeneration process observed in D depleted hypocalcemic animals (9-12).

Despite known intra-individual variability in the calcium endocrine system related to the season of the year, age and the physiological or pathological state, no study to date has evaluated the dynamic consequences associated with cyclic nutritional changes in the D and calcium repletion state. The aim of the studies was, therefore, to investigate the effects of a repletion-redepletion protocol with either calcium alone, vitamin D₃ (D₃), or 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) in hypocalcemic D depleted rats. We now report that despite normalization of the circulating Ca²⁺ and parathyroid hormone (PTH) concentrations, abrupt calcium withdrawal in animals fed a high calcium diet led to a rapid decline in circulating Ca²⁺ and the death of all animals within a period of five days. Low calcium feeding, D₃ or 1,25(OH)₂D₃ repletion was associated with 100% survival over an observation period of more than 7 weeks. Investigation of the mechanisms associated with the death of the high calcium-fed animals revealed that the regimen is associated with significantly lower bone mineral density (BMD) than that observed in all other groups (including those fed a low calcium diet), hypophosphatemia and rickets.

MATERIALS AND METHODS

ANIMAL MODEL AND EXPERIMENTAL DESIGN

I. Vitamin D and calcium depletion phase

Investigation of chronic hypocalcemia reversal was conducted on a well characterized animal model of calcium depletion secondary to D depletion as previously described (12). Briefly, lactating Sprague-Dawley dams (Charles River Laboratories Inc., Canada, Ltd., St-Constant, Canada) were fed *ad libitum* a D deficient diet containing 0.9% calcium and 0.9% inorganic phosphate (PO_4). All pups were weaned at the age of four weeks. Male rats were then maintained on the dams' diet for an additional two weeks and were then switched to a 0.5% calcium, 0.9% PO_4 diet for an additional week in order to achieve D and calcium depletion (D-Ca-). Animals received demineralized water as drinking water. They were all 7 weeks of age when they entered the experimental repletion-redepletion protocol as illustrated in Figure 1.

II. Repletion phase

D-Ca- rats were randomly assigned to the oral calcium, D_3 or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ repletion groups as indicated below:

1. Oral calcium repletion alone

Oral calcium repletion was achieved through the addition of calcium gluconate in drinking water for a period of 14 days. Animals received a D deficient diet containing 0.5% calcium and 0.9% PO_4 . Calcium repletion was achieved at two levels:

1.1 *high calcium repletion* with drinking water containing 3% calcium gluconate
(Ca^{+3}) (12)

1.2 *low calcium repletion* with drinking water containing 0.5% calcium gluconate (Ca_{+0.5})

2. *D₃ repletion*

D₃ repletion (D₃⁺) was achieved through the intraperitoneal implantation of osmotic minipumps (Alza Corp., Palo Alto, CA) delivering constant infusion of D₃ at the dose of 6.5 nmol/d for a period of 14 days (12)

3. *1,25(OH)₂D₃ repletion*

1,25(OH)₂D₃ repletion (CT⁺) was achieved through intraperitoneal osmotic minipumps delivering constant infusion of 28 pmol/d 1,25(OH)₂D₃ for a period of 14 days (12).

At the time of minipump implantation, loading doses of D₃ (3.2 nmol) or 1,25(OH)₂D₃ (14 pmol) were injected intraperitoneally to accelerate the establishment of steady state conditions. D₃⁺ and CT⁺ -supplemented animals were given a D deficient diet similar to that of the calcium repleted rats with drinking water containing 0.5% calcium gluconate (12).

4. *Control groups*

4.1 *D-Ca-*

Litter-mate D-Ca- rats were maintained on a D deficient diet containing 0.5% calcium, 0.9% PO₄ and demineralized water throughout the study and served as the D-Ca- controls.

4.2 *Normal rats*

Experiments were also carried out in two groups of normal rats paired for either age (N_A) or weight (N_w) to D-Ca- animals since the latter exhibited evidence of growth retardation compared to all repleted groups. N_w animals were 5.5 weeks

of age. These groups received a regular rat laboratory chow diet and tap water *ad libitum*.

III. *Redepletion phase*

As illustrated in Figure 1, the repletion phase was followed by a redepletion phase where animals of all groups (except normal and D-Ca-) were abruptly switched to the initial D deficient diet containing 0.5% calcium, 0.9% PO₄ and had access to demineralized water as drinking water *ad libitum*. Osmotic minipumps were removed from D₃⁺ and CT⁺ - treated animals on day 14 of the repletion period.

In addition, a sub-group of Ca₃⁺ animals was submitted to a progressive calcium redepletion characterised by the gradual reduction of dietary and drinking water calcium over a period of 14 days.

All experimental protocols were carried out according to the standards of ethics of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the local animal ethics committee.

BIOCHEMICAL ANALYSES

Venous blood samples and 24-hour urine collection were obtained at baseline and on days 3, 7, and 14 of the repletion phase as well as during the redepletion phase as illustrated in Figure 1. Body weight was also recorded. Serum and urine specimens were stored at -70°C and -20°C respectively until biochemical and hormonal determinations were carried out. Blood ionised Ca²⁺ concentrations were determined immediately after collection using an ICA2 ionised Ca²⁺ analyser (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Routine biochemical analyses (serum inorganic phosphate, and urinary calcium, inorganic phosphate and creatinine) were determined by standard automated methods.

Serum parathyroid hormone (PTH) was assessed using a two-site immunoradiometric kit specific for the rat PTH (Alpco Diagnostics, Windham, NH, USA) while serum 25OHD₃ and 1,25(OH)₂D₃ concentrations were measured by the Immunodiagnostic Systems Ltd radioimmunoassay (Baldon, UK).

BONE DENSITOMETRY

Bone mineral content (BMC: grams) and area (cm²) of the whole body were measured by Dual X-ray absorptiometry (DXA) and bone mineral density (BMD: g/cm²) was subsequently calculated. The whole body area was used as an indicator of growth. All measurements and analyses were performed by a single operator using a Hologic QDR-4500 (Waltham, MA, USA) bone densitometer equipped with a small animal software program. Whole body measurements were performed in replicate on animals anesthetized with sodium pentobarbital (50mg/kg, ip) (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Canada). Bone densitometric measurements were done at baseline, on days 3, 7 and 14 of the repletion phase, and following three days of redepletion. The precision of the instrument was determined using whole body measurements on anesthetized D-Ca- and N_w animals repositioned five times. Coefficients of variation were found to be 3.1% and 1.7% for area, 1.3% and 1.7% for BMC and 2.4% and 0.6% for BMD in the D-Ca- and N_w groups respectively.

BONE HISTOLOGY AND TETRACYCLINE LABELLING

Tetracycline labelling was achieved through the intraperitoneal injection of tetracycline hydrochloride (20 mg/kg) (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, USA) on days 7 and 14 of the repletion phase. Ca^{+0.5} were also concurrently injected with demeclocycline (20 mg/kg) (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, USA).

At the time of euthanasia, tibiae were excised and processed without decalcification. Bone specimens were fixed in 80% ethanol for one week then dehydrated completely in gradual passages to 100% ethanol. Samples were infiltrated at 4⁰C with a mixture of 80% methyl methacrylate (JT Baker, Phillipsburgh, NJ, USA), from which hydroxyquinone was removed, 20% N-dibutylphthalate and 0.4% (weight) benzoyl (13;14). The resin was polymerized at 4⁰C using the mixture mentioned above to which 0.1% N,N-dimethylalanine was added. Tibiae were sectioned longitudinally with a polycut-E horizontal microtome (Reichert-Jung, Leica, Germany) at 5 and 10 μm thickness at intervals of about 60 μm. The 5-μm-thick sections were stained according to the Goldner's trichrome protocol (15) modified for deplastified sections placed on gelatine-coated glass slides. The 10-μm-thick sections remained unstained for observation under UV light of the fluorochrome labelling.

BONE HISTOMORPHOMETRY

Measurements were carried out on at least two non-consecutive sections containing a minimum of 40 mm of trabecular bone perimeter. Structural and static bone parameters were quantified in cancellous bone tissue at distances greater than 0.7 mm from the growth plate metaphyseal junction to exclude the primary spongiosa. Tibial growth plate width was measured from the resting zone to the vascular invasion zone on at least ten equidistant measurements performed excluding the Ranvier's grooves on each section. Histomorphometry was done with a semi-automatic image analysing system combining a microscope equipped with a camera lucida and digitizing tablet linked to a computer using the OsteoMeasure software (Osteometrics Inc., Decatur, GA, USA).

STATISTICAL ANALYSES

All data are expressed as means \pm SEM. Statistically significant differences between group means were analysed in relation to treatment or time using a one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) or the Student's "t" test with the Bonferroni's correction as indicated in the Table or Figure legends. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Survival rate was expressed as cumulative percentage and statistical significance was determined using the Log Rank test.

RESULTS

Weight and body area gain during the repletion phase

Table 1 presents the weight and whole body area gain during the repletion phase. Neither body weight nor whole body area differed among groups at the beginning of the repletion phase except for N_A which exhibited an initial body weight and body area higher than all other groups ($p < 0.03$). Supplementation protocols generally induced growth as evidence by body weight and body area gain compared to that observed in the D-Ca- group. D_3 repletion led to weight gain comparable to N_w while the influence of calcitriol was significantly less than that of D_3 ($p < 0.05$) but was comparable to the gain observed in the high-calcium group. The effect of the repletion protocol on body area gain was also less important in the CT+ group with a gain slightly less than that observed in D_3 -repleted animals after 14 days of repletion. Evaluation of the effect of calcium and D_3 repletion on body area indicated that D_3 repletion fully normalized body area gain to a level comparable to N_w whereas high-calcium feeding alone led only to partial correction. Notably, normocalcemic animals paired for age gained less weight ($p < 0.0001$) than those paired for weight. All animals survived the repletion protocol.

Survival rate during the redepletion phase

Figure 2 represents the survival rate during the redepletion phase. All D-Ca-, D_3 and CT-repleted rats as well as animals receiving low dietary Ca^{2+} survived the redepletion phase. By contrast, $Ca+3$ animals submitted to the abrupt calcium deprivation protocol died within four (50% mortality) to five days (100% mortality). Anecdotal observation of the animals revealed the presence of tremors and convulsions, most probably secondary to the rapid fall in serum Ca^{2+} concentrations. On the other hand, a paired group of animals receiving $Ca+3$ but submitted to a progressive dietary Ca^{2+} redepletion exhibited a delay in

the onset of mortality which led to a significant shift to the right in the survival curve with an observed overall survival rate of 20% (survival compared to rapid redepletion in Ca⁺³, p<0.0001).

Biochemical and hormonal parameters

Serum ionized calcium

Figure 3A illustrates the influence of either low (Ca^{+0.5}) or high-calcium (Ca⁺³) repletion on circulating Ca²⁺ concentrations in comparison to the D-Ca- group. At the end of the 7 week-depletion period, all animals were severely hypocalcemic with an average 0.81 ± 0.03 mmol/L Ca²⁺ concentration. D-Ca- animals remained hypocalcemic over both the repletion and redepletion phases with, on day 28 of redepletion, a mean Ca²⁺ concentration of 0.72 ± 0.01 mmol/L. Within 3 days of repletion, serum Ca²⁺ concentrations achieved normal values (p<0.001) in both groups receiving the high Ca²⁺ repletion protocol whereas the values observed in animals receiving Ca^{+0.5} significantly increased compared to the D-Ca- status but remained significantly lower than those observed in the Ca⁺³ groups between days 3 and 7 (p<0.006). Ca²⁺ concentrations, however, reached near normal values by day 14 of repletion (1.17 ± 0.03 mmol/L), a value, however, still lower than the Ca⁺³ groups (1.26 ± 0.04 mmol/L). Upon sudden calcium deprivation, Ca⁺³ animals experienced an abrupt decline in serum Ca²⁺ with, after 3 days of redepletion, a mean value of 0.97 ± 0.05 mmol/L in the 50% surviving animals. However, progressive calcium deprivation, when compared to the abrupt calcium deprivation protocol, significantly shifted to the right the serum Ca²⁺ concentration-time curve during the first 3 days of redepletion (p<0.003). Serum Ca²⁺ concentrations then dropped below D-Ca- values after 2 weeks of redepletion and then increased and stabilized at values similar to those observed in D depleted animals. By contrast, in animals repleted with Ca^{+0.5}, the

abrupt calcium withdrawal led to a progressive decrease in circulating Ca^{2+} concentrations which did not returned to the concentrations observed in D-Ca- during the first 28 days of redepletion ($p < 0.001$) but only after five weeks of redepletion. N_W and N_A had identical serum Ca^{2+} concentrations of 1.29 ± 0.01 mmol/L.

Figure 3B illustrates the effects of D_3 or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ repletion on serum Ca^{2+} concentrations after 14 days of repletion and throughout the redepletion period. Serum Ca^{2+} concentrations of the D_3 and CT-repleted animals reached concentrations similar to those observed in the Ca_{+3} groups following 3 days of repletion and significantly higher than both the D-Ca- ($p < 0.001$) and $\text{Ca}_{+0.5}$ ($p < 0.001$) groups. During the redepletion period, serum Ca^{2+} concentrations did not returned to the initial D-Ca- values in either the D_3+ or CT+ groups ($p < 0.001$) but remained normal even after 7 weeks (1.26 ± 0.02 and 1.22 ± 0.02 mmol/L in D_3+ and CT+ respectively) of calcium deprivation.

Serum inorganic phosphate

As illustrated in Figure 4, serum phosphate concentrations were found to be significantly influenced by the repletion protocols. Serum phosphate concentrations were elevated in D-Ca- and remained stable throughout the observation period (Fig. 4A). However, high Ca^{2+} feeding led to a significant and steep decrease in serum phosphate concentrations to values averaging between 1.46 ± 0.18 mmol/L and 1.72 ± 0.13 mmol/L compared to an averaged value of 3.57 ± 0.11 mmol/L in D-Ca- animals and 2.82 ± 0.05 in normal animals ($p < 0.05$). Upon abrupt calcium redepletion, circulating phosphate concentrations increased significantly towards baseline values ($p < 0.001$) while Ca_{+3} animals submitted to a progressive redepletion exhibited a significant shift to the right in the time-phosphate concentration curve with a much slower returned to D-Ca- values compared to that observed in the abrupt calcium deprivation protocol ($p < 0.05$). Serum phosphate concentrations slightly decreased compared to the initial D-Ca- status in animals

receiving $\text{Ca}^{+0.5}$ ($p < 0.05$) but remained significantly higher than those observed in the Ca^{+3} groups during the repletion phase ($p < 0.001$). Moreover, serum phosphate concentrations in $\text{Ca}^{+0.5}$ remained within the normal range throughout the repletion and redepletion periods.

CT administration led to a rapid fall in serum phosphate concentrations which fell from a value of 3.40 ± 0.1 to 2.46 ± 0.07 mmol/L after three days of CT exposure ($p < 0.001$) (Fig. 4B). Values then increased to 3.01 ± 0.11 mmol/L but fell again during the redepletion phase to a mean value slightly below the normal range. D_3 repletion affected serum phosphate concentrations in a manner similar to that of CT during the first three days of repletion but values remained relatively unchanged after 14 days of repletion. At the end of the repletion protocol both groups exhibited similar serum phosphate concentrations which were significantly lower than those observed in D-depleted animals ($p < 0.001$) but significantly higher than in animals receiving the high calcium diet ($p < 0.0001$). However, contrary to calcium-fed animals, serum phosphate concentrations significantly fell in both groups during the redepletion phase ($p < 0.009$) to attain values below the normal range after 7 weeks of redepletion (1.72 ± 0.1 and 1.86 ± 0.07 mmol/L in D_3^{+} and CT^{+} respectively).

Vitamin D metabolites

Serum 25OHD_3 and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentrations are presented in Figure 5. Circulating 25OHD remained below 15 nmol/L throughout the observation period in D-Ca-, and repletion protocols with Ca^{+3} , $\text{Ca}^{+0.5}$ and CT^{+} did not influence circulating 25OHD_3 concentrations (Fig. 5A and C). D_3 repletion led to a significant increase in 25OHD_3 concentrations with, after three and seven days of repletion values of 18.6 ± 1.01 and 21.6 ± 3.4 nmol/L respectively ($p < 0.001$ compared to all other groups) and remained at that level for the remaining period of repletion (Fig 5A). After one week of redepletion, values were not found to be significantly decreased compared to those observed at the end of the repletion period. However, serum 25OHD concentrations decreased thereafter to reach

10.5±0.9 nmol/L after seven weeks of redepletion ($p < 0.003$ compared to values observed at the end of the repletion period).

Serum 1,25(OH)₂D₃ concentrations were significantly decreased in D-depleted animals compared to values observed in normal rats (149±9 pmol/L, $p < 0.001$) (Fig. 5D). Repletion with either D₃ or 1,25(OH)₂D₃ significantly increased serum 1,25(OH)₂D₃ concentrations to values significantly higher than those observed in normal animals (Fig. 5B). Following 1,25(OH)₂D₃ withdrawal, serum 1,25(OH)₂D₃ concentrations declined in the CT-repleted group to values below the pre-repletion concentrations within three days of redepletion. By contrast, serum 1,25(OH)₂D₃ concentrations progressively increased in D₃-repleted animals to reach 421±64 pmol/L after 14 days of redepletion and decreased thereafter toward values observed in CT-repleted animals. Values remained unchanged throughout the study in the Ca^{+0.5} and Ca⁺³ groups.

Parathyroid hormone

Figure 6 illustrates the intact serum PTH concentrations in D-Ca- and all repleted groups. Normalization of hypocalcemia by either high Ca²⁺ feeding, D₃ or 1,25(OH)₂D₃ rapidly decreased serum PTH concentrations to values similar (D₃⁺ and CT⁺) or close (Ca⁺³) to those observed in normal rats. In contrast, PTH concentrations remained unaffected by low-Ca²⁺ repletion with values remaining similar to those observed in D-depleted animals and significantly different from all other repleted groups ($p < 0.001$). Upon calcium withdrawal, serum PTH concentrations rapidly increased in the Ca⁺³ group to reach values similar to those observed in the pre-repletion period within three days of redepletion. CT repleted animals exhibited an earlier increase in PTH concentrations than D₃ supplemented group and values were found to have returned close to the original D depleted concentrations on day 49 after CT withdrawal. In D₃ repleted animals, serum PTH

concentrations remained in the normal range during the early redepletion period but increased progressively thereafter to reach 524 ± 92 pg/mL after 49 days of redepletion.

Growth hormone

As illustrated in Figure 7, circulating GH concentrations, were significantly decreased by the calcium and D depletion state with values in D-Ca- averaging 17% of those observed in normal rats ($p < 0.0001$) (Fig. 7B). All repletion protocols significantly increased GH concentrations ($p < 0.01$) to reach peak concentrations after seven days of repletion (Fig. 7A). The highest increases were observed in rank order in D₃, CT+, Ca⁺₃, and Ca⁺_{0.5}-repleted animals respectively. No changes were observed in D-depleted animals. After 14 days of repletion, GH concentrations had decreased in the D₃+, CT+, and Ca⁺₃ groups to values similar to those observed in normal rats but still remained significantly elevated compared to those of the pre-supplementation period ($p < 0.05$). However, GH concentrations returned to pre-repletion values by day 14 of repletion in Ca⁺_{0.5}.

Urinary calcium and phosphate excretion

Figure 8 presents the urinary calcium/creatinine and phosphate/creatinine ratios excretion observed during the repletion protocol and following three days of redepletion. Urinary calcium and phosphate concentrations remained unaffected in D-depleted animals throughout the observation period. All repletion protocols led to increased urinary calcium excretion at day 7 except in animals receiving the low calcium diet where the urinary calcium/creatinine ratio remained unchanged throughout the supplementation period. In addition, contrary to all other groups, animals receiving Ca⁺₃ exhibited a very significant increase in urinary calcium excretion following two weeks of repletion ($p < 0.005$) with a calcium/creatinine ratio of 9.1 ± 1.2 compared to 3.1 ± 0.47 ($p < 0.001$) and 1.6 ± 0.2 ($p < 0.001$) in CT and D₃ supplemented animals. Calcium excretion had fell in all groups to the D-Ca- level by three days of redepletion.

The urinary phosphate/creatinine ratio significantly decreased in all repleted groups ($p < 0.001$) with the lowest values being achieved in animals receiving the high calcium repletion regimen. Urinary phosphate excretion promptly returned to pre-repletion values three days following the beginning of the redepletion protocol except in the $Ca^{+0.5}$ group where urinary phosphate remained lower than that of all other groups ($p < 0.003$).

Bone parameters

Bone densitometry

The whole body increase in BMC in relation to baseline values is presented in Figure 9 while the shaded area presents the gain ($\text{mean} \pm 2 \text{ S.D.}$) observed in N_w and N_a . As illustrated, over the 14 days of observations, D-Ca- animals exhibited a slight gain in BMC which was found to be in the lowest portion of the normal-control curve. In addition, despite an early gain, animals receiving the Ca^{+3} diet did not gain any BMC over that observed in the D-Ca- group by day 14 of the repletion period. By contrast, animals receiving the low-calcium diet, D_3 or $1,25(OH)_2D_3$ all significantly increased their BMC compared to the D-Ca- depleted group ($p < 0.001$). BMC increments in the CT^+ and D_3 groups were significantly higher than the normal-control group throughout the repletion period ($p < 0.03$) while that of the $Ca^{+0.5}$ was found to be at the 50th percentile in the middle of the normal-control group by days 7 and 14 of the repletion protocol. BMD (inset) exhibited a pattern similar to that of BMC.

Histological evaluation and histomorphometry

i) Structural parameters

As indicated in Table 2, significant between-group differences were found in bone volume (BV/TV), trabecular number (Tb.N) and trabecular separation (Tb.Sp). Bone

volume was markedly increased in Ca^{+0.5} compared to all groups. In addition, BV/TV was significantly reduced in Ca⁺³ when compared to D-Ca-. In Ca^{+0.5} and Ca⁺³, Tb.N followed a pattern similar to that of BV/TV while Tb.Sp was found to exhibit a reciprocal pattern but no significant between-group difference was found in the latter parameter. Trabecular thickness (Tb.Th), however, was similar in all groups. No significant difference was found in BV/TV, Tb.N, Tb.Sp. or Tb.Th between D₃⁺, CT⁺ and N_w.

ii) Formation and resorption parameters

Significant between group differences were found in several formation parameters. As shown in Table 2, osteoid volume (OV/BV) and osteoid surfaces (OS/BS) were markedly higher in D-Ca- compared to D₃⁺ and N_w. Osteoid volume and surfaces in Ca^{+0.5}, Ca⁺³ and CT⁺ were significantly higher than those observed in D₃⁺. In Ca^{+0.5}, these parameters were also found to be significantly higher than in N_w. OS/BS were significantly reduced in D₃⁺ when compared to N_w. Osteoid thickness (O.Th) was significantly increased in D-Ca- compared to Ca⁺³, D₃⁺, CT⁺ and N_w. In Ca^{+0.5}, O.Th was found to be significantly higher when compared to D₃⁺, CT⁺ and N_w. Percentage of cancellous bone surfaces covered with plump osteoblasts (Ob.S/BS) was significantly higher in D-Ca- than in all other groups. Higher values in Ob.S/BS were observed in Ca^{+0.5} compared to D₃⁺ and N_w. OV/BV, OS/BS, O.Th and Ob.S/BS in Ca⁺³ and CT⁺ were not significantly different from those observed in N_w. Mineral apposition rate (MAR) was found to be significantly higher in D₃⁺ when compared to CT⁺. MAR could not, however, be determined in Ca-D-, Ca^{+0.5} and Ca⁺³ due to the absence of well defined double tetracycline labelling (see Figure 10).

Percentage of eroded surfaces (ES/BS) were significantly lowered in CT⁺ compared to Ca^{+0.5}, D₃⁺ and N_w while ES/BS in D-Ca- and Ca⁺³ were not found to be different from that of other groups. The number of osteoclasts observed on mineralized bone surface

(N.Oc/Md.Pm) was found to be significantly different among groups but individual contrasts revealed no specific significance between individual groups.

iii) Tibial growth plate

To further depict the alterations observed at the bone organ level, proximal tibial growth plates were examined following three days of redepletion. As illustrated in Figure 10 and Table 2, a significant widening of the growth plate was observed in Ca+₃. This was mainly attributed to an increase of the hypertrophic zone. In all other groups, growth plate thickness and morphology were similar to that observed in N_w.

DISCUSSION

The present study is the first to investigate the effect of a repletion-redepletion protocol in hypocalcemic vitamin D depleted rat. The study was based on numerous observations indicating that the vitamin D and/or calcium requirements vary depending on the age, physio- or pathophysiological status, life style, exposure to ultraviolet light, drug therapy in addition to many other variables. Moreover, it has now been well documented that several calcium supplementation protocols are instituted without taking into account the reciprocal needs for phosphorus in order to achieve and maintain an optimum bone health (16). Our study, therefore, aimed at investigating the hormonal and bone consequences of cyclic variations in the calcium and vitamin D status taking the rat as experimental paradigm.

The D depletion model used was based on the diet of Guroff *et al.* (17) and was associated with growth retardation, low circulating D metabolites, severe hypocalcemia, above normal serum phosphate concentrations and secondary hyperparathyroidism. At the bone level, the animals developed a severe impairment in MAR as indicated by the absence of any tetracycline labelling and were shown to exhibit hyperosteoidosis. As expected, the bone defect led to osteomalacia but not to rickets as clearly illustrated by the absence of a widening of the epiphysal growth plate.

Our data indicate that the D endocrine system was fully normalized when either D₃ or 1,25(OH)₂D₃ was administered in physiological concentrations. Indeed, during the repletion phase, the animals rapidly normalized their serum calcium, phosphate and PTH concentrations, decreased their urinary phosphate excretion but exhibited a significant increase in urinary calcium excretion, most particularly during the early repletion phase. In addition, both groups responded with a significant increase in circulating 1,25(OH)₂D₃

concentrations which was found to be, in both groups, above the normal values for the rat. By contrast, circulating 25OHD₃ remained unchanged in calcitriol-treated animals while they significantly increased in D₃-treated rats but remained below normal values, most likely due to the high turnover of the vitamin as evidenced by the high 1,25(OH)₂D₃ concentrations achieved in response to the correction of the D-depleted state and the rapid decline in circulating 25OHD upon D₃ withdrawal. In fact, the early increase in circulating 1,25(OH)₂D₃ in D-Ca- animals when exposed to D₃ is a normal and expected endocrine response due to the concomitant high level of the renal 25OHD-1 α -hydroxylase, hypocalcemia and secondary hyperparathyroidism. In D₃ and 1,25(OH)₂D₃-repleted animals, bone mineral accretion was found to be very efficient, reaching cumulative increases in BMC and BMD significantly above those observed in normal rats. In addition, no death was observed in these animals during the redepletion phase suggesting efficient osteoclastic bone resorption of adequately mineralized bone which contributed to control the decline in serum Ca²⁺ concentrations and hence protecting the animals from lethal hypocalcemia. The most striking observation of the study was, however, that the animals receiving the high calcium diet did not survive the redepletion protocol. Indeed, these animals all died upon abrupt withdrawal of the calcium supplement. The data thus indicate that D-Ca- rats ingesting a high dietary calcium regimen (3% calcium gluconate in drinking water and a diet containing 0.5% calcium and 0.9% phosphorus) could not adapt to a phase of calcium deprivation and died within three to five days following the abrupt withdrawal of the calcium-supplemented drinking water. In all probability, the immediate cause of death was an important neuromuscular instability, most particularly at the cardiac level, secondary to the rapid fall in circulating Ca²⁺ concentrations. This observation was highly unexpected and, in order to eliminate uncontrolled variables and death by other causes, the protocol was repeated twice with identical results. In an attempt to prevent the death related

to the rapid decline in circulating Ca^{2+} , a progressive calcium deprivation regimen in Ca^{+3} animals was instituted. The regimen also led to a very high mortality rate but was associated with a significant shift to the right in the time-to-mortality curve with, after 14 days of repletion, a survival rate of only 20%. Surviving animals were found to have, after 14 days of repletion, severe hypocalcemia (0.66 ± 0.03 mmol/L) which finally increased to a level similar to those observed in the D-Ca- group. In contrast, rats receiving lower calcium supplementation, D_3 or $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ adjusted to the repletion phase and returned to or near the initial hypocalcemic state except for animals repleted with D_3 and CT who remained normocalcemic for at least a period of 7 weeks after the initiation of the repletion phase although, at that point, serum PTH concentrations were found to have reached near pre-repletion values.

