

Université de Montréal

**Rôle du système para-orphelin de la vitamine D dans l'intestin**

par

Josée Bolduc

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

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

décembre, 2005

© Josée Bolduc, 2005



W

4

U58

2006

v. 042

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle du système para-orphelin de la vitamine D dans l'intestin

présenté par :

Josée Bolduc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Stéphane Roy : président-rapporteur

Marielle Gascon-Barré : directrice de recherche

Jean-Pierre Villeneuve : membre du jury

## RÉSUMÉ

Dernièrement, des effets du système endocrinien de la vitamine D<sub>3</sub> impliquant des voies de signalisation normalement empruntées par des récepteurs orphelins ont été découverts. Ce système, avec la participation du récepteur à la vitamine D<sub>3</sub> (VDR<sub>n</sub>), cible le système digestif et exhibe des propriétés inductrices de cytochromes P450 (CYP3A/2B). L'objectif de cette étude est de 1) vérifier l'implication du VDR<sub>n</sub> dans la modulation de l'expression des *CYP3A11/CYP2B10*, à l'aide de souris de types VDR<sup>+/+</sup> et VDR<sup>-/-</sup> soumis à une diète normale (D+) et 2) l'implication de la vitamine D<sub>3</sub> ou de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dans la régulation de ces cytochromes, en soumettant les souris à une diète carencée en vitamine D (D-). Chaque groupe a reçu soit le véhicule (basal), l'acide lithocholique (ALC), le 16 $\alpha$ -carbonitrile pregnane pregnenolone (PCN), la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou une combinaison de ceux-ci. Les expressions géniques des cytochromes *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* ont été analysées par analyse de Northern. Nos résultats montrent que la carence en vitamine D diminue significativement l'expression des *CYP3A* et *CYP2B* intestinaux. Cet effet peut être contré partiellement par l'activation du récepteur PXR (pregnane X receptor) et totalement lorsque la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> est administrée conjointement à la carence. L'induction du *CYP3A* par l'ALC nécessite la participation du VDR<sub>n</sub> et la présence de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou d'un agoniste du PXR. Les progrès accomplis permettent de comprendre l'importance du rôle para-orphelin du système endocrinien de la vitamine D dans la modulation des cytochromes P450.

**Mots clés :** 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, récepteur à la vitamine D, acide lithocholique, CYP3A11, CYP2B10

## SUMMARY

Recently, new effects of the vitamin D endocrine system using signaling pathways normally used by orphan receptors were discovered. This system with the participation of the vitamin D receptor ( $VDR_n$ ) has the digestive system for principal target and has the capacity to induce cytochromes P450 (CYP3A/2B). Objectives of the study are 1) to evaluate the role of  $VDR_n$  in the modulation of *CYP3A11/CYP2B10* gene expression, with animals  $