Investigation of the pathophysiological causes leading to the death of the high calcium-fed animals included hypotheses related to the adaptation of the calcium endocrine system to calcium feeding, the status of the intracellular calcium concentrations, and the efficiency of the diet to insure an optimum bone growth and bone mineral accretion. Data clearly illustrate that animals repleted with a high calcium diet alone achieved a complete or near complete correction of the circulating Ca^{2+} and PTH concentrations but exhibited severe hypophosphatemia in the presence of low phosphate excretion and significantly above normal urinary calcium excretion, most particularly after two weeks of high calcium feeding. These observations indicate a normal endocrine response to calcium feeding as well as a normal response to calcium deprivation as indicated by the return of all parameters studied towards pre-repletion values. They, however, clearly illustrate the deleterious effects of high dietary calcium feeding on phosphate homeostasis in these animals

A previous study by Mailhot *et al.* (6) has already indicated that, a calcium repletion protocol similar to that used in the present study, fully normalized basal cytosolic calcium concentrations, the levels calcium-binding proteins such as calreticulin, the functional size of the IP₃-responsive pools as well as the response to IP₃-linked agonists. Moreover, using freshly isolated hepatocytes as representative calcium-responsive cells, a recent observation in our laboratory (unpublished data) has indicated that intracellular Ca²⁺ is not perturbed for up to two weeks after progressive calcium withdrawal in high calcium-fed animals. Furthermore, at the cellular level, it has also been shown that high calcium feeding alone normalizes insulin secretion and glucose tolerance in hypocalcemic D depleted rats (9). Collectively, these observations strongly suggest that the failure to adapt to a low calcium environment is most likely not related to perturbations in intracellular calcium concentrations.

Most interestingly, high calcium feeding did not significantly increase BMC and BMD over that observed in hypocalcemic D-depleted animals. Investigation of the tibial growth plate also revealed the presence of severe rickets in the Ca₃ group. Animals receiving a low calcium supplementation, by contrast, increased their serum Ca²⁺ only to the lower limit of normal values by 2 weeks of repletion but achieved normo-phosphatemia and normo-phosphaturia, and remained normo-calcemic. Surprisingly, BMC and BMD significantly increased in these animals and was furthermore found to be in the upper range or above of the normal curve based on BMC and BMD increases observed in animals paired for age and weight. In addition, no rickets was observed and they all survived the redepletion phase of the protocol. By contrast, as mentioned above, even a progressive withdrawal of dietary calcium in high calcium-fed animals led to the death of most animals strongly suggesting a severe failure to adapt to a low dietary calcium environment following high calcium feeding alone. The low bone mineral accretion, rickets and

impaired osteoid mineralization as illustrated by the very diffuse tetracycline labeling suggest a deficiency in available calcium in the bone reservoir. This observation could explain the rapid fall in serum Ca^{2+} which was observed in these animals upon abrupt calcium withdrawal despite a normal PTH response and a normal renal response to calcium deprivation as evidenced by a rapid decline in urinary calcium and an increase in urinary phosphorus. In addition, the falling serum Ca^{2+} in association with the rising serum phosphate concentrations most likely created an optimal Ca/P ratio which led to a state of increased calcium demand for crystal growth in the matrix surrounding the large hypertrophic chondrocytes zone thus compounding the effects induced by the withdrawal of dietary calcium. It is, therefore, postulated that the bone hypertrophied growth-plate acted as a Ca^{2+} sink and contributed to induced a rapid fall in serum Ca^{2+} hence leading to concentrations which were unable to sustain the Ca^{2+} -dependant vital functions and rapidly led to the death of the animals.

The data indicating an adequate BMC and BMD responses in animals receiving only a very modest calcium supplement without D indicate that D is not needed for a normal bone mineral accretion in the rat and support data already obtained in $\text{VDR}^{-/-}$ and $25\text{OHD-}1\alpha\text{-hydroxylase}^{-/-}$ mice (18-20). The animals on the low calcium repleted diet, however, despite low circulating Ca^{2+} concentrations exhibited normal circulating phosphate concentrations. This observation clearly points out the importance of the balance between calcium and phosphate for the normalization of mineral ion homeostasis as already observed by Heaney *et al.* (21). Indeed, these authors showed that in the rat, the importance of phosphate was 3 to 6 times higher than that of calcium for bone mineral metabolism indicating a substantially greater effect of varying phosphate intake than of varying calcium intake with phosphate deficiency leading to retardation of bone development, rickets and soft tissue growth as observed in the high calcium fed animals. Indeed, the

hypophosphatemic state and rickets observed in the high calcium-fed animals most likely resulted from the high dietary Ca/P ratio rather than from high calcium feeding alone. At the cellular level, it has, moreover, been shown that the high calcium-induced enlargement of the growth plate derives from failure of hypertrophic chondrocytes to undergo apoptosis as adequate phosphate has now been proposed as an important factor for the initiation of the apoptotic process (22). Interestingly, recent unpublished data obtained in our laboratory indicate that addition of 1.5% phosphorus to the high calcium diet prevented the development of rickets during the repletion period as well as the death of the animals upon calcium withdrawal.

Thus our studies indicate that the rat adapts to a chronic state of D and calcium depletion and, when fed a diet containing 0.9% phosphorus-0.5% calcium, can survive without developing rickets although the regimen clearly leads to severe hypocalcemia and the development of osteomalacia. By contrast, low calcium feeding alone leads to increased bone volume and increased BMC and BMD despite the presence of a still somewhat impaired bone mineralization process and to only a partial correction of the hyperosteoidosis. These observations indicate that a slight calcium supplement alone is sufficient to promote bone growth and near normal bone mineral accretion. High calcium feeding alone, however, without adjustment in dietary phosphate is highly detrimental to bone metabolism as clearly evidenced by the development of rickets, the failure to increase BMD, and the death of the animals upon calcium withdrawal.

REFERENCES

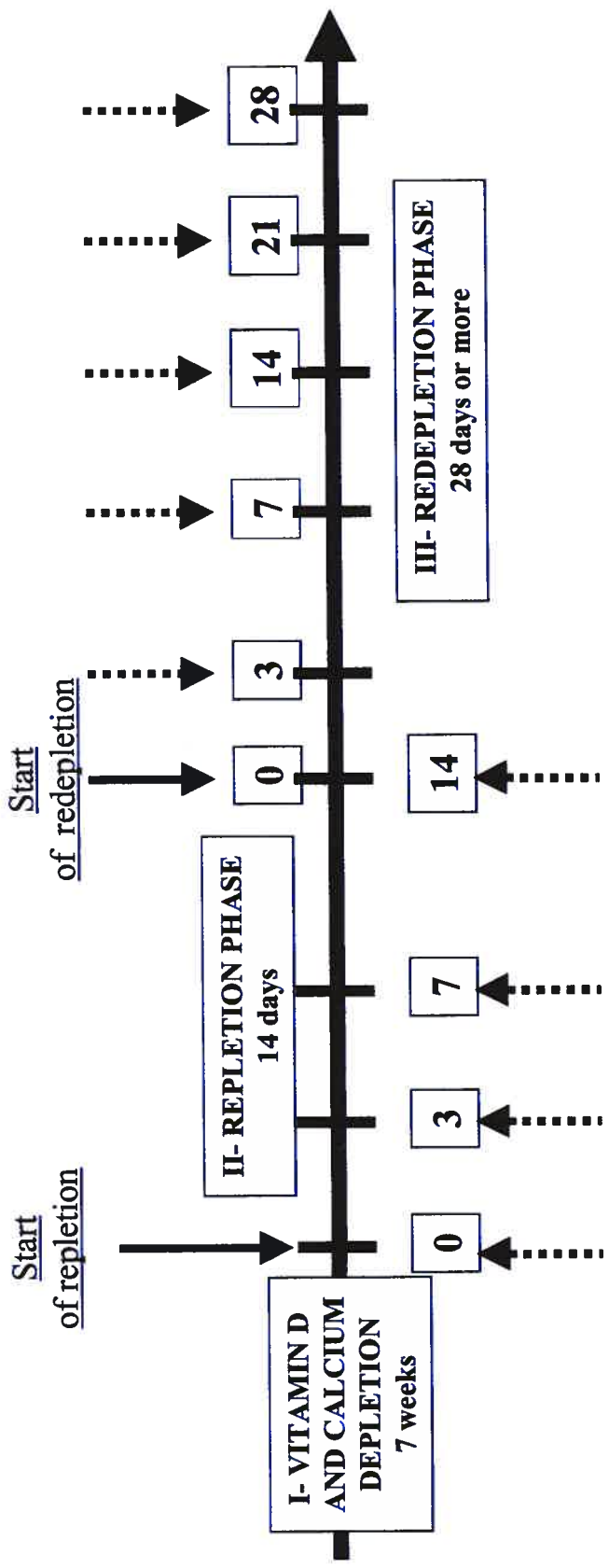
1. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001; 22:477-501.
2. El-Haijj Fuleihan G, Nabulsi M, Choucair M, Salamoun M, Hajj Shahine C, Kizirian A et al. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics* 2001; 107:1-7.
3. Vieth R, Cole DE, Hawker GA, Trang HM, Rubin LA. Wintertime vitamin D insufficiency is common in young Canadian women, and their vitamin D intake does not prevent it. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55:1091-1097.
4. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998; 338:777-783.
5. Boland R. Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr Rev* 1986; 7:434-438.
6. Mailhot G, Petit JL, Demers C, Gascon-Barré M. Influence of the *in vivo* calcium status on cellular calcium homeostasis and the level of the calcium binding protein calreticulin in rat hepatocytes. *Endocrinology* 2000; 141:891-900.
7. Gascon-Barré M, Petit JL, Éthier C, Bilodeau S. Hypocalcemia modifies the intracellular calcium response to the α_1 -adrenergic agent phenylephrine in rat hepatocytes. *Cell Calcium* 1997; 22:343-356.
8. Mailhot G, Petit JL, Demers C, Gascon-Barré M. Kinetics of calcium supplementation in calcium deficiency: *in vitro* and *in vivo* studies. Eleventh Workshop on Vitamin D, 196. 2000.
9. Beaulieu C, Kestekian R, Havrankova J, Gascon-Barré M. Calcium is essential in normalizing intolerance to glucose that accompanies vitamin D depletion *in vivo*. *Diabetes* 1993; 42:35-43.
10. Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, KH1060. *Endocrinology* 1995; 136:866-872.
11. Bilodeau M, Provencher S, Néron S, Haddad P, Vallières S, Gascon-Barré M. Hypocalcemia decreases the early and late responses to epidermal growth factor in rat hepatocytes. *Hepatology* 1995; 21:1576-1584.
12. Éthier C, Goupil D, Demers C, Hendy GN, Gascon-Barré M. Hypocalcemia, regardless of the vitamin D status, decreases epidermal growth factor receptor density and autophosphorylation in rat livers. *Endocrinology* 1993; 133:780-792.
13. Erben RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improvement method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1997; 40:307-313.

14. Theuns HM, Bekker H, Fokkenrood H, Offerman E. Methyl-methacrylate embedding of undecalcified rat bone and simultaneous staining for alkaline and tartrate resistant acid phosphatase. *Bone* 1993; 14:545-550.
15. Goldner J. A modification of the MAsson Trichrome Technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol* 1938; 14:247-249.
16. Heaney RP, Nordin BEC. Calcium effects on phosphorus absorption: implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition* 21, 239-244. 2002.
17. Guroff G, DeLuca HF, Steenbock H. Citrate and action of vitamin D on calcium and phosphorus metabolism. *Am J Physiol* 1963; 204:833-836.
18. Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R et al. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 1998; 139:4391-4396.
19. Dardenne O, Prud'Homme J, Hacking A, Glorieux FH, St-Arnaud R. Rescue of the pseudo-vitamin D deficiency rickets phenotype of CYP27B1-deficient mice by treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Biochemical, histomorphometric, and biomechanical analyses. *J Bone Mineral Res* 2003; 18:637-643.
20. Dardenne O, Prud'Homme J, Hacking SA, Glorieux FH, St-Arnaud R. Correction of the abnormal mineral ion homeostasis with a high-calcium, high-phosphorus, high-lactose diet rescues the PDDR phenotype of mice deficient for the 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase (CYP27B1). *Bone* 2003; 32:332-340.
21. Shapiro R, Heaney RP. Co-dependence of calcium and phosphorus for growth and bone development under conditions of varying deficiency. *Bone* 2003; 32:532-540.
22. Donohue MM, Demay MB. Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology* 2002; 143:3691-3694.

TABLE 1
WEIGHT AND BODY AREA GAIN DURING THE REPLETION PHASE

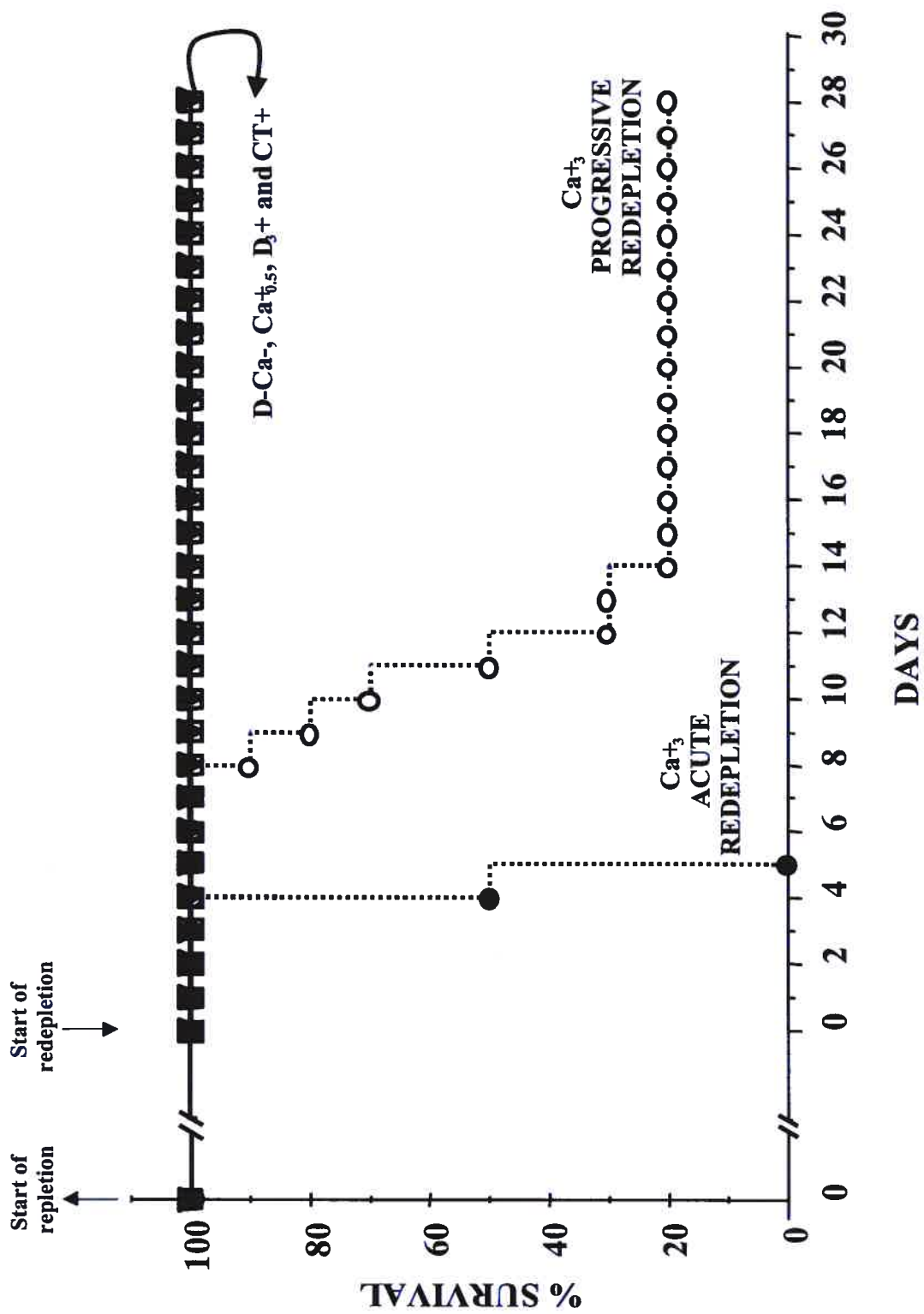
	TREATMENT GROUPS							P
	D-Ca- (n=9)	Ca ^{+0.5} (n=6)	Ca ⁺³ (n=10)	D ₃ ⁺ (n=8)	CT ⁺ (n=9)	N _w (n=8)	N _a (n=5)	
<u>TOTAL BODY WEIGHT (g)</u>								
Initial, day 0	167±9	154±7	173±7	161±14	150±4	158±2	224±6 ^a	<0.004
Final, day 14	203±14	242±8	239±9	256±16 ^e	213±10	270±4 ^d	306±4 ^b	<0.001
Weight gain during repletion (%)	21±4 ^g	58±3 ^f	38±3	62±5 ^f	42±3	71±2 ^f	37±3	<0.001
<u>WHOLE BODY AREA (cm²)</u>								
Initial, day 0	39.5±1.9	39.0±1.2	42.0±1.4	39.4±2.5	37.2±1.1	39.3±0.6	50.3±0.8 ^a	<0.001
Final, day 14	44.6±1.9	49.5±0.9	50.8±0.6	52.8±2.0	48.1±1.4	52.4±0.8	60.5±1.0 ^d	<0.001
Area gain during repletion (%)	13.0±2.0 ^c	27.0±2.0	22.0±3.0 ^h	36.0±4.0	30.0±3.0	33.0±3	20.0±4.0	<0.001

Data on days 0 and 14 are expressed as Means ± SEM. Weight and area gain are expressed as the percent increase on day 14 for each animal ± SEM over the value on day 0. All animals, except N_w were 7 weeks of age on day 0. Statistically significant differences between group means were evaluated by one-way ANOVA and individual between-group contrasts were determined using the Tukey test. ^a p<0.03 vs all other groups; ^b p<0.02 vs D-Ca-, Ca^{+0.5}, Ca⁺³ and CT⁺; ^c p<0.009 vs D₃⁺, CT⁺ and N_w; ^d p<0.05 vs D-Ca- and CT⁺; ^e p<0.02 vs D-Ca-; ^f p<0.05 vs D-Ca-, Ca⁺³, CT⁺ and N_a; ^g p<0.008 vs Ca⁺³ and CT⁺; ^h p<0.04 vs D₃⁺.



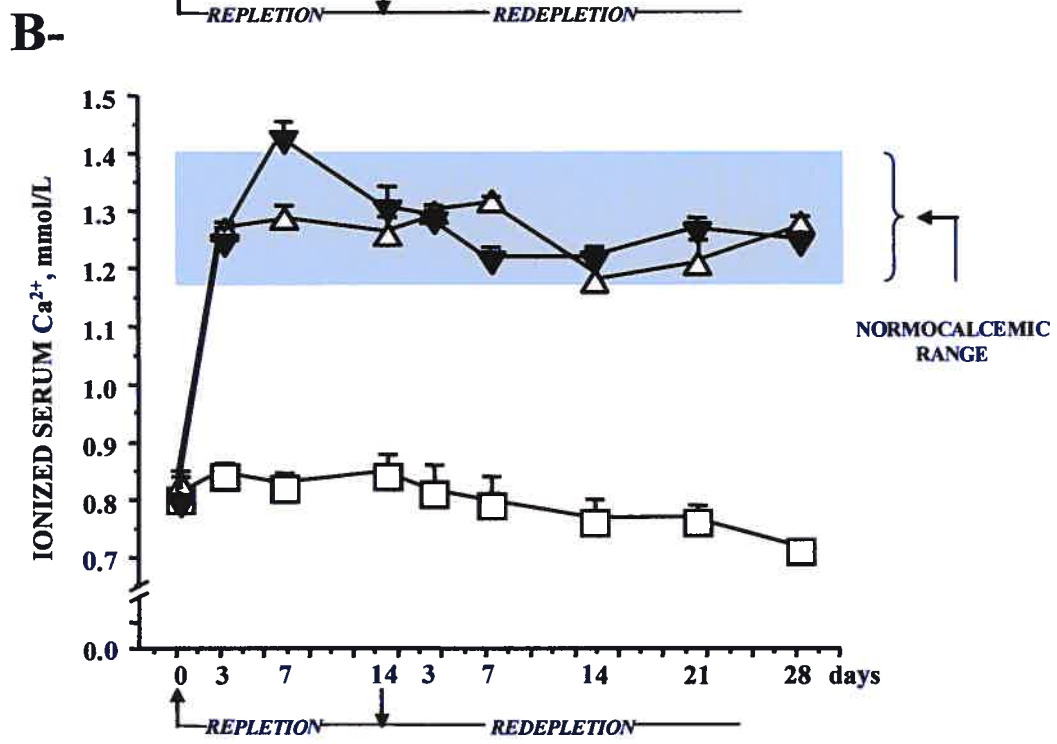
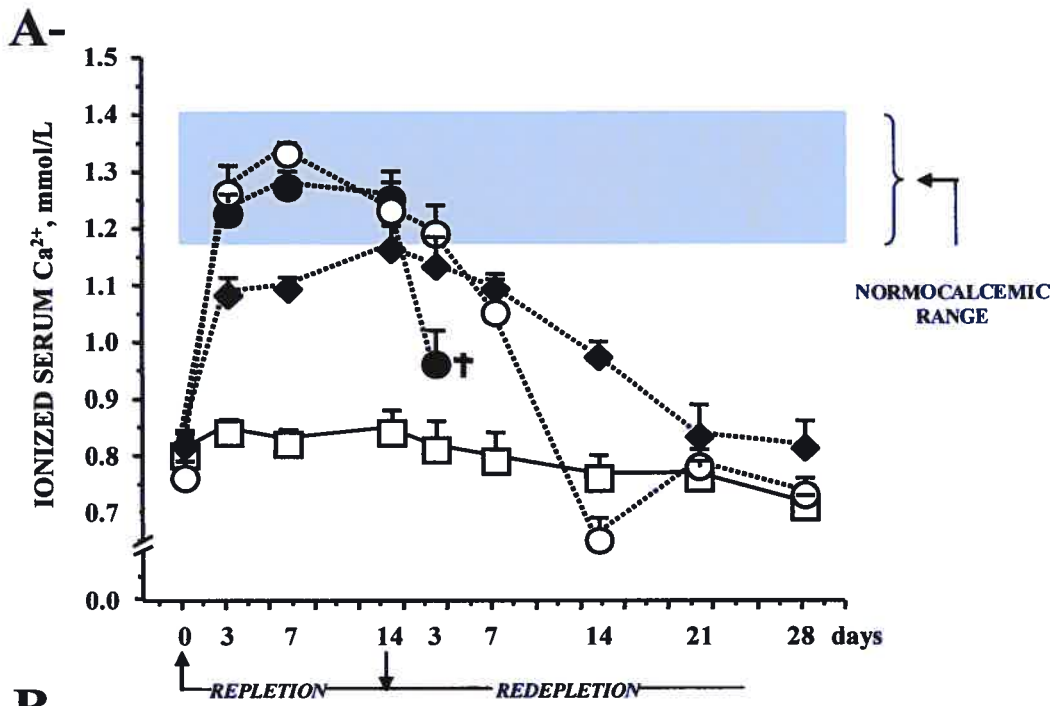
LEGEND TO FIGURE 1

Schematic illustration of the experimental design. I. Vitamin D and calcium depletion indicates a period of 7 weeks of depletion starting during the first week of life. II. Repletion phase indicates a period of repletion with oral calcium alone, D₃ or CT for 14 days. III. Redepletion phase indicates the withdrawal of oral calcium, D₃ or CT and a return to the original D deficient diet containing 0.5% calcium and 0.9% phosphate for at least 28 days.



LEGEND TO FIGURE 2

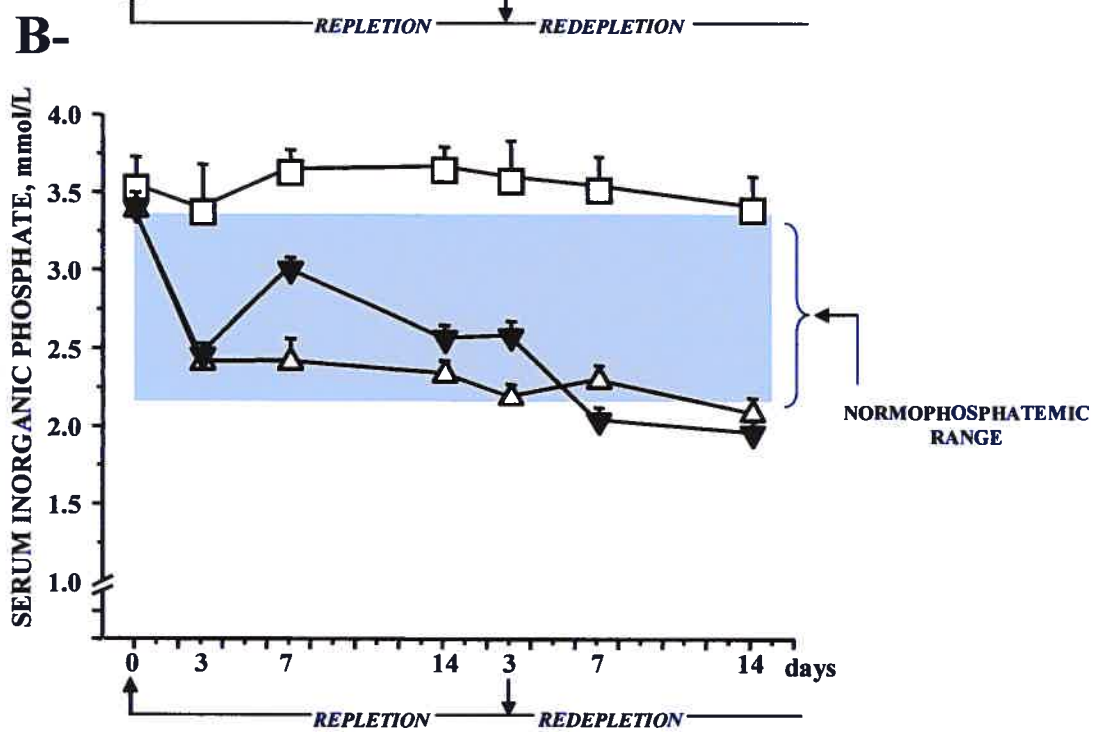
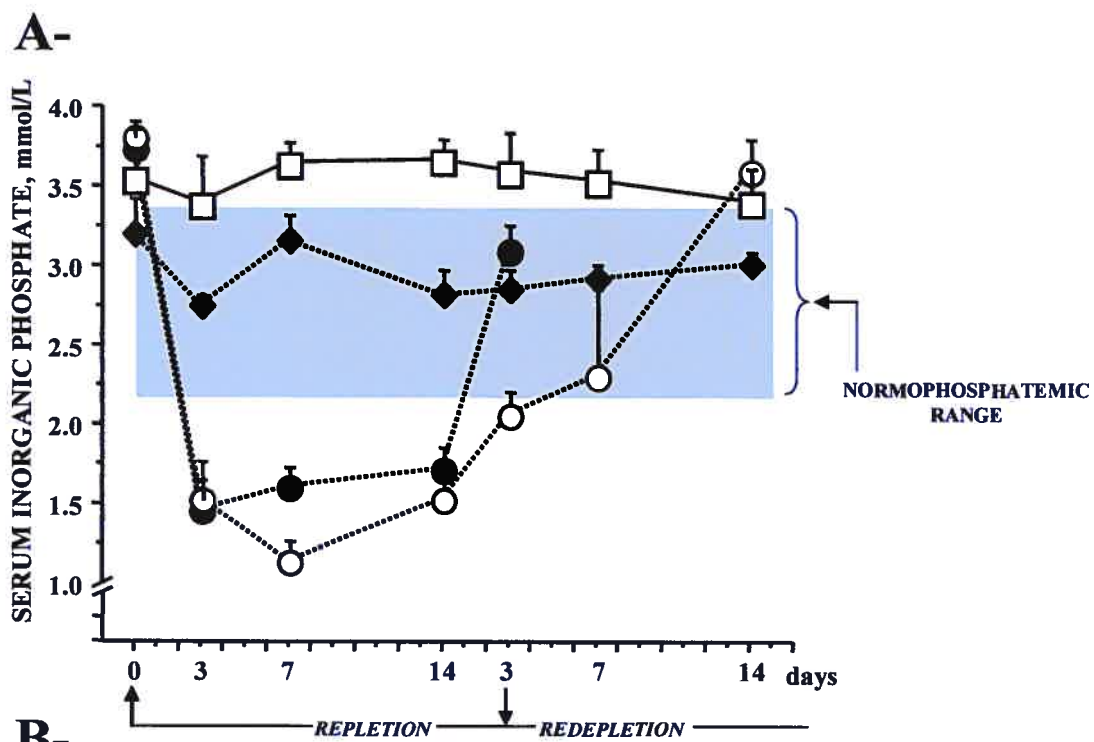
Survival rate during the redepletion phase following a period of 14 days of repletion with oral calcium, D₃ or CT repletion. On day 0 of the redepletion protocol, animals were switched to the initial D-Ca- diet. Data present the survival rate (%) during the repletion and redepletion phase. □—□ D-Ca-, n= 9, ●---● Ca₊₃ (acute redepletion), n=9, ○---○ Ca₊₃ (progressive redepletion), n=10, ◆---◆ Ca_{+0.5}, n=6, Δ—Δ D₃+, n=8, ▼—▼CT+, n=9. All repleted groups except Ca₊₃ survived the redepletion phase. Statistically significant differences between group survival rate were evaluated using the Log Rank test (Ca₊₃: acute vs progressive redepletion , p<0.0001; Ca₊₃ acute redepletion vs all other survivor groups, p<0.0001; Ca₊₃ progressive redepletion vs all other survivor groups, p<0.0001).



LEGEND TO FIGURE 3

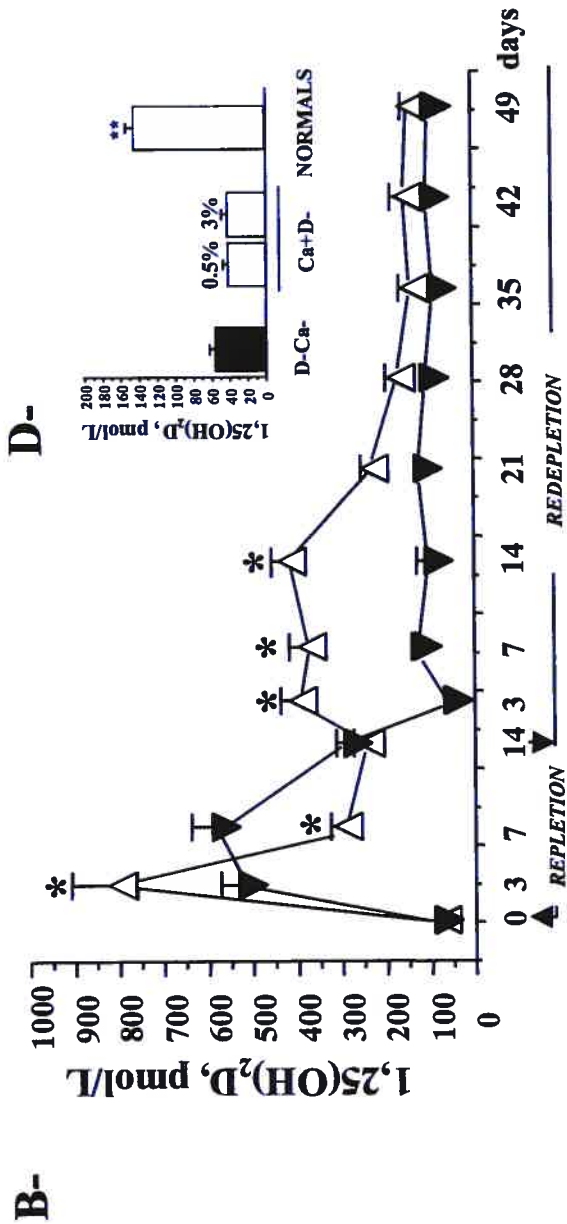
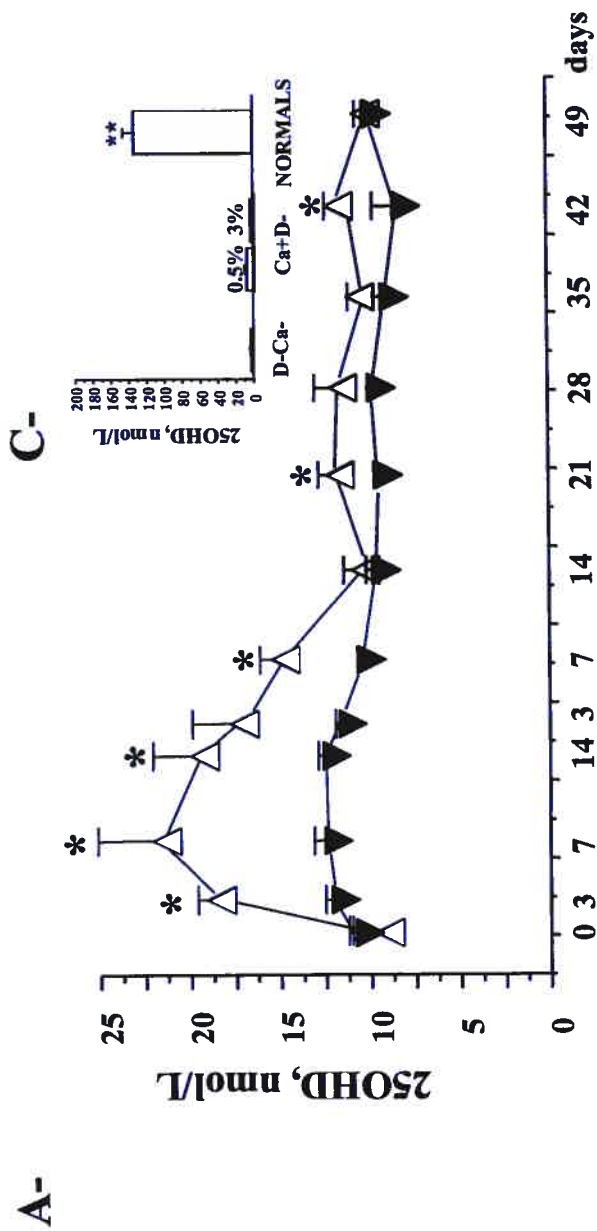
Serum Ca^{2+} concentrations during the repletion and redepletion phases. Measurements were performed on days 0, 3, 7 and 14 of repletion and following 3, 7, 14, 21 or 28. \uparrow beginning of the repletion, \downarrow beginning of the redepletion. The shaded area represents the normocalcemic zone calculated as Mean \pm 2 SD obtained on 64 values taken throughout the study in 8 N_w and 5 N_a animals. Data are presented as Means \pm SEM. **A.** Influence of oral calcium repletion and redepletion; D-Ca- $\square-\square$, n = 8-9, Ca $_{+3}$ $\bullet-\bullet$ (acute redepletion), n = 10, Ca $_{+3}$ $\circ-\circ$ (progressive redepletion), n = 2-7, Ca $_{+0.5}$ $\blacklozenge-\blacklozenge$, n = 3-6. **B.** Influence of D_3 or CT repletion and redepletion. D-Ca- $\square-\square$, n = 8-9, D_3+ $\Delta-\Delta$, n = 5-10, CT+ $\blacktriangledown-\blacktriangledown$, n = 8-13. All protocols were carried simultaneously and values obtained in D-Ca- are presented in panels A and B to illustrate the effect of the repletion and redepletion protocols in relation to the depleted state. Statistically significant differences between groups were determined in relation to time or treatment using a two-way ANOVA. At the end of the depletion period (day 0), no statistically significant differences between group means were observed. ANOVA were performed separately on both the repletion (days 3 to 14) and the redepletion phase (days 3 to 28). Days 3 to 14, effect of group, $p < 0.001$ (**A**) and $p < 0.001$ and interaction $p < 0.001$ (**B**). Days 3 to 28 of redepletion (**A**), effect of group, $p < 0.001$, effect of time, $p < 0.001$ and interaction $p < 0.001$ and (**B**), effect of group, $p < 0.001$, effect of time, $p < 0.001$ and interaction $p < 0.01$.

\dagger :deceased.



LEGEND TO FIGURE 4

Serum inorganic phosphate concentrations during the repletion and redepletion periods. Measurements were performed on days 0, 3, 7 and 14 of repletion and following 3, 7 and 14 days of redepletion. \uparrow beginning of the repletion, \downarrow beginning of the redepletion. The shaded area represents the normophosphatemic zone calculated as Mean \pm 2 SD obtained on 45 values taken throughout the study in 4 N_w and 5 N_a animals. Data are presented as Means \pm SEM. **A.** Influence of oral calcium repletion and redepletion; D-Ca- \square — \square , n = 5, Ca₊₃ \bullet — \bullet (acute redepletion), n = 6-10, Ca₊₃ \circ — \circ (progressive redepletion), n = 2-9, Ca_{+0.5} \blacklozenge — \blacklozenge , n = 3-6. **B.** Influence of D₃ or CT repletion and redepletion. D-Ca- \square — \square , n = 8-9, D₃+ \triangle — \triangle , n = 5-10, CT+ \blacktriangledown — \blacktriangledown , n = 8-13. All protocols were carried simultaneously and values obtained in D-Ca- are presented in panels A and B to illustrate the effect of the repletion and redepletion protocols in relation to the depleted state. Statistically significant differences between groups were determined in relation to time or treatment using a two-way ANOVA. At the end of the depletion period (day 0), no statistically significant differences between group means were observed. ANOVA were performed separately on both the repletion (days 3 to 14) and the redepletion phase (days 3 to 14). Days 3 to 14, (**A**) effect of group, p<0.001 and (**B**) effect of group, p<0.001 and time, p<0.05. Days 3 to 14 of redepletion, (**A**) effect of group, p<0.001, effect of time, p<0.001 and interaction p<0.001 and (**B**) effect of group, p<0.001, effect of time, p<0.009, significant interaction p<0.01.



A-

B-

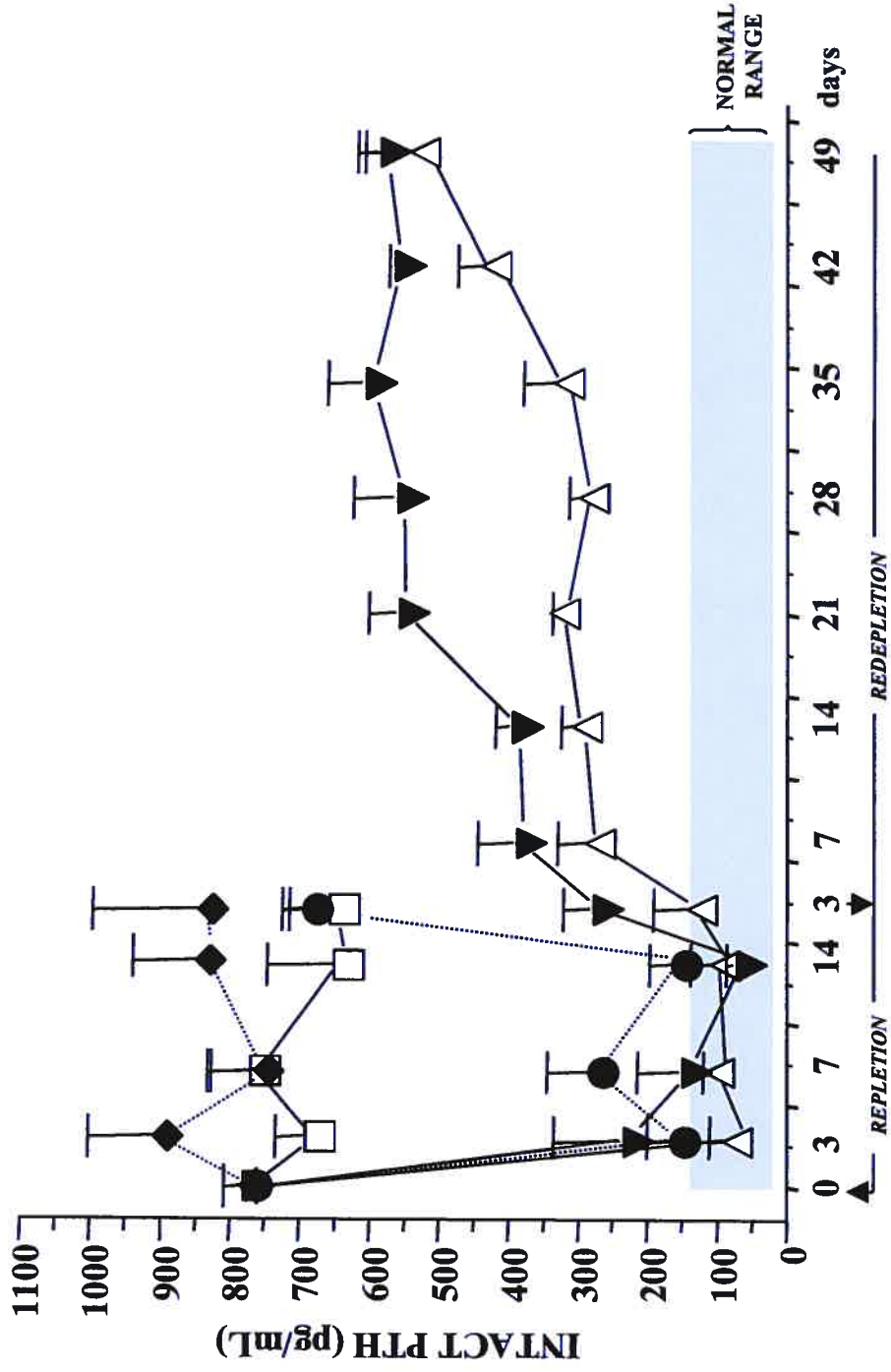
C-

D-

LEGEND TO FIGURE 5

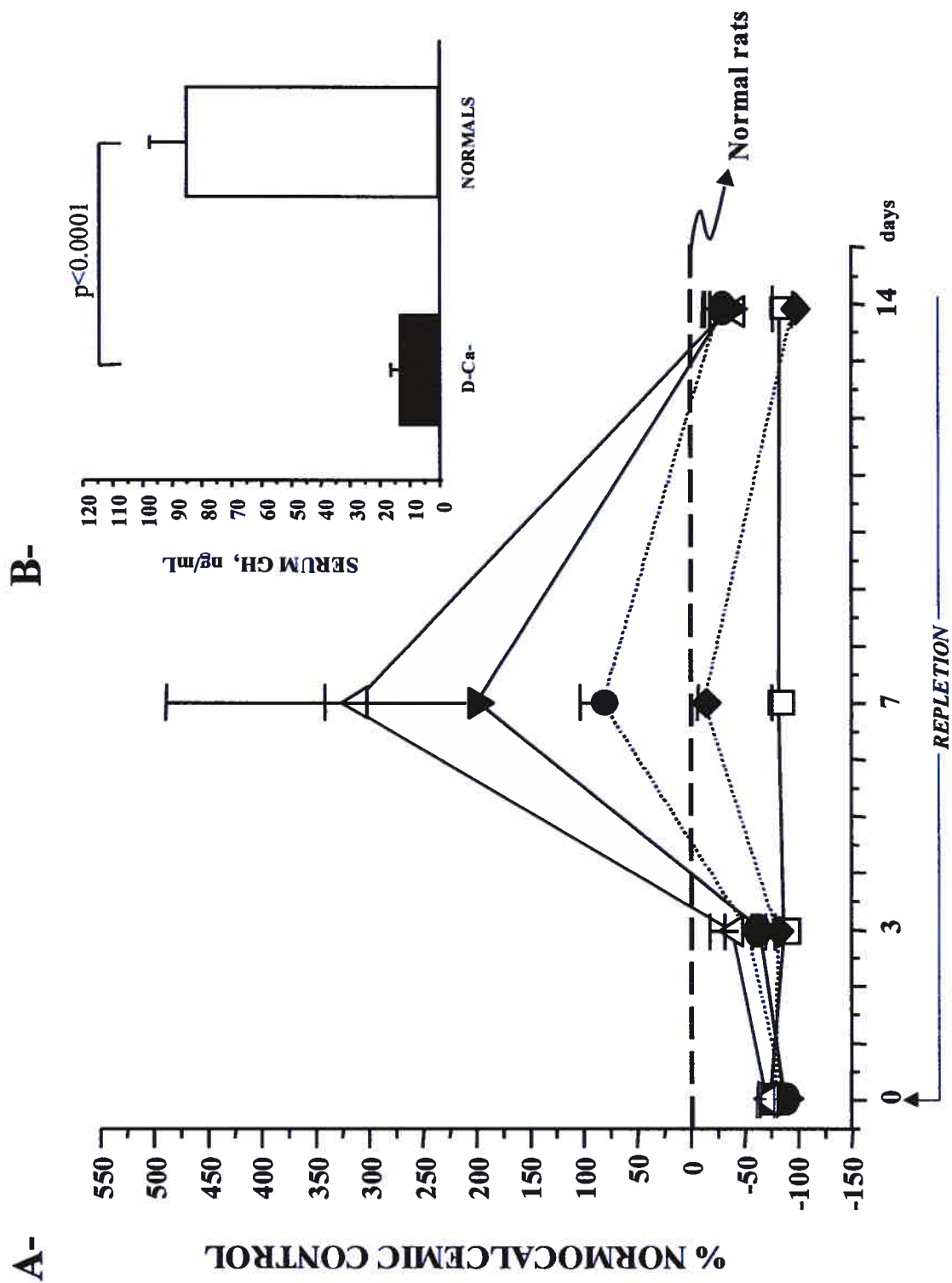
Serum 25OHD and 1,25(OH)₂D concentrations during the repletion and redepletion phases.

A and C. 25OHD concentrations in D₃+, Δ—Δ, n = 5-10 rats/time point and CT+, ▼—▼, n = 2-5 rats/time-point (**A**) and in D-Ca-, Ca⁺_{0.5}, Ca⁺₃, N_w and N_a (**C**). Data are represented as Means ± SEM. D-Ca-, n = 20; Ca⁺_{0.5}, n = 4; Ca⁺₃, n = 15; N_w n = 10 and N_a = 8. Statistically significant differences between group means were evaluated using a one or two-way ANOVA and between-group differences were analyzed using the Tukey test. (**A**) * p<0.05 vs CT+ (**C**) main effect, p<0.001, ** p<0.001 vs all other groups. **B. and D.** 1,25(OH)₂D concentrations in D₃+, Δ—Δ, n = 4-10 rats/time-point, and CT+, ▼—▼, n = 3-10 rats/time-point (**B**) and in D-Ca-, n = 11, Ca⁺_{0.5}, n = 3; Ca⁺₃, n = 13; N_w, n = 8 and N_a, n = 11 (**D**). Data are represented as Means ± SEM. Statistically significant differences between group means were evaluated using a one-way ANOVA (main effect, p<0.001) except for comparing 1,25(OH)₂D₃ concentrations between D₃ and CT+ groups for which, a two-way ANOVA was used. At the end of the depletion period (day 0), no statistically significant differences between group means were observed. ANOVA were performed separately on both the repletion (days 3 to 14) and the redepletion phase (days 3 to 14). Days 3 to 14, effect of time, p<0.001 and significant interaction, p<0.001. Days 3 to 49 of redepletion, effect of group, p<0.001, effect of time, p<0.001 and significant interaction, p<0.001. Individual contrasts were determined with the Tukey test. *p<0.05 vs CT+, **p<0.001 vs all other groups.



LEGEND TO FIGURE 6

Serum parathyroid hormone concentrations during the repletion and redepletion phases. Measurements were performed on days 0, 3, 7 and 14 of repletion and following 3 days of redepletion in D-Ca-, Ca^{+0.5}, and Ca⁺³. Data in D₃⁺ and CT⁺ were obtained for up to 7 weeks of redepletion. ↑ beginning of the repletion, ↓ beginning of the redepletion. The shaded area represents the normocalcemic zone calculated a Mean ± 2 SD obtained on 29 values taken throughout the study in 7 N_w and 7 N_a animals. Each data point represented the mean ± SEM. D-Ca- □—□, n = 3-5, Ca⁺³ ●---●, n = 3-6, Ca^{+0.5} ◆---◆, n = 3-6, D₃⁺ Δ—Δ, n = 6-7, CT⁺ ▼—▼, n = 4-8. At the end of the depletion period (day 0), no statistically significant differences between group means were observed. For repletion phase (days 3 to 14), statistically significant differences between groups were determined in relation to time or treatment using a two-way ANOVA (effect of group, p<0.001). One-way ANOVA was performed to compare group means on day 3 of redepletion (main effect, p<0.001). Data for D₃⁺ and CT⁺ animals were compared during the redepletion phase using a two-way ANOVA (effect of group, p<0.001; effect of time, p<0.001).

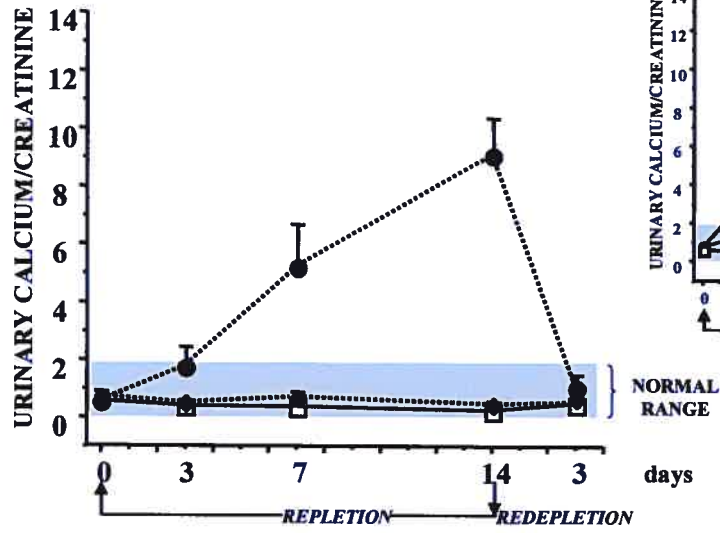


LEGEND TO FIGURE 7

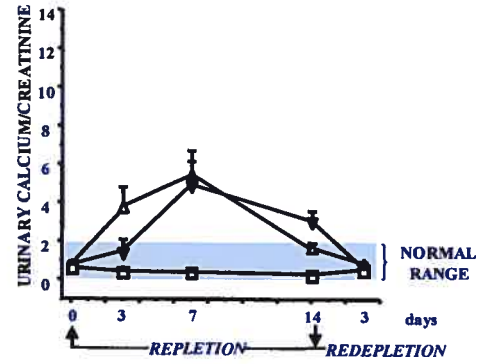
Serum growth hormone concentrations during the repletion phase. **A.** Changes in growth hormone secretion in D-Ca- \square — \square , n = 5 or following a 14 day repletion with Ca⁺³ \bullet --- \bullet , n = 3-5 Ca^{+0.5} \blacklozenge --- \blacklozenge , n = 3-4 D₃+ Δ — Δ , n = 2-5 or CT+ \blacktriangledown — \blacktriangledown , n = 2-5. Data are expressed in relation to the mean concentration observed in normal rats. Statistically significant differences between group means were analyzed at each time point using one-way ANOVA with a Bonferroni correction (days 0 and 3, p = NS; main effect on days 7 and 14, p<0.01).

B. Growth hormone concentrations (Means \pm SEM) in D-Ca- (n=17 values obtained from 7 rats) and in normal rats (n= 33 values obtained from 11 N_w and 11 N_a rats). Statistically significant differences between group means were evaluated by the Student's "t" test.

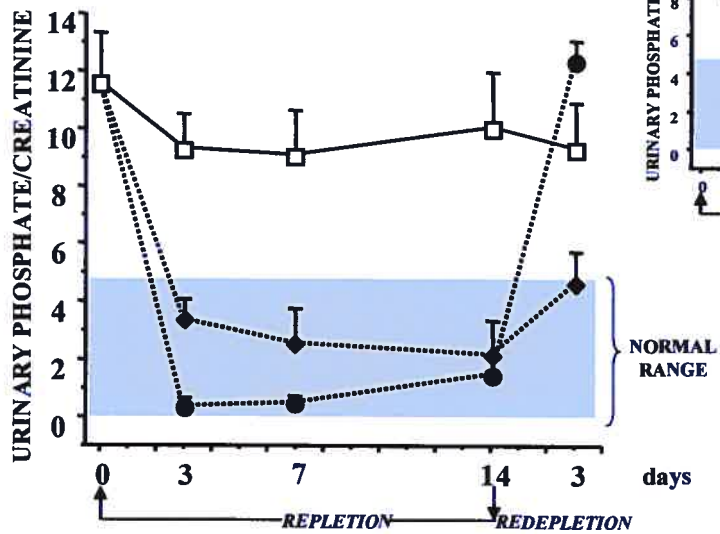
A-



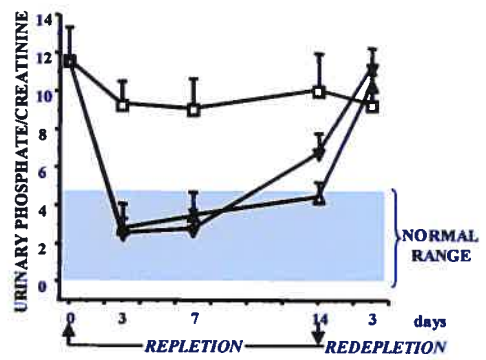
C-



B-

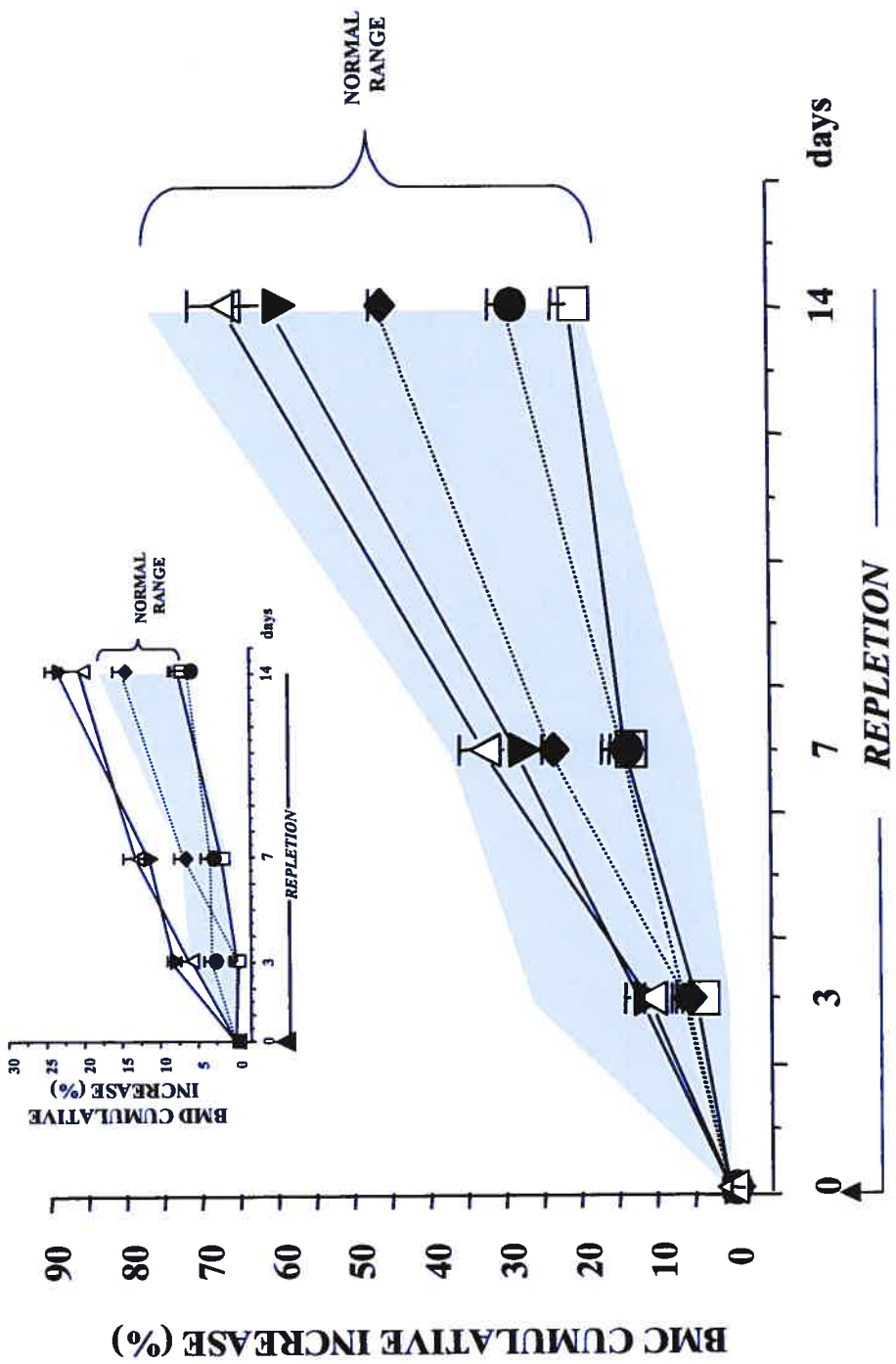


D-



LEGEND TO FIGURE 8

Effect of dietary calcium supplementation (A and B) or vitamin D or CT repletion (C and D) on urinary calcium and phosphate excretion during the repletion and redepletion phases. ↑ beginning of the repletion, ↓ beginning of the redepletion. The shaded area represents the normocalcemic zone calculated a Mean \pm 2 S.D. obtained on 27 values taken throughout the study in 3-6 N_a animals. Data are presented as Means \pm SEM. D-Ca- □—□, n = 6, Ca⁺³ ●---●, n = 3-6, Ca^{+0.5} ◆---◆, n = 4-7, D₃⁺ Δ—Δ, n = 5-8, CT⁺ ▼—▼, n = 7-9. At the end of the depletion period (day 0), no statistically significant differences between group means were observed. For repletion phase (days 3 to 14), statistically significant differences between groups were determined in relation to time or treatment using a two-way ANOVA. One-way ANOVA was performed to compare group means on day 3 of redepletion. Days 3 to 14, (A and C) effect of group, $p < 0.001$, effect of time, $p < 0.001$ and significant interaction, $p < 0.001$, and (B and D) effect of group, $p < 0.001$, effect of time, $p < 0.001$, interaction, $p < 0.001$. On day 3 of redepletion, (A, C and D) NS and (B) main effect, $p < 0.005$.



LEGEND TO FIGURE 9

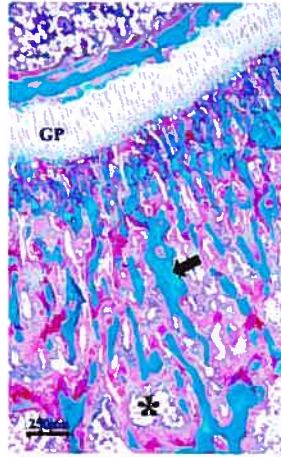
Influence of the repletion protocols on BMC and BMD (inset) gain over baseline values (day 0) at the whole body level. Densitometric measurements were performed on days 0, 3, 7 and 14 of repletion. The shaded area represents the normal zone calculated as Mean \pm 2 S.D. obtained on N_w ($n = 8$) and N_a ($n = 5$). Data are presented as Means \pm SEM cumulative percent increase over baseline values. D-Ca- \square — \square , $n = 9$, Ca^{+3} \bullet — \bullet , $n = 10$, $Ca^{+0.5}$ \blacklozenge — \blacklozenge , $n = 6$, D_3^+ Δ — Δ , $n = 8$, CT+ \blacktriangledown — \blacktriangledown , $n = 9$. Statistically significant differences between groups were determined in relation to time or treatment using a two-way ANOVA. At the end of the depletion period (day 0), no statistically significant differences between group means were observed. Days 3 to 14, effect of group, $p < 0.001$, effect of time, $p < 0.001$.

TABLE 2
HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS

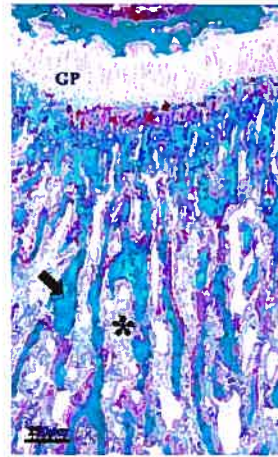
	STRUCTURAL PARAMETERS				FORMATION AND RESORPTION PARAMETERS							GP
	BV/TV %	Tb.N /mm	Tb.Sp µm	Tb.Th µm	OV/BV %	OS/BS %	O.Th µm	Ob.S/BS %	MAR µm/d	ES/BS %	N.Oc/Md.Pm /mm	µM
D-Ca- (n=4)	12.56 ±2.10	3.44 ±0.45	269 ±39	36.1 ±1.8	18.77 ^{e,g} ±3.63	30.39 ^{e,g} ±4.17	10.38 ^{d,e,f,g} ±1.01	14.67 ^a ±1.00	ND	22.24 ±3.27	3.02 ±0.96	298 ±12
Ca ⁺ _{0.5} (n=6)	21.92 ^a ±1.44	5.78 ^a ±0.35	138 ^{e,f,g} ±11	38.1 ±1.6	5.54 ^{e,g} ±1.00	14.20 ^{e,g} ±1.45	8.29 ^{e,f,g} ±0.65	8.88 ^{e,f} ±1.25	ND	27.92 ±0.77	4.37 ±0.61	393 ±45
Ca ⁺ ₃ (n=4)	5.59 ^b ±0.53	1.48 ^b ±0.08	641 ^{b,c,f,g} ±35	37.6 ±2.3	4.55 ^e ±2.03	11.13 ^e ±3.05	5.97 ±1.02	5.00 ±0.91	ND	24.18 ±1.13	4.12 ±1.00	898 ^a ±145
D ₃ + (n=6)	7.90 ±0.88	2.13 ±0.23	457 ±44	37.2 ±1.0	0.25 ±0.16	0.70 ^g ±0.22	4.2 ±0.81	3.08 ±0.7	2.70 ^f 0.08±	26.81 ±1.8	2.87 ±0.18	364 ±16
CT+ (n=5)	8.09 ±1.68	2.39 ±0.48	438 ±71	33.6 ±0.8	3.31 ^e ±0.84	13.41 ^e ±3.15	4.15 ±0.25	5.71 ±1.12	1.87 ±0.22	17.92 ^{e,e,g} ±1.99	5.06 ±0.46	393 ±19
N _w (n=4)	9.88 ±0.31	2.59 ±0.10	350 ±14	38.3 ±1.3	0.51 ±0.15	3.38 ±0.72	2.68 ±0.21	1.64 ±0.50	2.38 ±0.15	26.99 ±1.38	5.98 ±0.39	378 ±25
ANOVA	<0.001	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.01	<0.05*	<0.001

Data are expressed as mean ±SEM for all treatment groups. Significant differences between groups means were evaluated by one-way ANOVA and individual between-group contrasts determined using the Tukey test (*:Kruskal-Wallis non-parametric test was used only for N.Oc/Md.Pm). At least, p<0.05 vs ^a: all groups; ^b:D-Ca; ^c: Ca⁺_{0.5}; ^d: Ca⁺₃; ^e: D₃+; ^f:CT+; ^gN_w; ND: not determined; NS: not significant.

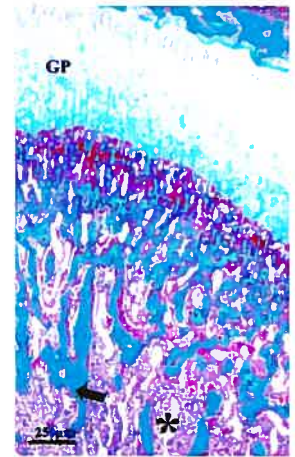
D-Ca-



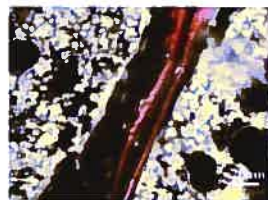
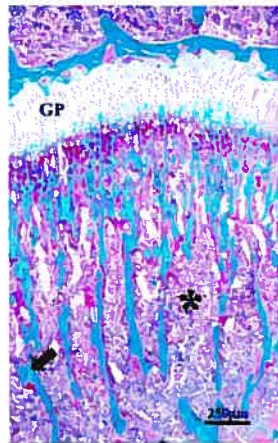
Ca+_{0.5}



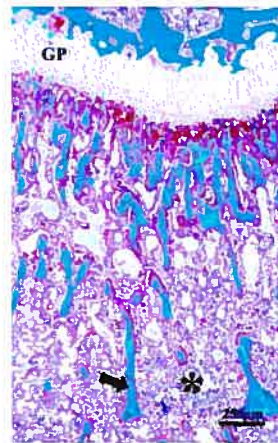
Ca+₃



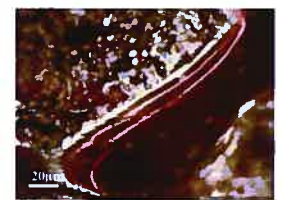
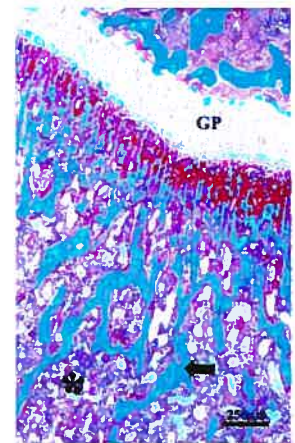
D₃+



CT+



N_w



LEGEND TO FIGURE 10

Bone histology of proximal tibiae. Specimens were obtained on day 3 of the redepletion period. Upper panel: Goldner's trichrome stained section. Green: mineralized bone; red: osteoid; GP: growth plate; *: bone marrow. Lower panel: Tetracycline or demeclocycline (orange) and calcein (green). Note that only $Ca^{+0.5}$ animals were injected with calcein. Animals were injected ip with tetracycline or demeclocycline (20 mg/kg) on day 7 and 14 of the repletion phase.

RESULTATS COMPLÉMENTAIRES

I- Variation du phosphore alimentaire en présence d'une supplémentation de 3% de calcium

1. Hypothèse spécifique

Les études entreprises reposent sur l'hypothèse selon laquelle l'accroissement du contenu alimentaire de phosphore en présence d'une supplémentation de 3% de calcium alimentaire permettra de normaliser la phosphatémie et de prévenir le rachitisme observés suite à la prise d'un apport calcique élevé par l'animal hypocalcémique chronique et carencé en D.

2. But

Vérifier, chez le rat déplété en D, les conséquences d'une normalisation de la phosphatémie en présence d'une supplémentation de 3% de calcium alimentaire, sur l'os et les paramètres sériques du métabolisme phosphocalcique.

3. Prémisses

Suite à l'observation illustrant l'influence prépondérante de l'hypophosphatémie dans la genèse des perturbations osseuses observées chez les animaux supplémentés avec un apport élevé en calcium alimentaire, nous avons combiné la supplémentation en calcium à une supplémentation en phosphore alimentaire. L'importance du phosphore dans l'homéostasie des ostéoblastes et des chondrocytes de la plaque de croissance, et tout particulièrement dans l'induction du phénomène d'apoptose a été rapporté par d'autres (161;162;233).

4. Matériel et Méthodes

Le protocole expérimental adopté est identique à celui décrit à l'article 2 à l'exception de l'ajout de deux groupes expérimentaux supplémentaires. Un groupe d'animaux a été réplété avec une alimentation renfermant 3% de gluconate de calcium dans l'eau de boisson et une diète dont la teneur en calcium et en phosphore était de 0.9% et 3% de phosphore respectivement (ratio alimentaire Ca:P ; 1.26:1) (groupe P+₃). Ce ratio s'apparente au ratio

Ca:P de la diète non-rachitogénique des animaux D-Ca- (ratio 1,11:1) mais son contenu en calcium et phosphore demeure plus élevé. Le deuxième groupe a été réplété avec une alimentation contenant 3% gluconate de calcium dans l'eau de boisson et une diète dont la teneur en calcium et en phosphore était de 0.9% et 1.5% respectivement (ratio alimentaire Ca:P ; 2,3:1) (groupe P_{+1.5}). Ce ratio s'apparente au ratio Ca:P (2,25:1) retrouvé dans la diète des animaux Ca_{+0.5} qui n'induit pas de rachitisme et qui permet la survie des animaux pendant la phase de redéplétion calcique. Les paramètres sanguins (calcium, phosphore et PTH), anthropométrique (poids) et densitométriques (surface et CMO) ont été déterminés tel que décrit à l'article 2. La phase de réplétion calcique a été d'une durée de 14 jours alors que la phase de redéplétion calcique a été fixée à 28 jours.

5. Résultats

Les résultats obtenus chez les animaux P₊₃ et P_{+1.5} sont présentés de façon comparative aux résultats obtenus chez les animaux D-Ca-, Ca₊₃ et Ca_{+0.5} et présentés à l'article 2.

a) Survie

La figure 2.11 illustre la survie des animaux qui ont reçu une supplémentation de phosphore durant la période de réplétion et qui ont par la suite été soumis à une phase de redéplétion calcique. Le suivi des animaux sur un période de 1 mois de redéplétion, révèle que tous les animaux qui ont reçu l'un ou l'autre mode de supplémentation en phosphore ont survécu à la phase de redéplétion ($p < 0.001$ vs Ca₊₃).

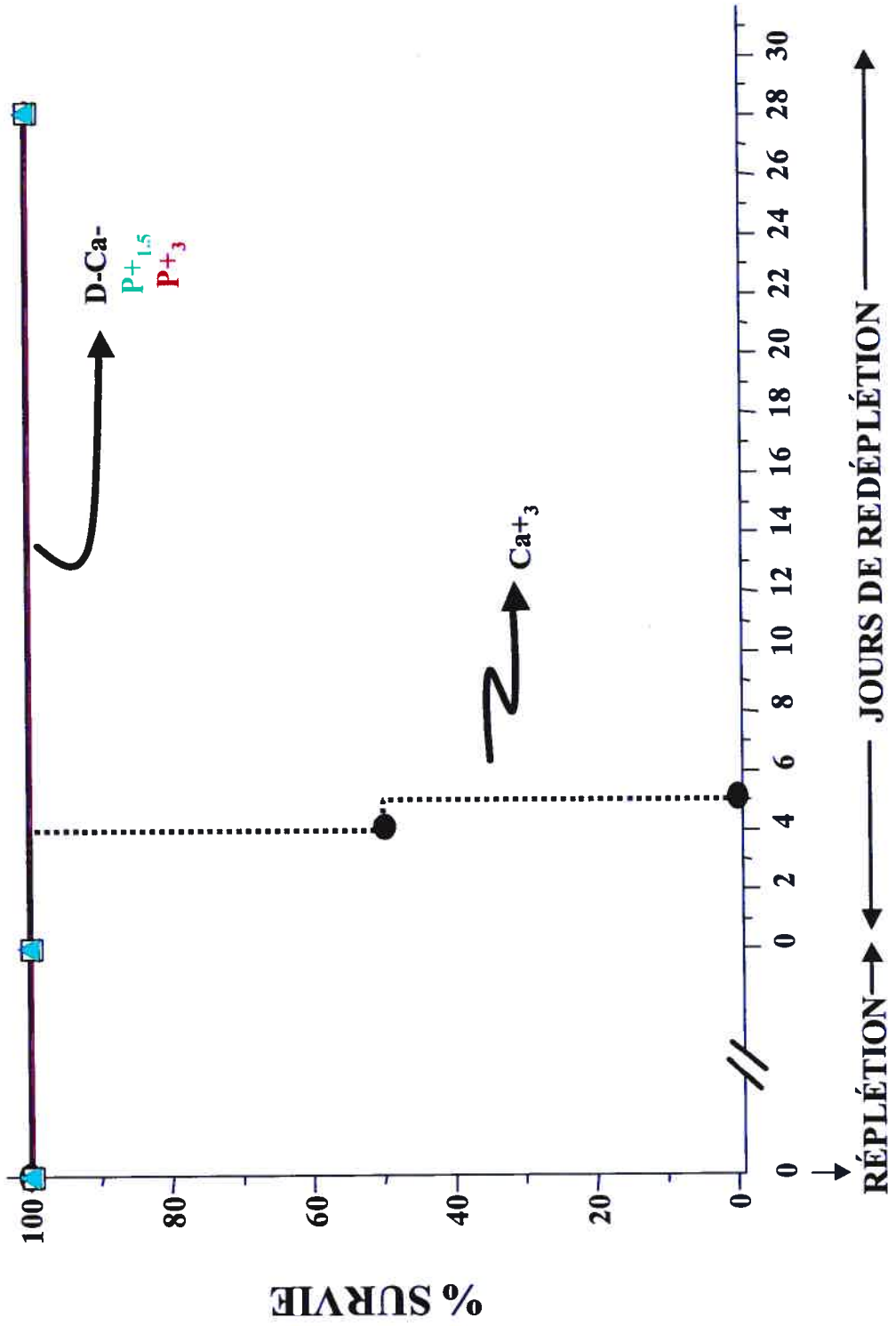


FIGURE 2.11 COURBES DE SURVIE DES ANIMAUX SUPPLÉMENTÉS EN PHOSPHORE ALIMENTAIRE SOUMIS À UN PROTOCOLE DE RÉPLÉTION/REDELÉTION CALCIQUE

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.11

Après une phase de réplétion calcique couplée ou non à une supplémentation de phosphore alimentaire, les animaux ont été remis sur leur diète D-Ca- initiale pour la phase de redéplétion calcique. Les données représentent le pourcentage de survie des animaux suivant l'introduction de cette phase de redéplétion. Les effectifs sont les suivants : D-Ca-, n=9 rats ; Ca+₃, n=9 rats, P+₃, n=5 rats, P+_{1,5}, n=5 rats. Tous les animaux, à l'exception des animaux Ca+₃, ont survécu les deux phases du traitement. Les différences statistiques entre les courbes ont été déterminées par le test de « Log Rank » (différence globale entre les groupes : p<0.05). Le groupe Ca+₃ se distingue significativement des trois autres groupes (p<0.001).

b) Calcémies et phosphatémies

La figure 2.12A illustre l'effet des deux modes de supplémentation en phosphore alimentaire sur la concentration circulante de Ca^{2+} . Globalement, l'ajout de phosphore alimentaire à la diète atténue significativement l'effet normocalcémique de la supplémentation en calcium administrée seule ($p < 0.001$). En effet, chez les animaux $\text{P}+3$, le phosphore alimentaire contre complètement l'effet normocalcémiant de la supplémentation calcique, les concentrations circulantes de calcium demeurent semblables à celles des animaux D-Ca- au cours des phases de réplétion et redéplétion. Chez les animaux recevant la diète contenant 1.5% de phosphore, l'effet de la supplémentation de phosphore sur la calcémie est moins marquée car une modeste élévation est observée entre les jours 3 et 14 de réplétion. A titre comparatif, cette élévation s'apparente à celle observée entre les jours 3 et 7 des animaux supplémentés avec la diète contenant 0.5% de gluconate de calcium dans l'eau de boisson. Contrairement à ce groupe, toutefois, au cours de la phase de redéplétion, la calcémie retourne rapidement aux valeurs observées avant la réplétion chez les animaux $\text{P}+1.5$.

La phosphatémie du groupe $\text{P}+3$ demeure globalement inchangée durant les deux phases et se compare aux concentrations circulantes de phosphore mesurés chez les animaux $\text{Ca}+0.5$. Chez les animaux recevant la plus faible dose de phosphore, une réduction significative de la phosphatémie est observée après trois jours de réplétion ($p < 0.001$). Toutefois, cette dernière remonte dans la partie inférieure de la zone normale entre les jours 7 et 14 de la réplétion ($\text{P}+1.5$ vs $\text{Ca}+3$, $p < 0.01$). Dès l'amorce de la phase de redéplétion, la phosphatémie du groupe $\text{P}+1.5$ augmente et se maintient à des concentrations normales durant les deux semaines de redéplétion.

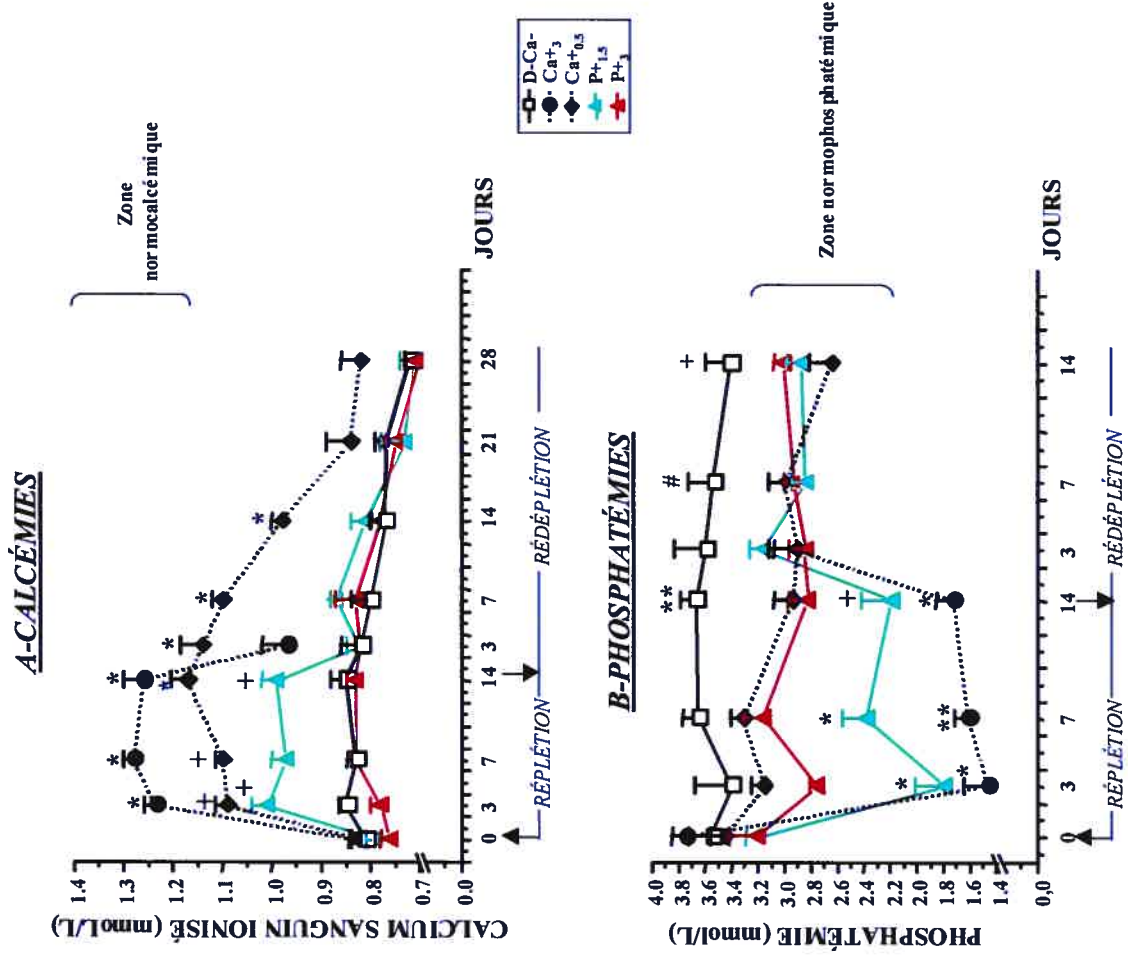


FIGURE 2.12 INFLUENCE DES DEUX MODES DE SUPPLÉMENTATION EN PHOSPHORE ALIMENTAIRE SUR LES CONCENTRATIONS CIRCULANTES DE CALCIUM IONISÉ ET DE PHOSPHORE INORGANIQUE

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.12

Influence de la réplétion en calcium et en phosphore alimentaire sur la concentration sérique de calcium ionisé (A) et de phosphore inorganique (B). Les concentrations circulantes de calcium et de phosphore ont été mesurées sur des échantillons de sang prélevés au début et après 3,7 et 14 jours de réplétion en calcium alimentaire seulement ou en calcium et phosphore alimentaire et suivant 3,7,14 jours (pour le phosphore) et 3,7,14, 21 et 28 jours de redéplétion calcique (pour le Ca^{2+}). ↑ début de la réplétion ↓ début de la redéplétion. A- D-Ca- □—□, n = 8-9 rats, Ca^{+3} ●---●, n=10 rats, $\text{Ca}^{+0.5}$ ◆---◆, n = 3-6 rats, $\text{P}^{+1.5}$ ▲—▲, n=5-17 rats; P^{+3} ▲—▲, n=5-17 rats. La zone ombragée représente la moyenne des animaux normaux ± 2 écarts-types à la moyenne (n= 64 valeurs obtenues de 8 rats N pairés pour le poids et 5 rats N pairés pour l'âge). Les valeurs mesurées au jour 0 ont été analysées séparément (NS) et exclues des analyses statistiques subséquentes. Les données ont été analysées séparément par phases de traitement; pour la réplétion, jour 3 à 14 et pour la redéplétion, jour 3 à 28. Les valeurs mesurées au jour 0 ont été analysées séparément (NS) et exclues des analyses statistiques subséquentes. Les données ont été analysées séparément par phases de traitement; pour la réplétion, jour 3 à 14 et pour la redéplétion, jour 3 à 28. Les différences entre les groupes ont été déterminées par ANOVA bidimensionnelle (en phase de réplétion: effet global du traitement $p < 0.001$, effet global du temps NS et interaction NS; en phase de redéplétion: effet global du traitement, $p < 0.001$; effet global du temps, $p < 0.001$ et interaction significative, $p < 0.03$) et les comparaisons individuelles entre les groupes ont été faites avec le test de Tukey/Bonferroni * $p < 0.05$ vs D-Ca-, P^{+3} et $\text{P}^{+1.5}$; + $p < 0.02$ vs D-Ca- et P^{+3} . B- D-Ca- □—□, n = 5 rats, Ca^{+3} ●---●, n=6-10 rats, $\text{Ca}^{+0.5}$ ◆---◆, n = 3-6 rats, $\text{P}^{+1.5}$ ▲—▲, n=5-9 rats, P^{+3} ▲—▲, n=5-9 rats. La zone ombragée représente la moyenne des animaux normaux ± 2 écarts-types à la moyenne

(n= 45 valeurs obtenues de 4 rats N pairés pour le poids et 5 rats N pairés pour l'âge). Les valeurs mesurées au jour 0 ont été analysées séparément (NS) et exclues des analyses statistiques subséquentes. Les données ont été analysées séparément par phases de traitement; pour la réplétion, jour 3 à 14 et pour la redéplétion, jour 3 à 28. Les valeurs mesurées au jour 0 ont été analysées séparément (NS) et exclues des analyses statistiques subséquentes. Les données ont été analysées séparément par phases de traitement; pour la réplétion, jour 3 à 14 et pour la redéplétion, jour 3 à 28. Les différences entre les groupes ont été déterminées par ANOVA bidimensionnelle (en phase de réplétion: effet global du traitement $p < 0.001$, effet global du temps $p < 0.02$ et interaction NS; en phase de redéplétion: effet global du traitement, $p < 0.001$; effet global du temps, NS et interaction NS) et les comparaisons individuelles entre les groupes ont été faites avec le test de Tukey/Bonferroni * $p < 0.05$ vs D-Ca-, P₊₃ et Ca_{+0.5}; ** $p < 0.05$ vs tous les autres groupes; + $p < 0.01$ vs P₊₃; # $p < 0.05$ vs P_{+1.5}, P₊₃ et Ca_{+0.5}.

c) PTH sérique

Tel qu'illustré à la figure 2.13, la supplémentation en phosphore d'animaux supplémentés au calcium affecte de façon non-significative les concentrations circulantes de PTH. En effet, malgré une baisse au cours de la première phase de la supplémentation, les concentrations de PTH retournent aux valeurs pré-supplémentation après 14 jours de réplétion et demeurent inchangées après 3 jours de redéplétion.

d) Mesures anthropométriques et densitométriques

La figure 2.14A illustre la comparaison des gains de poids relatifs des animaux supplémentés en phosphore, des animaux D-Ca- et de ceux supplémentés en calcium alimentaire seulement. Malgré une faible élévation de la calcémie, les animaux P_{+1,5} gagne du poids comparativement aux animaux D-Ca- ($p < 0.002$). De plus, le gain de poids se compare à celui observé chez les animaux recevant la plus haute dose de calcium alimentaire (P_{+1,5} : $42 \pm 4\%$ vs Ca₊₃ : $38 \pm 3\%$). Tel qu'illustré aux figures 2.14B, 2.15A et 2.15B, la supplémentation en phosphore n'a aucun effet sur la surface corporelle, la CMO et la DMO lorsque les résultats sont comparés à ceux obtenus chez les animaux D-Ca-.

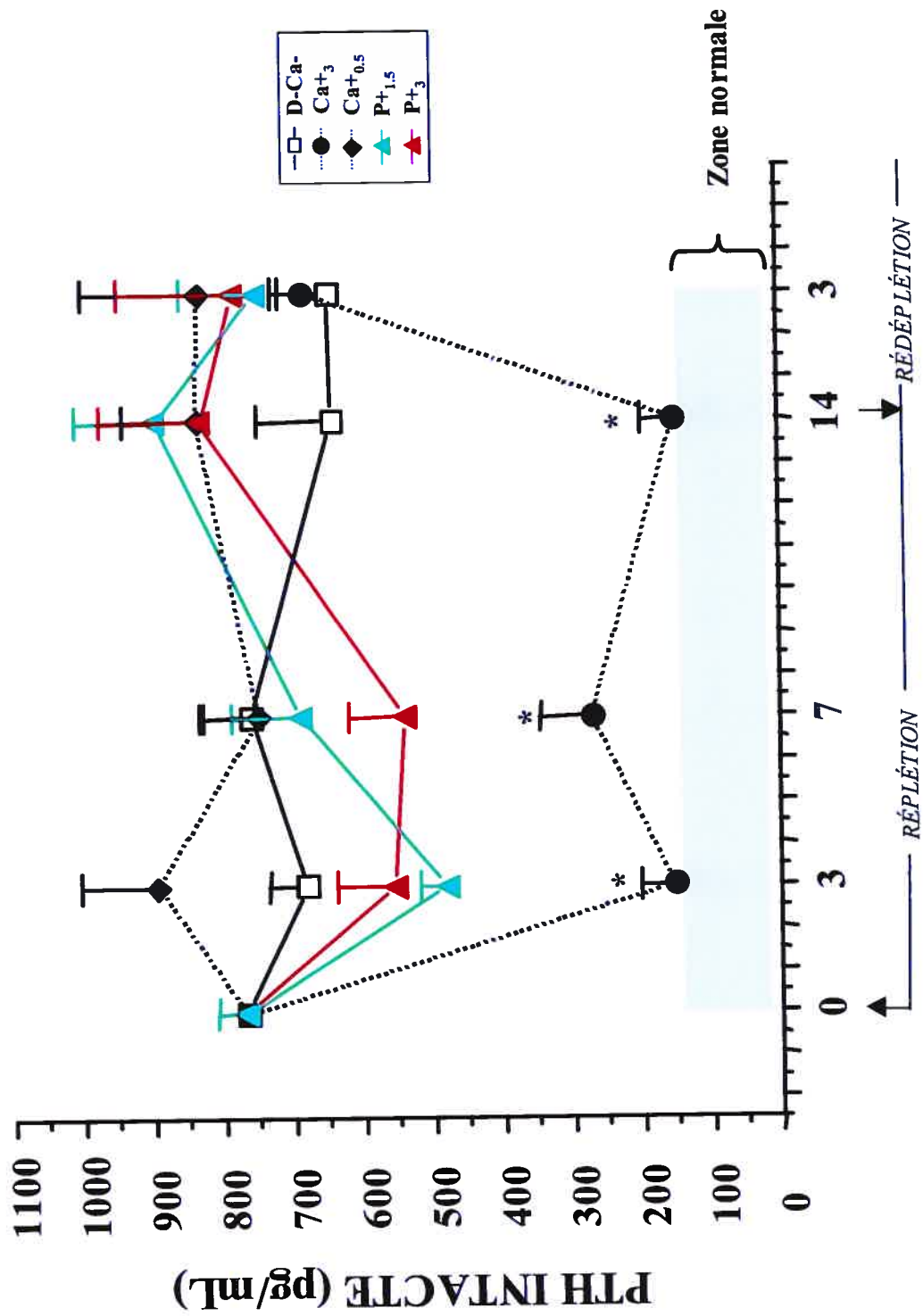
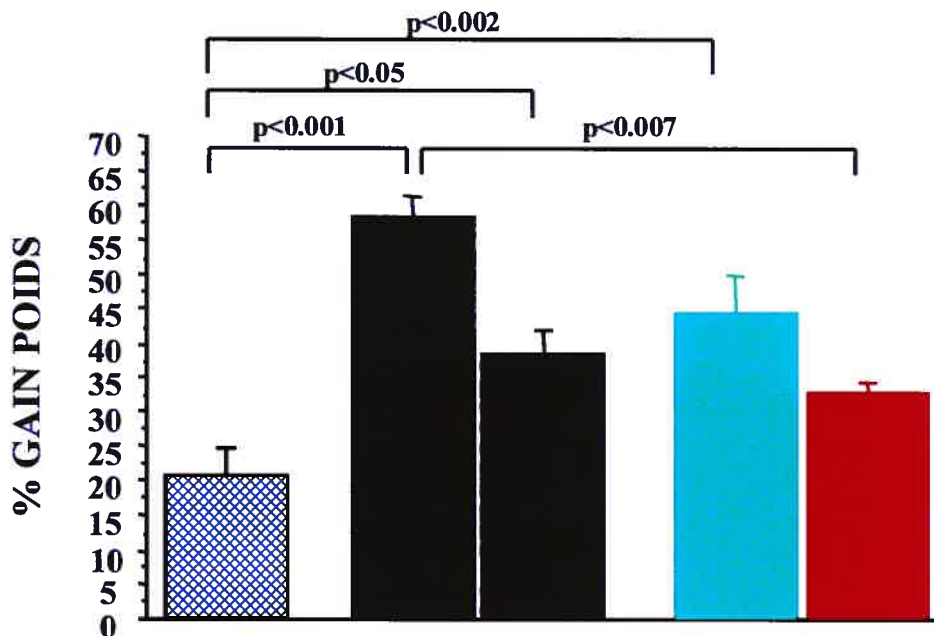


FIGURE 2.13. INFLUENCE DES DEUX MODES DE SUPPLÉMENTATION EN PHOSPHORE ALIMENTAIRE SUR LA CONCENTRATION SÉRIQUE DE PTH INTACTE

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.13

Influence de la réplétion en calcium et en phosphore alimentaire sur la concentration sérique de PTH intacte. Les niveaux circulants de PTH ont été mesurés sur des échantillons de sang prélevés au début et après 3,7 et 14 jours de réplétion puis suivant 3 jours de redéplétion calcique. ↑ début de la réplétion ↓ début de la redéplétion. D-Ca- □—□, n = 3-5 rats, Ca+₃ ●---●, n=3-6 rats, Ca+_{0,5} ◆---◆, n = 3 rats, P+_{1,5} ▲—▲, n=4 rats, P+₃ ▲—▲, n=4 rats. La zone ombragée représente la moyenne des animaux normaux ± 2 écarts-types à la moyenne (n= 29 valeurs obtenues de 7 rats N pairés pour le poids et 7 rats N pairés pour l'âge). Les différences entre les groupes ont été déterminées par une ANOVA bidimensionnelle (effet global du traitement, p<0.001; effet global du temps, p<0.05 et interaction, p<0.001) et les comparaisons individuelles entre les moyennes des groupes ont été faites avec le test de Tukey, *p<0.003 vs tous les autres groupes.

A- GAIN DE POIDS (durant la phase de réplétion)



B- GAIN DE SURFACE CORPORELLE (durant la phase de réplétion)

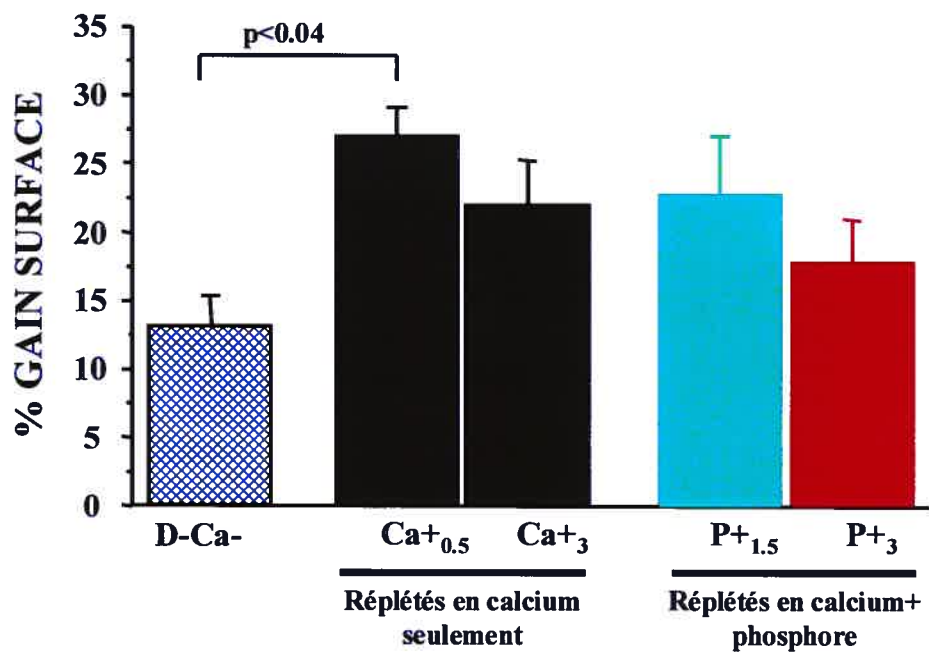


FIGURE 2.14 INFLUENCE DES DEUX MODES DE SUPPLÉMENTATION EN PHOSPHORE ALIMENTAIRE SUR LE GAIN DE POIDS ET DE SURFACE CORPORELLE DU CORPS ENTIER

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.14

Influence de la réplétion en calcium et en phosphore alimentaire sur le gain de poids (A) et de surface corporelle (B). Les poids ont été notés au début et après 14 jours de réplétion en calcium alimentaire seulement ou en calcium et en phosphore alimentaire. La surface corporelle a été mesurée par ostéodensitométrie aux mêmes jours. Les variations représentent la différence entre les valeurs au jour 0 et au jour 14 de réplétion et sont exprimées en pourcentage. D-Ca- (☒), n=9 rats; Ca⁺³ (■) n=10 rats ; Ca^{+0.5} (■) n=6 rats; P^{+1.5} (■), n=17 rats (pour le poids) et 8 rats (pour l'aire); P⁺³ (■) n=17 rats (pour le poids) et 8 rats (pour l'aire). Les différences entre les groupes ont été déterminées par une ANOVA unidimensionnelle et les comparaisons individuelles entre les moyennes des groupes ont été faites avec le test de Tukey telles qu'indiquées sur le graphique.

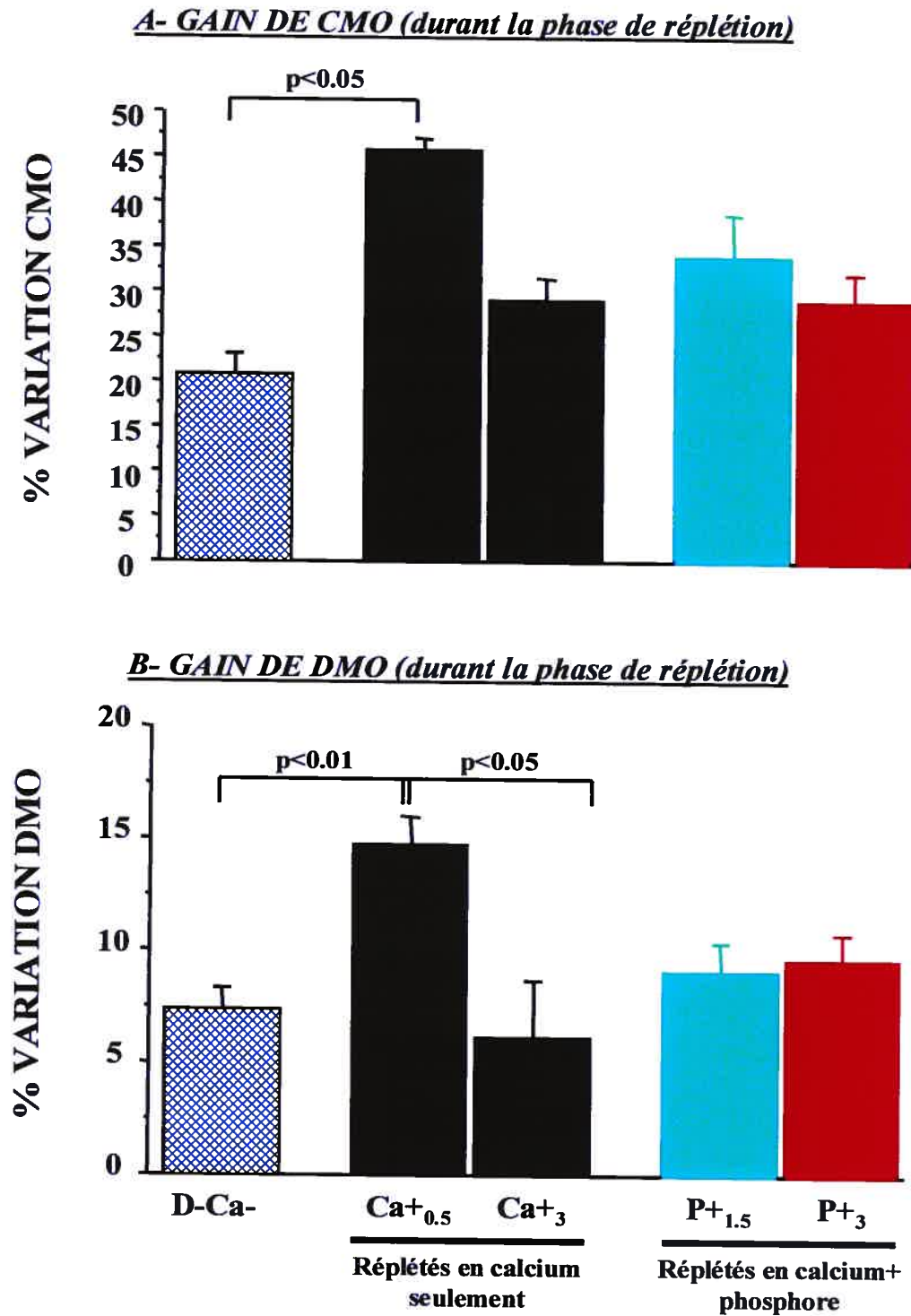


FIGURE 2.15 INFLUENCE DES DEUX MODES DE SUPPLÉMENTATION EN PHOSPHORE ALIMENTAIRE SUR L'ACCÉRIION MINÉRALE OSSEUSE ET DE LA DENSITÉ MINÉRALE OSSEUSE DU CORPS ENTIER

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.15

Influence de la réplétion en calcium et en phosphore alimentaire sur l'accrétion minérale osseuse (A) et le gain de densité minérale osseuse (DMO) (B). Le contenu minéral osseux (CMO) a été mesuré par ostéodensitométrie au début et suivant 14 jours de réplétion. La densité minérale osseuse a été subséquemment calculée en faisant le ratio entre le CMO et la surface corporelle. Les variations représentent la différence entre les valeurs au jour 0 et au jour 14 de réplétion et sont exprimées en pourcentage. D-Ca-

(☒), n=9 rats; Ca⁺³ (■) n=10 rats ; Ca^{+0.5} (■) n=6 rats; P^{+1.5} (■), n= 8 rats ; P⁺³

(■) n=8 rats. Les différences entre les groupes ont été déterminées par une ANOVA unidimensionnelle (pour le gain de CMO) ou non-paramétrique (Kruskal-Wallis ; pour le gain de DMO) et les comparaisons individuelles entre les moyennes des groupes ont été faites avec le test de Tukey/Dunn telles qu'indiquées sur le graphique.

6. Discussion

L'hypophosphatémie générée par la correction d'un état D-Ca- avec une dose élevée de calcium alimentaire conduit à l'apparition d'un rachitisme durant la phase de réplétion (article 2, figure 10, page 239). Ce défaut de minéralisation osseuse empêche les animaux Ca⁺³ de répléter convenablement leurs réserves osseuses. Ainsi, lorsque survient une phase de privation calcique, les réserves osseuses deviennent insuffisantes ou inaccessibles pour pourvoir aux besoins calciques de l'organisme. De plus, le retour rapide de l'hyperparathyroïdie secondaire dès l'arrêt de la supplémentation de calcium couplée à son action pro-résorptive osseuse contribue à dépler encore plus les réserves osseuses déjà grandement altérées.

Le but de ces travaux complémentaires est de prévenir l'hypophosphatémie en augmentant l'apport alimentaire en phosphore, tout en conservant la supplémentation calcique initiale afin de maintenir la calcémie normale. Ces manipulations nutritionnelles visent l'établissement d'un ratio Ca : P alimentaire favorable à une minéralisation osseuse adéquate et à la réplétion des réserves osseuses, ce qui devrait conséquemment permettre aux animaux de répondre aux besoins calciques de l'organisme lors de la phase de privation calcique. Nous avons effectivement observé un taux de survie global de 100% chez les animaux ayant reçu du phosphore alimentaire et ce, indépendamment de la dose de phosphore administrée. Toutefois, en examinant les paramètres densitométriques soit le gain de CMO et de DMO durant la phase de réplétion, aucune amélioration significative n'a été observée comparativement aux animaux Ca⁺³ alors que les animaux recevant la plus faible dose de calcium alimentaire (Ca^{+0.5}) présentent de loin la meilleure accréation minérale osseuse et le meilleur gain de DMO et ce, malgré un état d'hyperparathyroïdie secondaire toujours présent et un ratio Ca : P alimentaire similaire aux animaux P^{+1.5}. Dans notre modèle animal, caractérisé par un statut nutritionnel déficient en D, il ne nous a pas

été possible de corriger à la fois la calcémie et la phosphatémie. D'autres voies d'administration de phosphore, telles l'infusion continue par voie intrapéritonéale de même que les injections quotidiennes de doses variables de phosphore, ont été explorées et aucune ne parvient à normaliser les deux paramètres de façon simultanée. Ainsi en présence d'un statut nutritionnel déficient en D, le ratio Ca : P alimentaire ne demeure qu'un faible indicateur de la qualité de l'alimentation. Les quantités de calcium et de phosphore de la diète semblent en apparence adéquates alors que les quantités retrouvées dans le milieu extracellulaire de l'os ne permettent pas une minéralisation osseuse optimale. L'administration de phosphore alimentaire couplée à une haute dose de calcium alimentaire (animaux P₊₃) ne fait qu'accroître le processus de chélation intestinale déjà observée chez les animaux Ca₊₃ mais cette fois-ci au détriment du calcium. En effet, tout au long de la phase de réplétion, le groupe P₊₃ demeure hypocalcémique malgré un apport alimentaire de calcium suffisant pour maintenir la calcémie normale. Cette observation est symptomatique d'une forte chélation intestinale du calcium par l'accroissement de l'apport alimentaire de phosphore qui est, dans ce cas précis, triplé comparativement à la supplémentation de calcium alimentaire employée seule. Une plus faible dose de phosphore alimentaire, où le contenu en phosphore de la diète est augmenté par un facteur de 1.5, accroît la calcémie sans toutefois la normaliser. Les effets sur la phosphatémie sont symétriques; ainsi les animaux P₊₃ conservent leur phosphatémie initiale, signifiant ainsi que l'excès de phosphore alimentaire n'ayant pas chélaté le calcium dans l'intestin, a été absorbé et contribue à maintenir la phosphatémie. Alors que les animaux P_{+1.5} absorbent moins de phosphore que le groupe P₊₃ mais néanmoins plus que les animaux Ca₊₃ et leur phosphatémie s'en trouve conséquemment réduite à un moindre degré.

Il est important de mentionner que la phosphatémie peut aussi être régulée par sa propre excrétion urinaire, elle-même modulée par la PTH. Toutefois, les animaux supplémentés en

phosphore alimentaire maintiennent un état hyperparathyroïdien tout au long de la phase de réplétion et redéplétion calcique. Ainsi, ceci suggère que l'excrétion urinaire de phosphore est maintenue constante et que les variations de phosphore sérique observées chez les animaux $P+_{1,5}$ semblent causées par une diminution de son entrée dans l'organisme.

Au sein de notre modèle animal, les concentrations sériques de calcium et de phosphore présentent une forte corrélation inverse et nos résultats nous permettent seulement de cibler une combinaison circulante de calcium et de phosphore optimale à la minéralisation de l'os. Ainsi, dans tous les groupes observés, les animaux $Ca+_{0,5}$, avec une calcémie intermédiaire qui rejoint la partie inférieure de la zone normale et une phosphatémie normale qui demeure inchangée durant la phase de réplétion semble montrer la meilleure combinaison. Les autres groupes présentent soit une hypocalcémie franche couplée à une phosphatémie adéquate voire élevée ($D-Ca-$ et $P+_{3}$) soit une normocalcémie et une hypophosphatémie ($Ca+_{3}$) ou soit une calcémie et une phosphatémie trop faible pour soutenir une minéralisation osseuse adéquate ($P+_{1,5}$). Des analyses de la plaque de croissance et des études histomorphométriques sont requises afin de permettre une meilleure caractérisation de la physiologie osseuse de ces animaux. Les résultats densitométriques ne nous permettent pas de déterminer si ces animaux sont toujours rachitiques et si ceci est la cause sous-jacente de la réduction de l'accrétion minérale osseuse comme ce fut le cas chez le groupe $Ca+_{3}$.

L'absence de D influence certainement le processus de minéralisation osseuse en soi. Outre le fait, que la D optimise les concentrations de calcium et de phosphore retrouvées dans l'os, elle est également impliquée dans la régulation de l'expression génique de certaines protéines qui jouent un rôle direct au sein du processus de minéralisation osseuse.

Finalement, ces résultats soulignent l'importance du phosphore dans la croissance. En effet, le phosphore, par son implication dans toutes les réactions métaboliques nécessitant une

consommation d'énergie sous forme d'ATP, est essentiel. Malgré des concentrations circulantes de calcium maintenues faibles ($P_{+1.5}$) ou hypocalcémiques (P_{+3}), les animaux supplémentés en phosphore présentent un gain de poids et de surface corporelle comparable aux animaux Ca_{+3} qui ont une calcémie tout à fait normalisée. Les concentrations sériques de phosphore des deux premiers groupes sont néanmoins supérieures. Malheureusement, les apports alimentaires n'ont pas été mesurés chez ces animaux et le gain de poids pourrait tout simplement être causé par une prise alimentaire plus élevée. Les apports alimentaires ont néanmoins été évalués chez les animaux Ca_{+3} seulement et ne comportent aucune différence notable entre ces derniers et les animaux D-Ca-, ce qui suggère également que le calcium en soi est, également, un agent qui stimule la croissance.

La supplémentation en phosphore a permis d'accroître la survie des animaux suite à l'introduction d'une phase de redéplétion calcique. Cette survie peut aussi être attribuable au fait que la chute des calcémies en phase de redéplétion calcique présente un patron qui a permis une meilleure adaptation de l'organisme. Ainsi, en phase de redéplétion calcique, les animaux P_{+3} présentent une calcémie inchangée, ceci permet le maintien de l'homéostasie calcique et favorise la survie des animaux à long terme. Toutefois, des travaux subséquents devront évaluer les mécanismes cellulaires associés à la survie de ces animaux.

II- Influence du sexe sur la réversibilité d'un état d'hypocalcémie chronique in vivo

1. Hypothèse spécifique

Les études entreprises reposent sur l'hypothèse selon laquelle les femelles hypocalcémiques chroniques et carencées en D se distinguent des mâles D-Ca- quant aux effets de la réplétion et redéplétion calcique sur le métabolisme osseux et phosphocalcique, soulignant ainsi l'influence du sexe dans la régulation de l'homéostasie calcique.

2. But

Vérifier, chez un groupe de femelles hypocalcémiques chroniques et déficientes en D, les conséquences de la réplétion et redéplétion calcique sur l'os et les paramètres sériques du métabolisme phosphocalcique.

3. Prémisses

L'étude des animaux D-Ca- de deuxième génération nous a permis de constater que des femelles D-Ca- de première génération pouvaient mener à terme une gestation et survivre à la période d'allaitement, deux états physiologiques nécessitant une grande demande calcique à l'organisme et ce, malgré leur statut nutritionnel déficient en calcium et en D. Cette observation suggère que les femelles sont plus résistantes ou encore qu'elles présentent une meilleure adaptation face à des situations de forte demande calcique telle que celle générée par la phase de redéplétion calcique. D'ailleurs, il a été démontré par d'autres qu'il existe, chez le rat, une différence entre les mâles et les femelles pour ce qui est de la régulation de l'homéostasie calcique (234). Selon ces travaux, les femelles survivent mieux à l'implantation d'une carence en D que les mâles.

4. Matériel et Méthodes

Le protocole expérimental adopté est identique à celui décrit à l'article 2 à l'exception qu'il a été appliqué sur des femelles D-Ca- de première génération âgées de 7 semaines. Les

paramètres sanguins (calcium et phosphore), anthropométrique (poids) et densitométriques (surface, CMO et DMO) ont été déterminés tel que décrit à l'article 2.

5. Résultats

Les résultats obtenus chez les femelles D-Ca- et Ca₊₃ sont présentés de façon comparative aux résultats obtenus chez les mâles D-Ca-et Ca₊₃ qui figurent à l'article 2.

a) Survie

La figure 2.16 illustre le taux de survie des mâles et des femelles suite à la réintroduction de la diète initiale déficiente en calcium. A titre comparatif, la survie des animaux soumis à un protocole de redéplétion calcique progressive, tel que décrit à la page 161, est aussi illustrée. Les taux de survie des femelles Ca₊₃ soumises à une phase de redéplétion calcique rapide et progressive sont de 60 et 67% respectivement et se révèlent significativement supérieurs à ce qui est observé chez les mâles soumis aux mêmes protocoles ($p < 0.0008$ et $p < 0.0001$ respectivement).

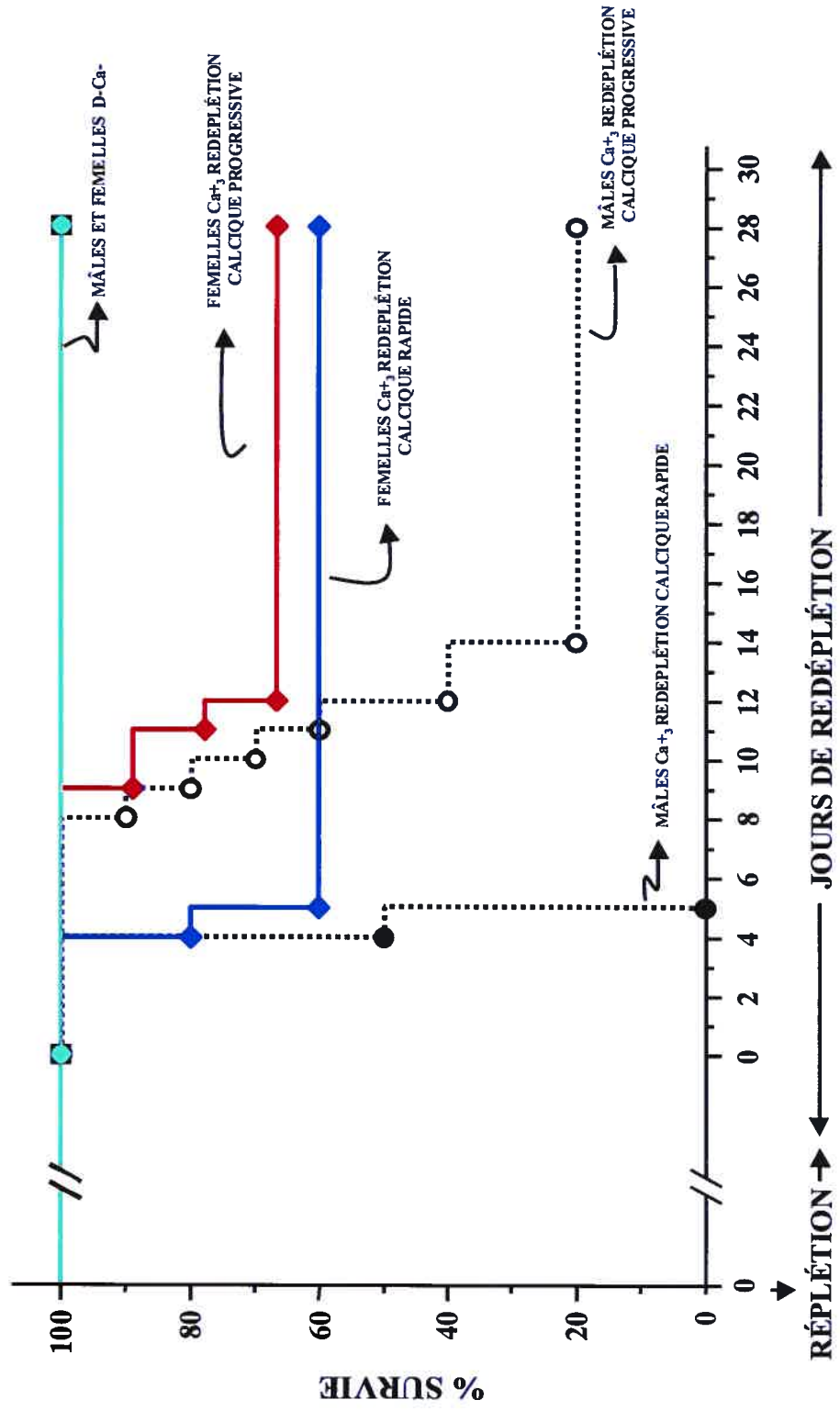








FIGURE 2.16 COURBES DE SURVIE DES MÂLES ET DES FEMELLES SOUMIS À UN PROTOCOLE DE RÉPLÉTION/REDEPLÉTION CALCIQUE

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.16

Après une phase de déplétion calcique, les mâles et les femelles ont été remis sur la diète D-Ca- initiale pour la durée de la phase de redéplétion calcique. Un sous-groupe de mâles et de femelles a été soumis à une phase de redéplétion calcique progressive. Les données représentent le pourcentage de survie des animaux durant la phase de déplétion et suivant l'introduction de la phase de redéplétion. Femelles D-Ca- ,  , n= 15 rats; femelles Ca+₃  , redéplétion rapide (RR), n= 5 rats; femelles Ca+₃  , redéplétion progressive (RP), n=9 rats; mâles D-Ca-  , n= 9 rats; mâles Ca+₃  , RR, n= 9 rats ; mâles Ca+₃  , RP, n= 10 rats. Tous les animaux ont survécu la phase de déplétion calcique. Les différences statistiques entre les courbes ont été déterminées par le test de « Log Rank » (différence globale significative entre les groupes : p<0.0001). Femelles Ca+₃ RR vs Femelles Ca+₃ RP : p<0.001. Femelles Ca+₃ RR vs femelles D-Ca- : p<0.01. Femelles Ca+₃ RP vs femelles D-Ca- : p<0.02. Femelles Ca+₃ RR vs mâles Ca+₃ RR : p<0.0001. Femelles Ca+₃ RP vs mâles Ca+₃ RP : p<0.0008.

b) Calcémies et phosphatémies

La figure 2.17A compare les concentrations sériques de Ca^{2+} chez les mâles et les femelles soumis à une phase de réplétion et de redéplétion calcique. La supplémentation en calcium alimentaire normalise la calcémie de façon équivalente chez les femelles et chez les mâles. La réintroduction de la diète déficiente en calcium entraîne une réduction similaire de la concentration circulante de calcium chez les deux groupes ayant reçu la supplémentation en calcium qui retourne aux valeurs initiales après une semaine.

Les concentrations circulantes de phosphore inorganique sont illustrées à la figure 2.17B. Après trois jours de réplétion, les femelles Ca^{+3} subissent une diminution moins marquée de leur phosphatémie que les mâles Ca^{+3} . Toutefois, cette différence significative disparaît après sept jours de réplétion. Au moment de la redéplétion calcique, les concentrations sériques de phosphore inorganique des femelles et des mâles augmentent de façon similaire et se maintiennent dans la zone normophosphatémique pendant deux semaines.

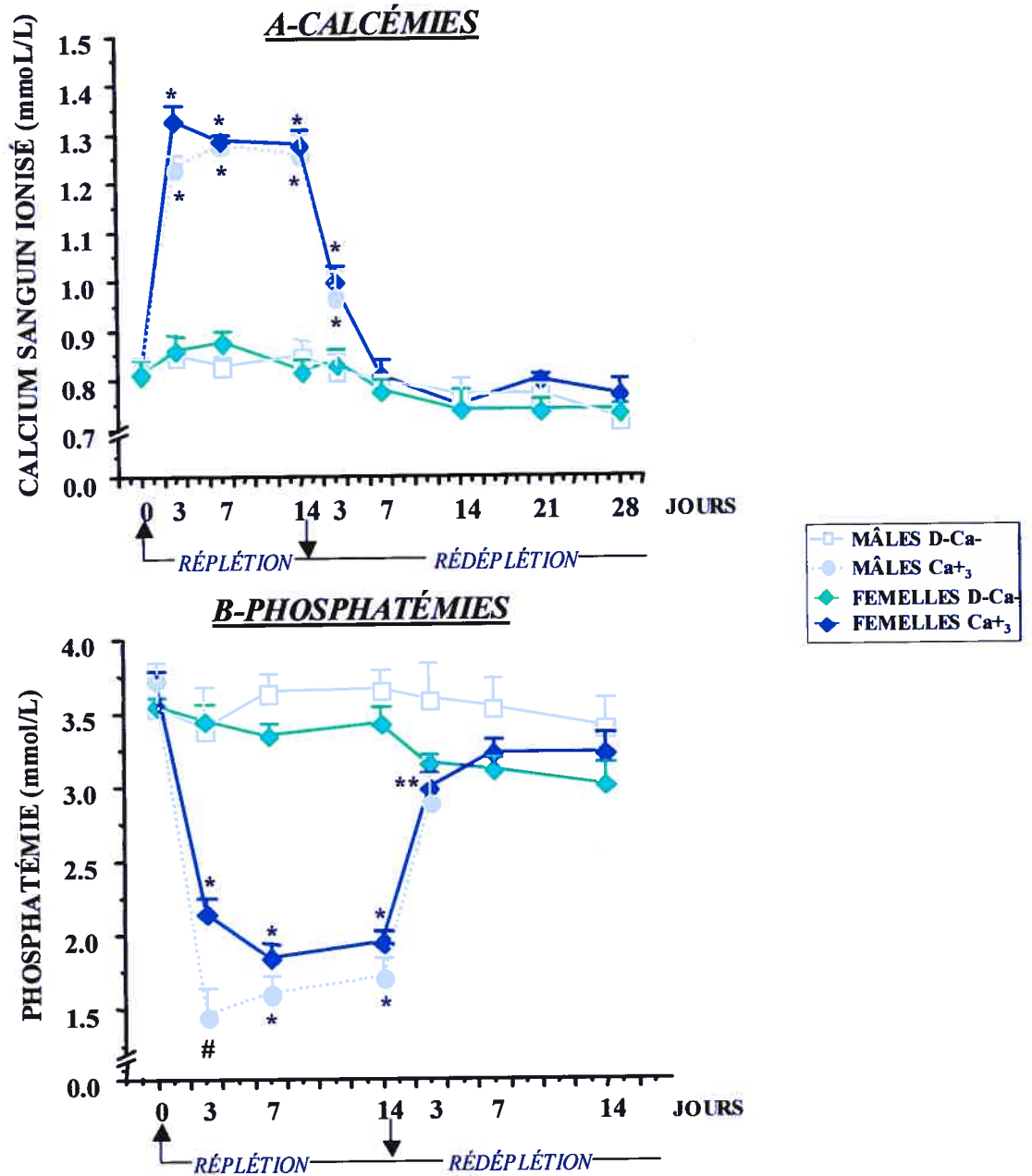


















FIGURE 2.17 INFLUENCE DE LA RÉPLÉTION/REDÉPLÉTION CALCIQUE SUR LES CONCENTRATIONS CIRCULANTES DE CALCIUM IONISÉ ET DE PHOSPHORE INORGANIQUE CHEZ LES MÂLES ET LES FEMELLES

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.17

Influence de la réplétion et redéplétion calcique sur la concentration sérique de calcium ionisé (A) et de phosphore inorganique (B). Les concentrations circulantes de calcium et de phosphore ont été mesurées sur des échantillons de sang prélevés au début et après 3,7 et 14 jours de réplétion en calcium alimentaire puis suivant 3,7,14 jours (pour le phosphore) et 3,7,14, 21 et 28 jours de redéplétion calcique (pour le calcium ionisé). ↑ début de la réplétion ↓ début de la redéplétion. A. femelles D-Ca- ....., n= 3-10 rats; femelles Ca+₃ ....., n= 6-13 rats; mâles D-Ca- — , n= 8-9 rats; mâles Ca+₃ —, n= 10 rats. La zone ombragée représente la moyenne de mâles normaux ± 2 écarts-type à la moyenne (n= 64 valeurs obtenues de 8 rats N pairés pour le poids et 5 rats N pairés pour l'âge). Les valeurs mesurées au jour 0 ont été analysées séparément (NS) et exclues des analyses statistiques subséquentes. Les données ont été analysées séparément par phases de traitement; pour la réplétion, jour 3 à 14 et pour la redéplétion, jour 3 à 28. Les différences entre les groupes ont été déterminées par ANOVA bidimensionnelle (en phase de réplétion: effet global du traitement p<0.001, effet global du temps NS et interaction NS; en phase de redéplétion: effet global du traitement, p<0.001 ; effet global du temps, p<0.001 et interaction, p<0.02) et les comparaisons individuelles entre les groupes ont été faites avec le test de Tukey/Bonferroni * p<0.001 vs femelles D-Ca- et mâles D-Ca-.

B. Femelles D-Ca- ....., n= 3-10 rats; femelles Ca+₃ ....., n=6-13 rats pour les femelles Ca+₃; mâles D-Ca- —, n= 5 rats; mâles Ca+₃ —, 4-10 rats. La zone ombragée représente la moyenne de mâles normaux ± 2 écarts-type à la moyenne (n= 45 valeurs obtenues de 4 rats N pairés pour le poids et 5 rats N pairés pour l'âge). Les valeurs mesurées au jour 0 ont été analysées séparément (NS) et exclues des analyses statistiques subséquentes. Les données ont été analysées séparément par phases de traitement ; pour la réplétion, jour 3 à 14 et pour la redéplétion, jour 3 à 28. Les différences entre les groupes

ont été déterminées par ANOVA bidimensionnelle (en phase de réplétion: effet global du traitement $p < 0.001$, effet global du temps NS et interaction NS; en phase de redéplétion: effet global du traitement, $p < 0.001$; effet global du temps, NS et interaction, NS) et les comparaisons individuelles entre les groupes ont été faites avec le test de Tukey/Bonferroni * $p < 0.001$ vs femelles D-Ca- et mâles D-Ca-, # $p < 0.001$ vs tous les autres groupes, ** $p < 0.003$ vs mâles D-Ca-.

c) Mesures anthropométriques et densitométriques

Tel qu'illustré à la figure 2.18A et B, les femelles réplétées en calcium alimentaire ne se distinguent ni des femelles D-Ca- ni des mâles D-Ca- pour ce qui est du gain de poids et de la surface corporelle. Seuls les mâles Ca+₃ présentent un gain de poids significativement plus élevé que les trois autres groupes alors qu'ils ont un gain de surface corporelle qui ne se différencie d'une manière significative que des femelles D-Ca-.

La figure 2.19A illustre que la supplémentation en calcium tant chez les femelles que chez les mâles cause une augmentation de l'accrétion minérale osseuse qui se révèle toutefois significative que chez le premier groupe. Quant au gain de DMO du corps entier, il n'existe aucune différence entre les femelles et les mâles qu'ils soient supplémentés en calcium ou non.

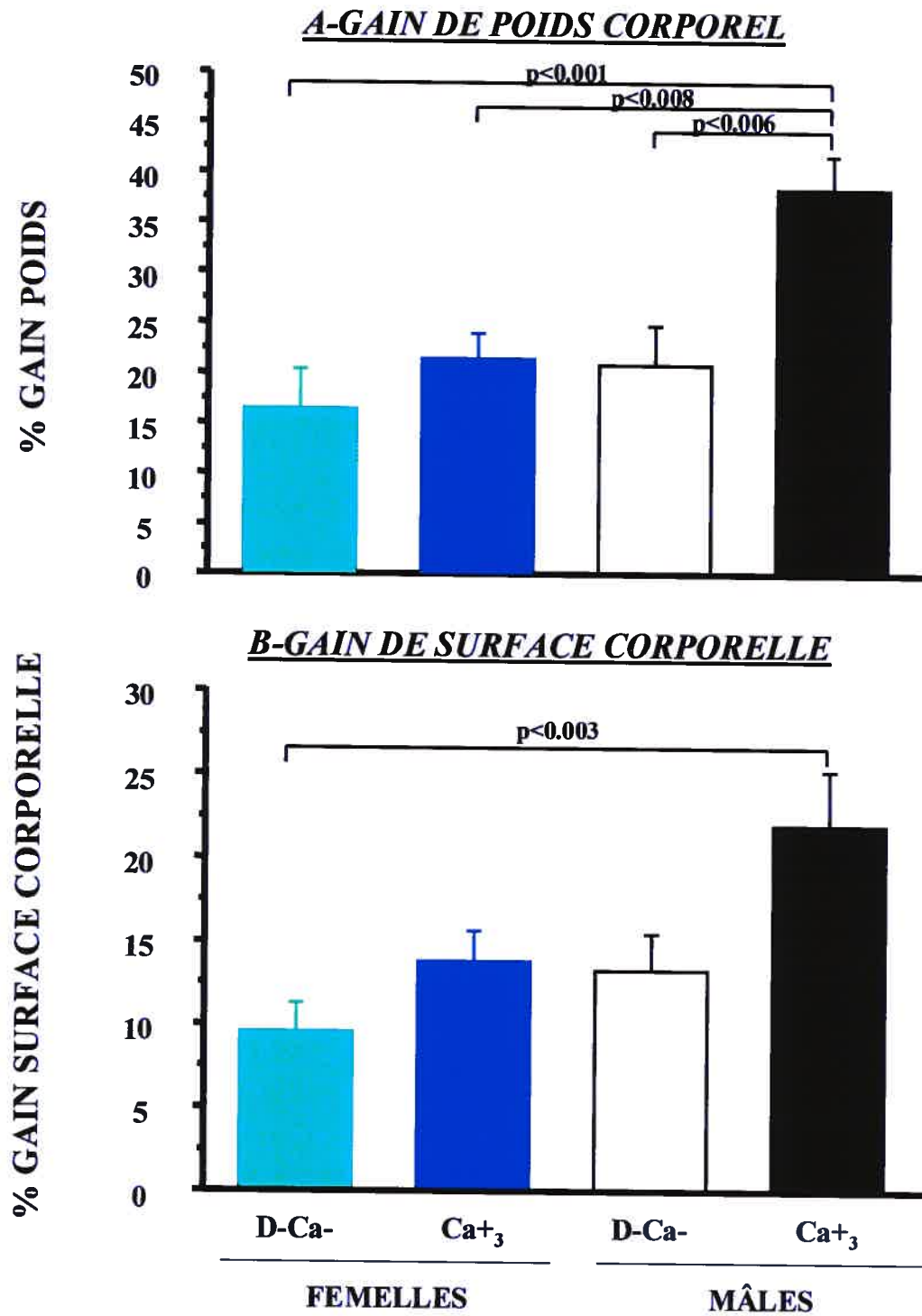


FIGURE 2.18 GAIN DE POIDS ET DE SURFACE CORPORELLE DURANT LA PHASE DE RÉPLÉTION CALCIQUE CHEZ LES MÂLES ET LES FEMELLES

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.18

Influence de la réplétion calcique sur le gain de poids (A) et de surface corporelle (B). Les poids ont été notés au début et après 14 jours de réplétion en calcium alimentaire. La surface corporelle a été mesurée par ostéodensitométrie aux même jours. Les variations représentent la différence entre les valeurs au jour 0 et au jour 14 de réplétion et sont exprimées en pourcentage. Femelles D-Ca- (■), n=13 rats, femelles Ca⁺₃ (■), n=9 rats, mâles D-Ca- (□), n=9 rats et mâles Ca⁺₃ (■), n=10 rats. Les différences entre les groupes ont été déterminées par ANOVA unidimensionnelle et les comparaisons individuelles entre les moyennes des groupes ont été faites avec le test de Tukey telles qu'indiquées sur le graphique.

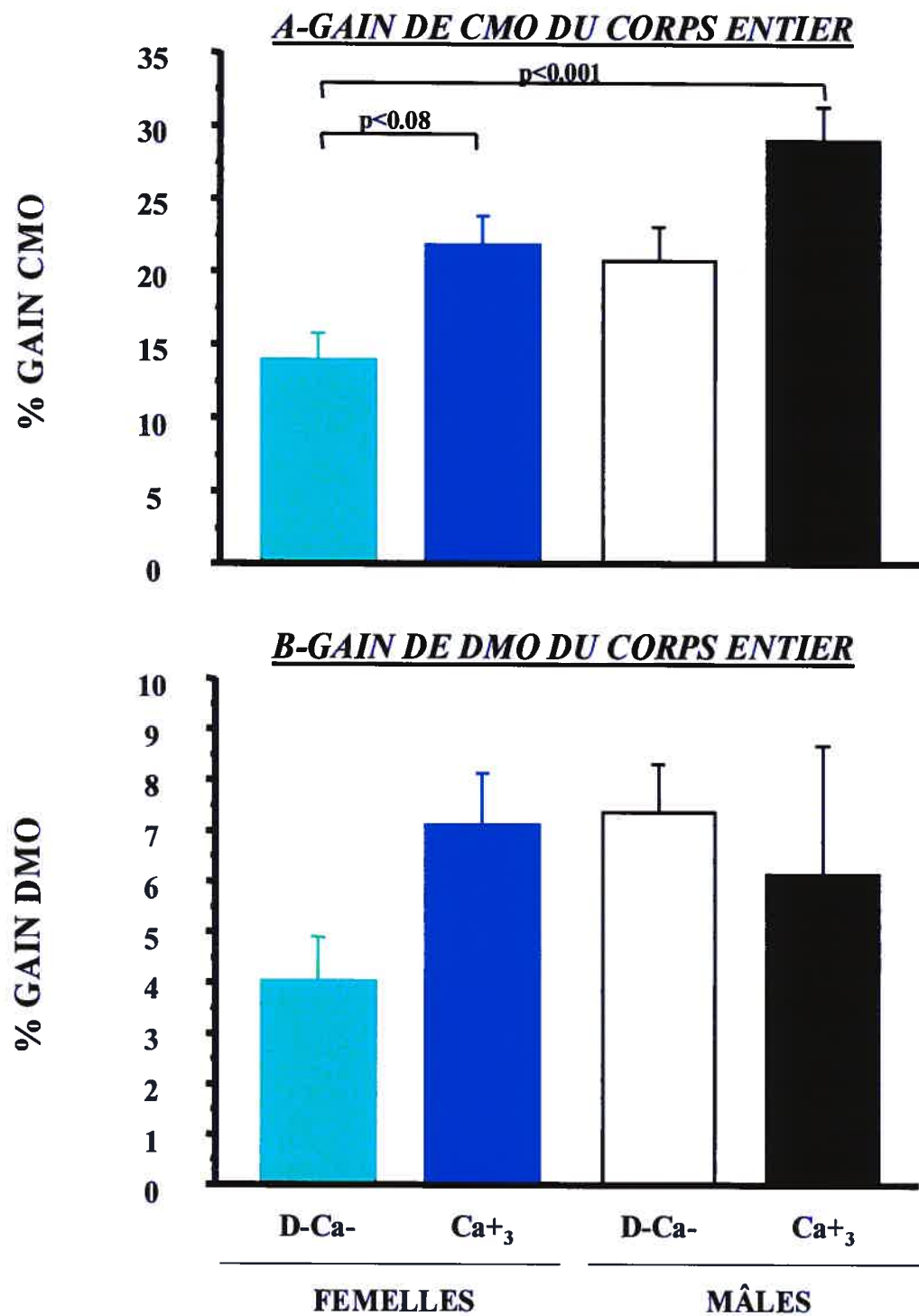


FIGURE 2.19 ACCRÉTION MINÉRALE OSSEUSE ET GAIN DE DMO DU CORPS ENTIER DURANT LA PHASE DE RÉPLÉTION CALCIQUE CHEZ LES MÂLES ET LES FEMELLES

LÉGENDE DE LA FIGURE 2.19

Influence de la réplétion calcique sur l'accrétion minérale osseuse (A) et le gain de densité minérale osseuse (DMO) (B). Le contenu minéral osseux (CMO) a été mesuré par ostéodensitométrie au début et après 14 jours de réplétion. La DMO a été subséquemment calculée en faisant le ratio entre le CMO et la surface corporelle. Les variations représentent la différence entre les valeurs au jour 0 et au jour 14 de réplétion et sont exprimées en pourcentage. Femelles D-Ca- (■), n=13 rats, femelles Ca⁺³ (■), n=9 rats, mâles D-Ca- (□), n=9 rats et mâles Ca⁺³ (■), n=10 rats. Les différences entre les groupes ont été déterminées par ANOVA unidimensionnelle et les comparaisons individuelles entre les moyennes des groupes ont été faites avec le test de Tukey telles qu'indiquées sur le graphique.

6. Discussion

En comparant les conséquences du protocole de réplétion/redéplétion calcique chez les mâles et les femelles, on remarque que le sexe exerce une influence sur l'homéostasie calcique et sur le métabolisme osseux. Cette régulation distincte est d'ailleurs aisément compréhensible dans un contexte où la femelle doit affronter durant sa vie plusieurs états physiologiques exigeant une forte demande calcique pour l'organisme.

Suite à la réintroduction de la diète initiale déficiente en calcium, les femelles présentent un taux de survie supérieur malgré le fait qu'elles exhibent une chute de la calcémie parallèle à celle des mâles. Ainsi, contrairement à ces derniers, elles résistent mieux à un changement brutal du statut calcique extracellulaire ou encore aux effets de celui-ci sur la stabilité neuromusculaire. Il est bien connu que les estrogènes sont des hormones cardioprotectrices (235). La présence naturelle de ces hormones chez les femelles peut représenter un élément expliquant en partie la résistance accrue de ces dernières face aux conséquences de la redéplétion calcique sur le système cardiovasculaire.

L'effet de la supplémentation en calcium alimentaire sur la phosphatémie est également influencée par le sexe puisque, suite à l'augmentation importante de l'apport calcique, les femelles présentent une chute moins marquée de la concentration circulante de phosphore inorganique que celle observée chez les mâles. Ce résultat suggère que les femelles présentent une meilleure absorption intestinale de phosphore, un phénomène qui peut dépendre de leur statut hormonal sexuel quoique contrairement au calcium (21), aucune étude n'a montré un rôle facilitateur des estrogènes sur l'absorption intestinale de phosphore. En augmentant l'entrée de phosphore dans l'organisme, l'effet chélateur du calcium sur le phosphore survenant dans le tractus gastro-intestinal s'en trouve réduit. De plus, on peut aussi postuler que la réabsorption tubulaire de phosphore peut être facilitée chez la femelle. En effet, la mesure des concentrations sériques de PTH révèlent une

différence significative entre les mâles et les femelles. Ces dernières, que ce soit durant l'hypocalcémie ou au moment de la réplétion calcique, présentent des concentrations circulantes de PTH plus faibles que les mâles. Quoique la phosphaturie n'ait pas été déterminée chez les femelles, les valeurs sériques de PTH suggèrent que l'excrétion urinaire de phosphore pourrait être plus faible chez celles-ci. Toutefois, l'action des estrogènes sur la régulation de certains paramètres associés à l'homéostasie du phosphore tels le co-transporteur NPT_2 révèle une action inhibitrice des hormones sexuelles (236;237). L'utilisation du phosphore pour les besoins de l'organisme peut également être réduite chez les femelles. En effet, une autre différence importante entre les femelles et les mâles réside dans l'effet de la supplémentation de calcium sur la croissance. Contrairement aux mâles qui voient leur croissance stimulée par la prise d'une forte supplémentation de calcium alimentaire, cet effet est absent chez la femelle Ca^{+3} . Cette dernière montre un gain de poids et de surface corporelle similaire aux femelles D-Ca^- . Il a d'ailleurs été précédemment rapporté qu'un ralentissement de la croissance est observable dès l'âge de six semaines chez les femelles (234). La comparaison des apports alimentaires entre ces deux groupes n'a pas non plus révélé de différence pouvant expliquer ceci. Connaissant l'implication du phosphore dans de nombreuses réactions métaboliques pouvant être stimulées lors de la croissance, la réduction moins marquée de la phosphatémie notée chez les femelles après trois jours de réplétion peut aussi être expliquée par une demande moins grande de l'organisme pour ce minéral. Toutefois, l'accrétion minérale osseuse et le gain de DMO sont légèrement augmentées par la prise de la supplémentation en calcium et cet effet est plus marqué chez les femelles que chez les mâles. Des travaux antérieurs ont montré que l'accrétion minérale osseuse des femelles augmentait entre l'âge de six et neuf semaines (234). De plus, certains travaux ont démontré l'effet synergique des estrogènes et du statut calcique sur le gain de masse osseuse (173;238). L'effet des estrogènes sur le

gain de DMO est optimisé en présence d'un statut calcique normal. Les résultats densitométriques obtenus chez les femelles peuvent suggérer que la présence des estrogènes couplée à la supplémentation de calcium alimentaire permet une meilleure accrétion minérale osseuse. D'ailleurs, l'accrétion minérale osseuse observée chez des femelles normocalcémiques du même âge est équivalente ($20\pm 2\%$), ce qui laisse présager que, contrairement aux mâles Ca^{+3} , ce phénomène semble s'être normalisé chez la femelle supplémentée. Globalement, ceci suggère que l'absence de stimulation de la croissance chez les femelles permet une meilleure utilisation du calcium et du phosphore alimentaire afin de combler les besoins de l'organisme et permettre une meilleure minéralisation osseuse. Chez les mâles, l'accroissement des besoins en calcium et en phosphore causé par la stimulation de la croissance couplé à un apport alimentaire déséquilibré en ces deux minéraux affecte directement le ratio sérique de calcium et de phosphore, ce qui altère le processus de minéralisation osseuse et cause l'apparition du rachitisme. Une étude parallèle réalisée dans le cadre de ces travaux a démontré que des mâles infusés par voie sous-cutanée avec du 17β -estradiol et soumis au même protocole de réplétion/redéplétion calcique présentaient une croissance grandement réduite et amélioreraient leur taux de survie suite à la réintroduction de la diète initiale. Toutefois, la caractérisation de la plaque de croissance des os des femelles doit être accomplie pour venir appuyer ces conclusions.

CHAPITRE 3. ANALYSE GLOBALE

Mes travaux de doctorat ont pris le relais de travaux antérieurs qui portaient sur l'influence du statut calcique *in vivo* sur la réalisation de fonctions biologiques nécessitant la voie de signalisation calcique. Mes prédécesseurs avaient conclu en l'implication de l'hypocalcémie chronique dans l'altération de fonctions telles la sécrétion d'insuline et le phénomène de croissance compensatrice du foie (89;225). Ainsi, mes travaux de recherche ont examiné plusieurs paramètres situés en amont de la réalisation des fonctions biologiques et se rapportant à l'homéostasie calcique cellulaire. Nous avons donc vérifié l'impact du statut calcique extracellulaire sur l'entrée de calcium dans la cellule (entrée capacitive), la quantité de calcium retrouvée dans le cytoplasme et dans les réserves calciques, la taille fonctionnelle des réserves et les niveaux d'expression du gène et de la protéine de la calréticuline, la principale protéine de liaison du calcium dans le RE. Ces premiers travaux ont démontré que plusieurs de ces paramètres étaient perturbés par un état hypocalcémique chronique et que de surcroît, la correction de la calcémie par une supplémentation de calcium alimentaire permettaient de corriger ces altérations selon une cinétique de réplétion graduelle. Ainsi, suite à la normalisation du statut calcique extracellulaire, la cellule semble répléter systématiquement ses divers compartiments calciques selon une séquence bien établie. La réplétion calcique cellulaire débute par le contenu calcique cytoplasmique, un compartiment dont le rôle au sein de l'homéostasie calcique est central puisqu'il est le site d'accomplissement de la voie de signalisation calcique. L'accroissement du contenu calcique du cytoplasme active les mécanismes d'entrée du calcium des réserves calciques telles le RE et le noyau pour permettre la réplétion de ces derniers. Finalement, la réplétion calcique du noyau active l'expression génique de gènes dépendants du calcium dont celui de la calréticuline, ce qui se traduit par

une augmentation de l'expression de la protéine nécessaire à la liaison du calcium des réserves du RE nouvellement réplétées et ainsi une normalisation de la taille fonctionnelle des réserves calciques. Toutefois, ce patron de réponse n'est pas observé en situation inverse puisque les hépatocytes issus d'animaux réplétés en calcium puis soumis à une phase de redéplétion calcique ne présentent pas une cinétique de déplétion décroissante. Ces résultats traduisent une robustesse de la réponse homéostatique au statut calcique extracellulaire suite à la réplétion du calcium cellulaire. Nos résultats indiquent que la normalisation des différents paramètres de l'homéostasie calcique extracellulaire en phase de réplétion contribue à assurer les mécanismes cellulaires nécessaires pour faire face à l'éventuel retour de l'état hypocalcémique initial. Certains de ces mécanismes peuvent inclure l'expression du gène de la calréticuline. Quoique l'expression de ce gène n'ait pas été déterminée en période de redéplétion calcique, les résultats obtenus suggèrent que l'expression génique et protéique de la calréticuline demeurent élevées, permettant ainsi le maintien à long terme de la taille fonctionnelle des réserves calciques et l'approvisionnement du compartiment cytoplasmique en calcium au fur et à mesure que l'apport calcique diminue.

L'hépatocyte n'étant pas un modèle cellulaire associé au métabolisme calcique, nous avons réalisé des travaux sur des cellules osseuses afin de vérifier chez l'ostéoblaste, non sans faire quelques distinctions entre les deux types cellulaires, les résultats obtenus chez l'hépatocyte. En effet, les expériences réalisées *in vitro* sur des ostéoblastes en culture primaire ainsi que sur des cellules d'origine ostéoblastique *ROS 17/2.8* ont montré que la mobilisation des réserves calciques cellulaires était hautement dépendante du statut calcique extracellulaire malgré le peu d'influence de ce dernier sur le compartiment cytoplasmique de calcium. Toutefois, l'extrapolation de ces résultats à tous les systèmes cellulaires de l'organisme demeure prématurée. En effet, il a été montré au sein de notre

équipe que l'homéostasie calcique cellulaire des cellules parathyroïdes était également influencée par un état hypocalcémique chronique. Cependant, l'effet est à l'inverse de ce qui est rapporté chez les hépatocytes et les ostéoblastes. Ainsi, les cellules issues d'animaux hypocalcémiques chroniques présentent une élévation de la concentration cytoplasmique basale de calcium comparativement aux cellules provenant d'animaux normocalcémiques. De plus, certains auteurs rapportent que la déficience marginale de calcium accroît les concentrations intracellulaires de calcium et que cette surcharge calcique de la cellule constitue un mécanisme physiopathologique pour un certain nombre de maladies chroniques (82). Ainsi, l'influence du statut calcique extracellulaire sur l'homéostasie calcique de la cellule peut dépendre des besoins du modèle cellulaire analysé mais également du type d'hypocalcémie étudiée. En présence d'un état d'insuffisance en calcium ou d'hypocalcémie aiguë couplé à un statut nutritionnel normal en D, l'homéostasie calcique cellulaire réagit certainement différemment qu'en présence d'un état hypocalcémique chronique secondaire à une carence en D.

La normalisation du statut calcique extracellulaire et de l'hyperparathyroïdie secondaire à l'aide d'une forte dose de calcium alimentaire, la réplétion calcique des divers compartiments cellulaires et l'absence d'une cinétique de redéplétion décroissante chez les cellules issues d'animaux soumis à une phase progressive de privation calcique laissent présumer que l'administration d'une forte dose de calcium alimentaire permet la correction de l'état hypocalcémique chronique malgré un statut nutritionnel en D toujours déficient. Étonnamment, l'instauration rapide, et non progressive, de la diète hypocalcémique initiale a entraîné la mort, dans un délai de cinq jours suivant la réintroduction de la diète, de la totalité des animaux préalablement devenus normocalcémiques. L'investigation plus approfondie des causes sous-jacentes au décès des animaux réplétés avec une forte dose de calcium nous ont permis de constater que ces animaux présentaient une hypophosphatémie

sévère secondaire à la déplétion calcique et que cet état de déficience couplé à une légère stimulation de la croissance avaient causé l'apparition d'un rachitisme chez ces animaux. Ces travaux nous ont d'ailleurs permis de souligner l'importance du phosphore dans le processus de minéralisation de l'os chez le rat mais aussi en amont, soit au sein des chondrocytes de la plaque de croissance. Essentiellement perçu comme l'un des deux principaux éléments des cristaux d'hydroxyapatite de l'os, le phosphore a une importance additionnelle majeure par son implication au sein de plusieurs événements cellulaires précédant la formation de ces cristaux. L'apparition du rachitisme empêche la déplétion normale des réserves osseuses qui deviennent alors inadéquates pour répondre aux besoins calciques durant la phase de privation calcique, besoins qui ne sont plus suffisamment comblés par la diète. Ceci entraîne une chute rapide de la calcémie, l'apparition d'une tétanie hypocalcémique et le décès des animaux. Toutefois, l'utilisation d'une plus faible dose de calcium alimentaire en phase de déplétion ou encore l'ajout de D_3 ou de $1,25(OH)_2D_3$, permet la survie des animaux face à la même situation de déplétion calcique. Ces animaux ne souffrent ni d'hypophosphatémie, ni de rachitisme. Le processus de minéralisation osseuse semble adéquat pour répléter les réserves calciques de l'os et ainsi permettre un efflux de calcium pour soutenir les besoins calciques de l'organisme lors de la phase de privation. Toutefois, l'emploi de D_3 ou de $1,25(OH)_2D_3$ cause une amélioration nettement supérieure de la santé de l'os que l'utilisation d'une plus faible dose de calcium alimentaire. Ces résultats suggèrent que l'utilisation combinée de calcium et de D se révèle optimale pour corriger les perturbations osseuses engendrées par l'état hypocalcémique initial et indiquent un rôle indépendant ou synergique de la D à ce stade. Chez l'humain, il est intéressant de constater le parallèle entre ces travaux et le phénomène de rachitisme du prématuré. Cette maladie caractéristique des nourrissons de très petits poids survient lorsque les apports alimentaires de calcium et de phosphore sont inadéquats

pour soutenir le processus de minéralisation osseuse extrêmement actif *in utero* durant le dernier trimestre de grossesse mais qui, chez les prématurés, se produit *ex utero*. Ce type de rachitisme est également de nature hypophosphatémique. Longtemps délaissé au profit du calcium, le phosphore semble soulever de plus en plus d'intérêt dans la communauté scientifique. En effet, dans une ère caractérisée par l'émergence de thérapies anti-ostéoporotiques anaboliques causant une stimulation de la formation de l'os, il devient primordial de fournir en quantités suffisantes et équilibrées, les deux principaux minéraux qui entrent dans la composition de l'os. Actuellement, la supplémentation de calcium employée avec ou sans D accompagne couramment les traitements pharmacologiques anti-ostéoporotiques. Malgré, une alimentation nord-américaine particulièrement abondante en phosphore, on soulève le problème que cette supplémentation de calcium affecte l'homéostasie du phosphore en réduisant l'absorption intestinale de ce dernier (179). Une hypothèse qui touche particulièrement les personnes âgées, caractérisées pour avoir une alimentation souvent déficiente et qui de plus, sont davantage susceptibles de suivre une thérapie anti-ostéoporotique couplée à une supplémentation de calcium. Une étude récente, réalisée chez des animaux en croissance, a d'ailleurs démontré que l'administration d'un supplément fait d'un complexe de phosphore et de calcium (le calcium diphosphate ou triphosphate) améliorerait plusieurs paramètres reliés à la santé osseuse comparativement à un supplément de carbonate de calcium (232).

Notre société canadienne est caractérisée par un climat nordique qui se traduit par un taux d'ensoleillement réduit sur une période s'étalant d'octobre à avril. Cette particularité géographique a pour conséquence, qu'au Canada, les statuts d'insuffisance ou de déficience en D sont particulièrement prévalents (154;239). Le manque répétitif de D affecte négativement le statut calcique de l'organisme, ce qui peut avoir des conséquences particulièrement nuisibles au sein de sous-groupes de la population générale qui présentent

des besoins calciques plus élevés tels les nourrissons, les enfants en croissance, les femmes enceintes, allaitantes et ménopausées et les personnes âgées. On connaît peu les effets que présentent une alternance chronique d'états réplétés en D et calcium (pendant les mois d'été) avec des états de déplétion marginale (pendant les mois d'hiver). On peut toutefois présumer, qu'à la longue, cela peut, soit fragiliser l'organisme ou encore causer des dommages, non seulement dans l'os, mais au sein de plusieurs autres organes où le calcium intracellulaire est impliqué dans la réalisation de plusieurs fonctions (240). De plus, on mentionne de plus en plus l'importance du calcium et de la D dans la protection contre certains cancers ainsi que dans le contrôle du poids corporel et de la pression artérielle (30;31;241). Il devient donc essentiel de maintenir de façon constante, plutôt que ponctuelle, les statuts nutritionnels de ces deux éléments nutritifs ne serait-ce que dans une optique de prévention des maladies chroniques.

Perspectives futures

Le rachitisme est une maladie osseuse métabolique qui refait apparition depuis quelques années au sein de populations bien précises (91;242). Cette maladie a été largement étudiée au sein du tissu osseux mais beaucoup moins bien caractérisée au sein du cartilage de la plaque de croissance. Des travaux parallèles réalisés en collaboration avec une autre équipe sont actuellement en cours dans le but de mieux définir le rachitisme retrouvé chez nos animaux mâles supplémentés avec une forte dose de calcium alimentaire. En effet, ces travaux complémentaires visent à vérifier l'influence des différentes manipulations nutritionnelles sur l'expression de marqueurs cellulaires du cartilage de la plaque de croissance tels certains types de récepteurs (PTH/PTHrP) et certaines molécules-clés (Indian Hedgehog, PTHrP, collagène de type X). De plus, connaissant l'implication du phosphore dans le phénomène d'apoptose des chondrocytes hypertrophiés de la plaque de croissance, des travaux visant à étudier ce processus sont actuellement en cours. Enfin, la

cinétique cellulaire de la genèse du rachitisme hypophosphatémique n'a jamais été décrite jusqu'à présent dans la littérature. Ainsi, l'étude, à différents temps de réplétion calcique, des marqueurs du cartilage de la plaque de croissance ainsi que de certains indices de la prolifération et de l'apoptose nous permettra alors de comprendre plus précisément la séquence d'évènements moléculaires et cellulaires précédant l'apparition de cette maladie osseuse ainsi que l'implication du calcium, du phosphore et de la D à ces différents stades. On mentionne de plus en plus le lien important qui existe entre le statut nutritionnel de divers nutriments et l'expression génique, une nouvelle discipline mieux connue sous le nom de *génomique nutritionnelle* (243). Ces travaux complémentaires s'inscrivent dans cette nouvelle avenue scientifique puisqu'ils permettront d'investiguer plus en profondeur l'implication et l'importance du statut nutritionnel en calcium, phosphore et D sur l'expression génique de plusieurs molécules au sein de deux tissus encore peu caractérisés dans ce domaine, soit l'os et le cartilage.

CHAPITRE 4. CONCLUSIONS

Ces travaux de recherche nous permettent de conclure que le statut calcique extracellulaire et le système endocrinien de la D sont des régulateurs importants et interdépendants du métabolisme calcique cellulaire et de l'homéostasie osseuse. Toutefois, ils interagissent avec plusieurs autres facteurs modulant ces deux systèmes. Cette conclusion se base sur les observations suivantes :

- 1) Malgré la présence d'un gradient de 1 pour 10000 prévalant entre les milieux extra- et intracellulaire de calcium, l'étude des différents compartiments calciques de la cellule nous révèle que l'homéostasie calcique est fortement influencée par le statut calcique extracellulaire suivant des patrons de réponse bien précis tel que démontré au sein de deux types cellulaires distincts soit l'hépatocyte et l'ostéoblaste.
- 2) Chez des rats carencés en calcium et en D soumis à un protocole de réplétion-redéplétion calcique, l'administration d'une forte dose de calcium alimentaire donnée dans le but de normaliser la calcémie ne permet qu'une correction partielle des perturbations du métabolisme phosphocalcique engendrées par l'état hypocalcémique chronique initial. Elle provoque de surcroît une altération de l'homéostasie osseuse et l'apparition d'un rachitisme hypophosphatémique. L'ajout de vitamine D₃ ou de 1,25(OH)₂D₃ à la supplémentation de calcium alimentaire permet une correction optimale du métabolisme phosphocalcique et osseux.
- 3) La régulation de l'homéostasie phosphocalcique se distingue entre les mâles et les femelles et peut venir expliquer la meilleure résistance de ces dernières face aux situations qui engendrent une plus forte demande calcique à l'organisme.

CHAPITRE 5. BIBLIOGRAPHIE

1. Robertson WG, Marshall RW. Ionized calcium in body fluids. *Crit Rev Clin Lab Sci* 15:85-125,1981.
2. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78:1193-1231,1998.
3. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, Gao P, Cantor T et al. Origin of parathyroid hormone (PTH) fragments detected by intact-PTH assays. *J Endocrinol* 147:123-131,2002.
4. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. Synthetic carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTHrP-related peptide receptor. *Endocrinology* 142:1386-1392,2001.
5. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366:575-580,1993.
6. Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142:5050-5055,2001.
7. Locklin RM, Khosla S, Riggs BL. Mechanisms of biphasic anabolic and catabolic effects of parathyroid hormone (PTH) on bone cells. *Bone* 28:S80,2001.
8. Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 14:690-709, 1993.
9. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 344:1434-1441,2001.
10. Brown JP, Josse RG. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ* 167:S1-S34,2002.
11. Nemere I, Larsson D. Does PTH have a direct effect on intestine ? *J Cell Biochem* 86:29-34,2002.
12. Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall REH, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237:893-896,1987.
13. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev* 18:832-872,1997.

14. Kobayashi T, Chung U, Schipani E, Starbuck M, Karsenty G, Katagiri T et al. PTHrP and Indian hedgehog control differentiation of growth plate chondrocytes at multiple steps. *Development* 129:2977-2986,2002.
15. Strewler GJ. The physiology of parathyroid hormone-related protein. *N Engl J Med* 342:177-185,2000.
16. Fiaschi-Taesch NM, Stewart AF. Minireview: parathyroid hormone-related protein as an intracrine factor-trafficking mechanisms and functional consequences. *Endocrinology* 144:407-411,2003.
17. Marx SJ, Woodard CJ, Aurbach GD. Calcitonin receptors of kidney and bone. *Science* 178:999-1001,1972.
18. Brown EM, Macleod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Res* 81:239-297,2001.
19. Pahuja DN. Stimulation of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization by prolactin in vitamin D-deficient rats. *Science* 214:1038-1039,1981.
20. Ostrom KM. A review of the hormone prolactin during lactation. *Prog Food Nutr Sci* 14:1-43,1990.
21. Prince RL. Counterpoint: estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. *Endocrine Rev* 15:301-309,1994.
22. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23:279-302,2002.
23. Brown EM. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Am J Med* 106:238-253,1999.
24. Chattopadhyay N, Brown EM. Cellular sensing of extracellular calcium (Ca^{2+o}): emerging roles in regulating diverse physiological functions. *Cell Signal* 12:361-366,2000.
25. Canaff L, Petit JL, Kisiel M, Watson PH, Gascon-Barré M, Hendy GN. Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes. Coupled to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow. *J Biol Chem* 276:4070-4079,2001.
26. Garner SC, Pi M, Tu Q, Quarles DL. Rickets in cation-sensing receptor-deficient mice: an unexpected skeletal phenotype. *Endocrinology* 142:3996-4005,2001.
27. Purroy J, Spurr NK. Molecular genetics of calcium sensing in bone cells. *Human Mol Genetics* 11:2377-2384,2002.
28. Quarles LD. Cation sensing receptors in bone: a novel paradigm for regulating bone remodeling? *J Bone Mineral Res* 12:1971-1974,1997.

29. Shoback D, Chang W. Starvation amidst plenty-rickets and hypercalcemia in calcium receptor knockout mice. *Endocrinology* 142:3733-3735,2001.
30. Heaney RP. Ethnicity, bone status, and the calcium requirement. *Nutr Res* 33:153-178,2002.
31. Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 13:1132-1138,2000.
32. Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Lappe JM, Barger-Lux MJ, Rafferty K et al. Calcium intake and body weight. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4635-4638,2000.
33. Neylon CB, Hoyland J, Mason WT, Irvine RF. Spatial dynamics of intracellular calcium in agonist-stimulated vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 259:C675-C686,1990.
34. Missiaen L, Robberecht W, VanDen Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F et al. Abnormal intracellular calcium homeostasis and disease. *Cell Calcium* 28:1-21,2000.
35. Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36:107-260,2001.
36. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, DeSmet P et al. Calcium signalling-an overview. *Sem Cell Dev Biol* 12:3-10,2001.
37. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nature Cell Biol* 4:E263-E272,2002.
38. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108:595-598,2002.
39. Penner R, Fasolato C, Hoth M. Calcium influx and its control by calcium release. *Curr Opin Neurobiol* 3:368-374,1993.
40. Randriamampita C, Tsien RY. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. *Nature* 364:809-814,1993.
41. Taylor CW. Controlling calcium entry. *Cell* 111:767-769,2002.
42. Elliott AC. Recent developments in non-excitabile cell calcium entry. *Cell Calcium* 30:73-93,2001.
43. Shuttleworth TJ. What drives calcium entry during $[Ca^{2+}]_i$ oscillation? - Challenging the capacitative model. *Cell Calcium* 25:237-246,1999.
44. Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM. EcaC: the gatekeeper of transepithelial Ca^{2+} transport. *Biochem Biophys Acta* 1600:6-11,2002.

45. Hoenderop JGJ, Muller D, VanDer Kemp AWCM, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K et al. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 12:1342-1349,2001.
46. Hoenderop JGJ, Dardenne O, VanAbel M, VanDer Kemp AWCM, VanOs CH, St-Arnaud R et al. Modulation of renal Ca^{2+} transport protein genes by dietary Ca^{2+} and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 in 25-hydroxyvitamin D_3 -1 α -hydroxylase knockout mice. *FASEB J* 16:1398-1406,2002.
47. Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10:322-328,2000.
48. Berridge M. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 316:1-15,2002.
49. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21,2000.
50. Galione A, Churchill GC. Interactions between calcium release pathways: multiple messengers and multiple stores. *Cell Calcium* 324:1-12,2002.
51. Guse AH. Cyclic ADP-ribose. *J Mol Med* 78:26-35,2000.
52. Ikehata F, Satoh J, Nata K, Tohgo A, Nakazawa T, Kato I et al. Autoantibodies against CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) that impair glucose-induced insulin secretion in noninsulin-dependent diabetes patients. *J Clin Invest* 102:395-401,1998.
53. Chini EN, De Toledo FG. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate: a new intracellular second messenger? *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1191-C1198,2002.
54. Camello P, Gardner J, Petersen OH, Tepikin AV. Calcium dependence of calcium extrusion and calcium uptake in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol* 490:585-593,1996.
55. Michalak M, Parker JMR, Opas M. Ca^{2+} signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 322:1-10,2002.
56. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH et al. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 144:857-868,1999.
57. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol* 11:122-129,2001.
58. Zhu N, Pewitt B, Cai X, Cohn EB, Lang S, Chen R et al. Calreticulin: an intracellular Ca^{++} -binding protein abundantly expressed and regulated by androgen in prostatic epithelial cells. *Endocrinology* 139:4337-4344,1998.

59. Conway EM, Liu L, Nowakowski B, Steiner-Mosonyi M, Ribeiro SP, Michalak M. Heat shock-sensitive expression of calreticulin. *In vitro* and *in vivo* up-regulation. *J Biol Chem* 270:17011-17016,1995.
60. McCauliffe DP, Yang YS, Wilson J, Sontheimer RD, Donald Capra J. The 5'-flanking region of the human calreticulin gene shares homology with the human GRP78, GRP94, and protein disulfide isomerase promoters. *J Biol Chem* 267(4):2557-2562,1992.
61. Waser M, Masaeli N, Spencer C, Michalak M. Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *J Cell Biol* 138:547-557,1997.
62. Pozzan T, Magalhaes P, Rizzuto R. The comeback of mitochondria to calcium signalling. *Cell Calcium* 28:279-283,2000.
63. Jouaville LS, Ichas F, Mazat JP. Modulation of cell calcium signals by mitochondria. *Mol Cell Biochem* 184:371-376,1998.
64. Hardingham GE, Bading H. Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression. *Microsc Res Tech* 46:348-355,1999.
65. Malviya AN, Rogue PJ. "Tell me where is calcium bred: clarifying the roles of nuclear calcium". *Cell* 92:17-23,1998.
66. Hardingham GE, Bading H. Nuclear calcium: a key regulator of gene expression. *BioMetals* 11:345-358,1998.
67. Mellstrom B, Naranjo JR. Mechanisms of Ca^{2+} -dependent transcription. *Curr Opin Neurobiol* 11:312-319,2001.
68. Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium* 23:131-134,1998.
69. Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858,1997.
70. Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 17:5298-5308,1998.
71. Surroca A, Wolff D. Inositol 1,4,5,-triphosphate but not ryanodine-receptor agonists induced calcium release from rat liver Golgi apparatus membrane vesicles. *J Membr Biol* 177:243-249,2000.
72. Meldolesi J, Madeddu L, Pozzan T. Intracellular Ca^{2+} storage organelles in non-muscle cells: heterogeneity and functional assignment. *Biochem Biophys Acta* 1055:130-140,1990.

73. Petersen OH, Burdakov D, Tepikin AV. Polarity in intracellular calcium signaling. *BioEssays* 21:851-860,1999.
74. Berridge MJ. The biology and medicine of calcium signalling. *Mol Cell Endocrin* 98:119-124,1994.
75. Berridge M, Lipp P, Bootman M. Calcium signalling. *Curr Biol* 9:R-157-R-159,1999.
76. Tordjmann T, Combettes L, Claret M. Foie et calcium intracellulaire. *Hepato-Gastro* 7:185-192,2000.
77. Nathanson MH, Schlosser SF. Calcium signaling mechanisms in liver in health and disease. *Progr Liver Dis* 14:1-27,1996.
78. Wurzinger R, Englisch R, Roka S, Langer R, Roden M, Graf J. Intracellular calcium in the isolated rat liver: correlation to glucose release, K⁺ balance and bile flow. *Cell Calcium* 30:403-412,2001.
79. Francis MJO, Lees RL, Trujillo E, Martin-Vasallo P, Heersche JNM, Mobasheri A. ATPase pumps in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 34:459-476,2002.
80. Gunter TE, Zuscik MJ, Puzas JE, Gunter KK, Rosier RN. Cytosolic free calcium concentrations in avian growth plate chondrocytes. *Cell Calcium* 11:445-457,1990.
81. Zuscik MJ, D'Souza M, Gunter KK, Gunter TE, O'Keefe RJ, Schwarz EM et al. Growth plate chondrocyte maturation is regulated by basal intracellular calcium. *Exp Cell Res* 276:310-319,2002.
82. Fujita T, Palmieri GMA. Calcium paradox disease: calcium deficiency prompting secondary hyperparathyroidism and cellular calcium overload. *J Bone Mineral Res* 18:109-125,2000.
83. Pettifor JM, ross fp, Travers R, Glorieux FH, DeLuca HF. Dietary calcium deficiency: a syndrome associated with bone deformities and elevated serum 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations. *Metab Bone Dis Rel Res* 2:301-305,1981.
84. Salmon P, Rees JRP, Flanagan M, O'Moore R. Hypocalcemia in a mother and rickets in an infant associated with a zen macrobiotic diet. *Ir J Med Sci* 150:192-193,1981.
85. Carpenter TO, Insogna KL. The hypocalcemic disorders: differential diagnosis and therapeutic use of vitamin D. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, editors. *Vitamin D*. San Diego: Academic Press, 923-936, 1997.
86. Guise TA, Mundy GR. Clinical review 69: Evaluation of hypocalcemia in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1473-1478,1995.

87. Ste-Marie LG. Hypocalcémie. Troubles du métabolisme osseux: classification, diagnostic et traitement. Editions Grosvenor Inc., 53-63, 1994.
88. Johnson LE, DeLuca HF. Reproductive defects are corrected in vitamin D-deficient female rats fed a high calcium, phosphorus and lactose diet. *J Nutr* 132:2270-2273,2002.
89. Beaulieu C, Kestekian R, Havrankova J, Gascon-Barré M. Calcium is essential in normalizing intolerance to glucose that accompanies vitamin D depletion in vivo. *Diabetes* 42:35-43,1993.
90. Minamitani N, Chihara K, Iwasaki J, Matsukura S, Fujita T. Attenuation by hypocalcemia of pulsatile growth hormone secretion in conscious male rats. *Neuroendocrinology* 35:401-410,1982.
91. Pettifor JM. Rickets. *Calcif Tissue Int* 70:398-399,2002.
92. Marie PJ, Pettifor JM, Ross FP, Glorieux FH. Histological osteomalacia due to dietary calcium deficiency in children. *N Engl J Med* 307:584-588,1982.
93. Thacher TD, Fischer PR, Pettifor JM, Lawson JO, Isichei CO, Reading JC et al. A comparison of calcium, vitamin D, or both for nutritional rickets in Nigerian children. *N Engl J Med* 341:563-568,1999.
94. Mayne PD, Kovar IZ. Calcium and phosphorus metabolism in the premature infant. *Ann Clin Biochem* 28:131-142,1991.
95. Campbell DE, Fleischman AR. Rickets of prematurity: controversies in causation and prevention. *Clin Perinatology* 15:879-890, 1988.
96. Oyatsi DPO, Musoke RN, Wasunna AO. Incidence of rickets of prematurity at Kenyatta National Hospital, Nairobi. *East African Medical Journal* 76:63-66,1999.
97. Salle BL, Delvin EE, Lapillonne A, Bishop NJ, Glorieux FH. Perinatal metabolism of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 71:1317S-1324S, 2000.
98. Sagy M, Birenbaum E, Balin A, Orda S, Barzilay MD, Brish M. Phosphate-depletion syndrome in a premature infant fed human milk. *J Pediatr* 96:683-685,1980.
99. Markestad T, Aksnes L, Finne PH, Aarskog D. Plasma concentrations of vitamin D metabolites in a case of rickets of prematurity. *Acta Paediatr Scand* 72:759-761,1983.
100. Holland PC, Wilkinson AR, Diez J, Lindsell DRM. Prenatal deficiency of phosphate, phosphate supplementation, and rickets in very-low-birthweight infants. *Lancet* 335:697-701,1990.

101. Kovar IZ, Mayne PD, Robbé I. Hypophosphataemic rickets in the preterm infant: hypocalcaemia after calcium and phosphorus supplementation. *Arch Dis Child* 58:629-631,1983.
102. Lester GE, VanderWiel CJ, Kenney Gray T, Talmage RV. Vitamin D deficiency in rats with normal serum calcium concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4791-4794,1982.
103. Stauffer M, Baylink D, Wergedal J, Rich C. Decreased bone formation, mineralization, and enhanced resorption in calcium-deficient rats. *Am J Physiol* 225:269-276,1973.
104. Howard GA, Baylink DJ. Matrix formation and osteoid maturation in vitamin D-deficient rats made normocalcemic by dietary means. *Miner Electrolyte Metab* 3:44-50,1980.
105. Drivdahl RH, Liu CC, Baylink DJ. Regulation of bone repletion in rats subjected to varying low-calcium stress. *Am J Physiol* 246:R190-R196,1984.
106. Haddad JG, Jennings AS, Choon Aw T. Vitamin D uptake and metabolism by perfused rat liver: Influences of carrier proteins. *Endocrinology* 123:498-504,1988.
107. Van den Berg H. Bioavailability of vitamin D. *Eur J Clin Nutr* 51:S76-S79,1997.
108. Theodoropoulos C, Demers C, Delvin E, Ménard D, Gascon-Barré M. Calcitriol regulates the expression of the gene encoding all three vitamin D3 hydroxylases and the drug metabolizing enzyme CYP3A4 in the human fetal intestine. *Clin Endocrinol*(58):489-499,2003.
109. St-Arnaud R, Arabian A, Travers R, Barletta F, Raval-Pandya M, Depovere CK et al. Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 141:2658-2666,2000.
110. St-Arnaud R. Novel findings about 24,25-dihydroxyvitamin D: an active metabolite? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8:435-441,1999.
111. Gascon-Barré M. Is there any physiological significance to the enterohepatic circulation of vitamin D sterols? *J Am Coll Nutr* 5:317-324,1986.
112. Clements MR, Chalmers TM, Fraser DR. Enterohepatic circulation of vitamin D: A reappraisal of the hypothesis. *Lancet* 1:1376-1379,1986.
113. Racz A, Barsony J. Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. *J Biol Chem* 274:19352-19360,1999.
114. Prüfer K, Racz A, Lin GC, Barsony J. Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. *J Biol Chem* 275:41114-41123,2000.

115. Wheeler DG, Horsford J, Michalak M, White JH, Hendy GN. Calreticulin inhibits vitamin D₃ signal transduction. *Nucl Acid Res* 23:3268-3274,1995.
116. Haussler MR, Witfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Mineral Res* 13:325-349,1998.
117. Nemere I, Pietras RJ, Blackmore PF. Membrane receptors for steroid hormones : signal transduction and physiological significance. *J Cell Biochem* 88:438-445,2003.
118. Nemere I, Dormanen MC, Hammond MW, Okamura WH, Norman AW. Identification of a specific binding protein for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J Biol Chem* 269:23750-23756,1994.
119. Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C. *J Bone Mineral Res* 13:1353-1359,1998.
120. Boyan BD, Bonewald LF, Sylvia VL, Nemere I, Larsson D, Norman AW et al. Evidence for distinct membrane receptors for 1 α ,25(OH)₂D₃ and 24R,25(OH)₂D₃ in osteoblasts. *Steroids* 67:235-246,2002.
121. Lieberherr M. Effects of vitamin D₃ metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J Biol Chem* 262:13168-13173,1987.
122. Baran DT, Sorensen AM, Honeyman TW, Ray R, Holick MF. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-induced increments in hepatocyte cytosolic calcium and lysophosphatidylinositol: inhibition by pertussis toxin and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *J Bone Miner Res* 5:517-524,1990.
123. Baran DT, Sorensen AM, Shalhoub V, Owen T, Oberdorf A, Stein G et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ rapidly increases cytosolic calcium in clonal rat osteosarcoma cells lacking the vitamin D receptor. *J Bone Mineral Res* 6:1269-1275,1991.
124. Sergeev IN, Rhoten WB, Spirichev VB. Vitamin D and intracellular calcium. Quinn and Kagan (Eds). *Subcellular biochemistry, Fat-soluble vitamins*. Plenum Press New York, NY 30:271-297,1998.
125. Pedrozo HA, Schwartz Z, Rimes S, Sylvia VL, Nemere I, Posner GH et al. Physiological importance of the 1,25(OH)₂D₃ membrane receptor and evidence for a membrane receptor specific for 24,25(OH)₂D₃. *J Bone Mineral Res* 14:856-867,1999.
126. Bronner F, Pansu D. Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr* 129:9-12,1999.

127. Hoenderop JG, Hartog A, Stuiver M, Coudet A, Willems PHGM, Bindels RJM. Localization of the epithelial Ca^{2+} channel in rabbit kidney and intestine. *J Am Soc Nephrol* 11:1171-1178,2000.
128. Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J. Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1287-1294,2001.
129. Norman AW. Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormone-mediated adaptive response. *Am J Clin Nutr* 51:290-300,1990.
130. Norman AW. Rapid biological responses mediated by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 : a case study of transcaltachia (rapid hormonal stimulation of intestinal calcium transport. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike WJ, editors. *Vitamin D*. San Diego: 233-256, 1997.
131. Hoenderop JGJ, Willems PHGM, Bindels RJM. Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption. *Am J Physiol* 278:F352-F360,2000.
132. Kumar R. Vitamin D and kidney. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike WJ, editors. *Vitamin D*. San Diego: Academic Press, 275-292, 1997.
133. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357,1999.
134. Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y, Yamato H, Fukumoto S, Sekine K et al. Stimulation of osteoclast formation by $1,25$ -dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* 140:1005-1008,1999.
135. Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol* 246:E493-E498,1984.
136. Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R et al. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: Formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* 140:4982-4987,1999.
137. Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R et al. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139:4391-4396,1998.
138. Balsan S, Garabédian M, Larchet M, Gorski AM, Cournot G, Tau C et al. Long-term nocturnal calcium infusion can cure rickets and promote normal mineralization in hereditary resistance to $1,25$ -dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest* 77:1661-1667,1986.

139. Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 : implications in cell growth and differentiation. *Endocr Rev* 23:763-786,2002.
140. Holick MF. Vitamin D: a millenium perspective. *J Cell Biochem* 88:296-307,2003.
141. Chatterjee M. Vitamin D and genomic stability. *Mutat Res* 475:69-88,2001.
142. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84:223-230,2003.
143. Carswell S. Vitamin D in the nervous system: actions and therapeutic potential. In: Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, editors. *Vitamin D*. Academic Press, 1197-1211, 1997.
144. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *TEM* 13:100-105,2002.
145. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 16:391-396,1997.
146. Janssen HCJP, Samson MM, Verhaar HJJ. Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people. *Am J Clin Nutr* 75:611-615,2002.
147. Malaanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 351:805-806,1998.
148. Walters MR, Kollenkirchen U, Fox J. What is vitamin D deficiency? *Proc Soc Exp Biol Med* 199:385-393,1992.
149. Eastwood JB. Normal plasma- $1,25$ -(OH) $_2$ -vitamin-D concentrations in nutritional osteomalacia. *Lancet* 1:1377-1378,1979.
150. Fuleihan GEH, Nabulsi M, Choucair M, Salamoun M, Shahine CH, Kizirian A et al. Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics* 107:1-7,2001.
151. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 112:659-662,2002.
152. Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 76:187-192,2002.
153. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT et al. Hypovitaminosis D in medical in patients. *N Engl J Med* 338:777-783,1998.

154. Vieth R, Cole DE, Hawker GA, Trang HM, Rubin LA. Wintertime vitamin D insufficiency is common in young Canadian women, and their vitamin D intake does not prevent it. *Eur J Clin Nutr* 55:1091-1097,2001.
155. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 22:477-501,2001.
156. Malloy PJ, Pike JW, Feldman D. The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocrine Rev* 20:156-188,1999.
157. Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R et al. Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9831-9835,1997.
158. Sakai Y, Kishimoto J, Demay MB. Metabolic and cellular analysis of alopecia in vitamin D receptor knockout mice. *J Clin Invest* 107:961-966,2001.
159. Chen CH, Sakai Y, Demay MB. Targeting expression of the human vitamin D receptor to the keratinocytes of vitamin D receptor null mice prevents alopecia. *Endocrinology* 142:5386-5389,2001.
160. Jan de Beur SM, Levine MA. Molecular pathogenesis of hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2467-2473,2002.
161. Mansfield K, Rajpurohit R, Shapiro IM. Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. *J Cell Physiol* 179:276-286,1999.
162. Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone* 27:359-366, 2000.
163. Boyan BD, Schwartz Z, Boskey AL. The importance of mineral in bone and mineral research. *Bone* 27:341-342,2000.
164. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L et al. Nongenotropic sex-non specific signaling through the estrogen and androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104:719-730,2001.
165. Heaney R. Bone biology in health and disease: a tutorial. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross CA, editors. *Modern nutrition in health and disease*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1327-1338, 1999.
166. Einhorn TA. The bone organ system: Form and function. In: Marcus, Feldman, Kelsey (Eds). *Osteoporosis* Academic Press, San Diego, CA:3-22,1996.
167. Heinegård D, Hultenby K, Oldberg Å, Reinholt F, Wendel M. Macromolecules in bone matrix. *Connective Tissue Research* 21:3-14,1989.

168. Miller SC, Jee WSS. The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int* 41:1-5,1987.
169. Hattner R, Epker BN, Frost HM. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature* 206:489-490,1965.
170. Khosla S. Oestrogen, bones and men: when testosterone just isn't enough. *Clin Endocrinol* 56:291-293,2002.
171. Compston J. Local biosynthesis of sex steroids in bone. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5398-5400,2002.
172. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241:84-86,1988.
173. Nieves JW, Komar L, Cosman F, Lindsay R. Calcium potentiates the effect of estrogen and calcitonin on bone mass: review and analysis. *Am J Clin Nutr* 67:18-24,1998.
174. Mundy GR, Boyce BF, Yoneda T, Bonewald LF, Roodman GD. Cytokines and bone remodeling. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press, 301-313, 1996.
175. Canalis E. Skeletal growth factors. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press, 261-279, 1996.
176. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, Looker A, Marcus R, Matkovic V et al. Peak bone mass. *Osteoporosis Int* 11:985-1009,2000.
177. Recker RR. Antifracture efficacy of calcium in elderly women. *J Bone Miner Res* 9, 135. 1994.
178. Heaney RP, Nordin BEC. Calcium effects on phosphorus absorption: implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 21, 239-244. 2002.
179. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. *Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and Fluoride*. Washington, DC: National Academy Press, 87-89, 1997.
180. Papadimitropoulos E, Wells G, Shea B, Gillespie W, Weaver B, Zytaruk N et al. Meta-analysis of the efficacy of vitamin D treatment in preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev* 23:560-569,2002.
181. Shea B, Wells G, Cranney A, Zytaruk N, Robinson V, Griffith L et al. Meta-analysis of calcium supplementation for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev* 23:552-559,2002.

182. Peacock M, Liu G, Carey M, McClintock R., Ambrosius W, Hui S et al. Effect of calcium or 25OH vitamin D₃ dietary supplementation on bone loss at the hip in men and women over the age of 60. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3011-3019,2000.
183. Burckhardt P, Lamy O. Vitamin D and its metabolites in the treatment of osteoporosis. *Osteoporosis Int* 8:S40-S44,1998.
184. Fekanich D, Singh V, Willett WC, Colditz GA. Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. *JAMA* 287:47-54, 2002.
185. Promislow JHE, Goodman-Gruen D, Slymen DJ, Barrett-Connor E. Retinol intake and bone mineral density in the elderly: The Rancho Bernardo study. *J Bone Mineral Res* 17:1349-1358,2002.
186. Anderson JJB. Oversupplementation of vitamin A and osteoporotic fractures in the elderly: to supplement or not to supplement with vitamin A. *J Bone Mineral Res* 17:1359-1362,2002.
187. Rohde CM, Manatt M, Clagett-Dame M, DeLuca HF. Vitamin A antagonizes the action of vitamin D in rats. *J Nutr* 129:2246-2250, 1999.
188. Johansson S, Melhus H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. *J Bone Mineral Res* 16:1899-1905,2001.
189. Weber P. Vitamin K and bone health. *Nutrition* 17:880-887,2001.
190. Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 71:1201-1208,2000.
191. Booth SL, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Hannan MT, McLean RR et al. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr* 77:512-516,2003.
192. Feskanich D, Weber P, Willett WC, Rockett H, Booth SL, Colditz GA. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 69:74,1999.
193. Bolton-Smith C, Mole PA, McMurdo MET, Paterson CR, Shearer MJ. Two-year intervention with phylloquinone (vitamin K₁), vitamin D and calcium effect on bone mineral content of older women. *Ann Nutr Metab* 45:46,2001.
194. Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 24:27-37,2003.
195. Sojka JE, Weaver CM. Magnesium supplementation and osteoporosis. *Nutr Rev* 53:71-80,1995.
196. Rude RK, Oldham SB, Singer FR. Functional hypoparathyroidism and parathyroid hormone end-organ resistance in human Mg deficiency. *Clin Endocrinol* 5:209-224,1976.

197. Rude RK, Adams JS, Ryzen E, Endres DB, Niimi H, Horst RL et al. Low serum concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in human magnesium deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 61:933-940,1985.
198. Clark PJ, Eastell R, Barker ME. Zinc supplementation and bone growth in pubertal girls. *Lancet* 354:485,1999.
199. Jonas J, Burns J, Abel EW, Cresswell MJ, Strain JJ, Paterson CR. Impaired mechanical strength of bone in experimental copper deficiency. *Ann Nutr Metab* 37:245-252,1993.
200. Baker A, Harvey L, Majask-Newman G, Fairweather-Tait S, Flynn A, Cashman K. Effect of dietary copper intakes on biochemical markers of bone metabolism in healthy adult males. *Eur J Clin Nutr* 53:408-412,1999.
201. Eastell R, Lambert H. Diet and healthy bones. *Calcif Tissue Int* 70:400-404,2002.
202. Heany RP. Protein intake and bone health: the influence of belief systems on the conduct of nutritional science. *Am J Clin Nutr* 73:5-6,2001.
203. Massey LK. Dietary animal and plant protein and human bone health: a whole foods approach. *J Nutr* 133:862S-865S,2003.
204. Hannan MT, Tucker KL, Dawson-Hughes B, Cupples LA, Felson DT, Kiel DP. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women. *J Bone Miner Res* 15:2504-2512,2000.
205. Ammann P, Bourrin S, Bonjour JP, Meyer JM, Rizzoli R. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-1 levels and estrogen deficiency. *J Bone Mineral Res* 15:683-690,2000.
206. Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68:133S-1346S,1998.
207. Setchell KD. Soy isoflavones-benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 20:354s-362s,2001.
208. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW. Soy protein and isoflavones: effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68:1375S-1379S,1998.
209. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Steward JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72:844-852,2000.
210. Erdman JW, Stillman RJ, Boileau RA. Provocative relation between soy and bone maintenance. *Am J Clin Nutr* 72:679-680,2000.
211. Albertazzi P. Purified phytoestrogens in postmenopausal bone health: is there a role for genistein? *Climacteric* 5:190-196,2002.

212. Éthier C, Goupil D, Demers C, Hendy GN, Gascon-Barré M. Hypocalcemia, regardless of the vitamin D status, decreases epidermal growth factor receptor density and autophosphorylation in rat livers. *Endocrinology* 133:780-792,1993.
213. Shimbara N, Takashina M, Sato C, Iizuka M, Kobayashi S, Tanaka K et al. c-myc expression is down-regulated by cell-cell and cell-extracellular matrix contacts in normal hepatocytes, but not in hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 184:825-831,1992.
214. Gascon-Barré M, Haddad P, Provencher SJ, Bilodeau S, Pecker F, Lotersztajn S et al. Chronic hypocalcemia of vitamin D deficiency leads to lower resting intracellular calcium concentrations in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 93:2159-2167,1994.
215. Gascon-Barré M, Petit JL, Éthier C, Bilodeau S. Vitamin D depletion perturbs intracellular calcium homeostasis. In: Norman AW, Bouillon R, Thomasset M, editors. *Vitamin D. Chemistry, Biology and Clinical Applications of the Steroid Hormone*. Strasbourg, France: Vitamin D Workshop, Inc., 755-756, 1997.
216. Mailhot G, Petit JL, Demers C, Gascon-Barré M. Influence of the *in vivo* calcium status on cellular calcium homeostasis and the level of the calcium binding protein calreticulin in rat hepatocytes. *Endocrinology* 141:891-900,2000.
217. Demers C, Hatami A, Hendy GN, D'Amour P, Bilodeau S, Gascon-Barré M. Involution of secondary hyperparathyroidism in the nutritional model of vitamin D depletion in the rat. *Proceedings of the 10th Workshop on Vitamin D* , 234. 1997. Ref Type: Abstract
218. Lajeunesse D, Busque L, Ménard P, Brunette MG, Bonny Y. Demonstration of an osteoblast defect in two cases of human malignant osteopetrosis. Correction of the phenotype after bone marrow transplant. *J Clin Invest* 98(8):1835-1842,1996.
219. Hilal G, Massicotte F, Martel-Pelletier J, Fernandes JC, Pelletier JP, Lajeunesse D. Endogenous prostaglandin E₂ and insulin-like growth factor 1 can modulate the levels of parathyroid hormone receptor in human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Mineral Res* 16:713-721,2001.
220. Majeska RJ, Rodan SB, Rodan GA. Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology* 107:1494-1503,1980.
221. Boland R. Role of vitamin D in skeletal muscle function. *Endocr Rev* 7:434-438,1986.
222. Gascon-Barré M, Petit JL, Éthier C, Bilodeau S. Hypocalcemia modifies the intracellular calcium response to the α_1 -adrenergic agent phenylephrine in rat hepatocytes. *Cell Calcium* 22:343-356,1997.
223. Mailhot G, Petit JL, Demers C, Gascon-Barré M. Kinetics of calcium supplementation in calcium deficiency: *in vitro* and *in vivo* studies. *Eleventh Workshop on Vitamin D* , 196. 2000.

224. Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, KH1060. *Endocrinology* 136:866-872,1995.
225. Bilodeau M, Provencher S, Néron S, Haddad P, Vallières S, Gascon-Barré M. Hypocalcemia decreases the early and late responses to epidermal growth factor in rat hepatocytes. *Hepatology* 21:1576-1584,1995.
226. Erben RG. Embedding of bone samples in methylmethacrylate: an improvement method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 40:307-313,1997.
227. Theuns HM, Bekker H, Fokkenrood H, Offerman E. Methyl-methacrylate embedding of undecalcified rat bone and simultaneous staining for alkaline and tartrate resistant acid phosphatase. *Bone* 14:545-550,1993.
228. Goldner J. A modification of the Masson Trichrome Technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol* 14:247-249,1938.
229. Sanchez CP, Kuizon BD, Abdella PA, Juppner H, Salusky IB, Goodman WG. Impaired growth, delayed ossification, and reduced osteoclastic activity in the growth plate of calcium-supplemented rats with renal failure. *Endocrinology* 141:1536-1544,2000.
230. Dardenne O, Prud'Homme J, Hacking A, Glorieux FH, St-Arnaud R. Rescue of the pseudo-vitamin D deficiency rickets phenotype of CYP27B1-deficient mice by treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Biochemical, histomorphometric, and biomechanical analyses. *J Bone Mineral Res* 18:637-643,2003.
231. Dardenne O, Prud'Homme J, Hacking SA, Glorieux FH, St-Arnaud R. Correction of the abnormal mineral ion homeostasis with a high-calcium, high-phosphorus, high-lactose diet rescues the PDDR phenotype of mice deficient for the 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase (CYP27B1). *Bone* 32:332-340,2003.
232. Shapiro R, Heaney RP. Co-dependence of calcium and phosphorus for growth and bone development under conditions of varying deficiency. *Bone* 32:532-540,2003.
233. Donohue MM, Demay MB. Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology* 143:3691-3694,2002.
234. Thomas ML, Forte LR. Sex, differences during the development of vitamin D deficiency in the rat: serum parathyroid hormone, calcitonin, calcium, and phosphorus. *Endocrinology* 109:1528-1532,1981.
235. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346:340-352,2002.
236. Dousa TP. Modulation of renal Na-Pi cotransport by hormones acting via genomic mechanism and by metabolic factors. *Kidney Int* 49:997-1004,1996.

237. Beers KW, Thompson MA, Chini EN, Dousa TP. Beta-estradiol inhibits Na⁺-P(i) cotransport across renal brush border membranes from ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 16:442,1996.
238. Aloia JF, Vaswani A, Yeh JK, Ross PL, Flaster E, Dilmanian FA. Calcium supplementation with and without hormone replacement therapy to prevent postmenopausal bone loss. *Ann Intern Med* 120:97-103,1994.
239. Rucker D, Allan JA, Fick GH, Hanley DA. Vitamin D insufficiency in a population of healthy western Canadians. *CMAJ* 166:1517-1524,2002.
240. Zemel MB. Nutritional and endocrine modulation of intracellular calcium: Implications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 188:129-136,1998.
241. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *Am J Clin Nutr* 54:193S-201S,1991.
242. Bishop N. Rickets today - Children still need milk and sunshine. *N Engl J Med* 341:602-604,1999.
243. Dworkin J, Losick R. Linking nutritional status to gene activation and development. *Genes Dev* 15:1051-1054,2001.

ANNEXE 1

TABLEAU COMPARATIF DES ANIMAUX PRIVÉS DE VITAMINE D DE PREMIÈRE ET DEUXIÈME GÉNÉRATION

PARAMÈTRES FONCTIONNELS	D-Ca- DE PREMIÈRE GÉNÉRATION (MODÈLE D'INSUFFISANCE)	D-Ca- DE DEUXIÈME GÉNÉRATION (MODÈLE DE DÉFICIENCE)	RÉFÉRENCES
Fertilité	1. Fertilité réduite chez les femelles et infertilité chez les mâles 2. Nombre réduit de ratons par portée 3. Hypogonadisme chez la femelle et le mâle	Non-investiguée	<i>Mailhot G et coll. Résultats non-publiés</i>
Croissance	1. Retard de croissance, taille réduite, prise de poids ralentie 2. Sécrétion subnormale d'hormone de croissance sérique	1. Mortalité néonatale élevée (mâles > femelles) 2. Retard de croissance (++) , taille réduite (++) , prise de poids ralentie (++)	<i>Mailhot G et coll. (2^e manuscrit) et résultats non publiés</i>
Fonction hépatique	Transaminases : AST ↑, ALT normale	Non-investiguée	<i>Résultats non-publiés Gmailhot</i>
BIOCHIMIQUES			
Système endocrinien de la vitamine D			
25(OH)D sérique	Non-déTECTABLE (<15 ng/mL)	Non-déTECTABLE	<i>Mailhot G et coll. (2^e manuscrit) et résultats non publiés</i>
1,25(OH) ₂ D ₃	Faible	< D-Ca- première génération	
Activité enzymatique		Non-investiguée	18.
1 hydroxylase rénale	↑↑		
25 hydroxylase hépatique	Activité très faible		
24 hydroxylase rénale	Activité très faible		
Homéostasie phosphocalcique			
Calcium ionisé sérique	↓ (suite au sevrage)	↓ (durant l'allaitement)	<i>Mailhot G et coll. (2^e manuscrit) et résultats non publiés</i>
Phosphore inorganique sérique	↑	N	
Parathormone (1-84) sérique	↑	↑↑	
Calcium	↓	Non-investiguée	
Phosphaturie	↑	Non-investiguée	

CELLULAIRES			
Homéostasie du calcium intracellulaire Concentration cytoplasmique basal Mobilisation des réserves cellulaires calciques Expression du gène et de la protéine de la calréticuline Fonctions biologiques associées : Sécrétion d'insuline Croissance compensatrice hépatique	↓ ↓ ↓ Insulinopénie ↓	N ↓ ↓ Fonctions non-investiguées	4,7. <i>Mailhot G et coll. (1^{er} manuscrit) et résultats non publiés</i> 9, 6,11.
Homéostasie osseuse CMO/DMO Fonction ostéoblastique -Phosphatase alcaline sérique Volume/Surface d'ostéoïde Fonction ostéoclastique Vitesse de minéralisation osseuse Plaque de croissance	↓ >N ↑↑ ↑↑ N ND N	Sous les limites de détection de l'appareil Analyse histomorphométrique non-effectuée Plaque de croissance non-investiguée	<i>Mailhot G et coll. (2^e manuscrit) et résultats non publiés</i>

N : normal, ND : non-déTECTABLE,

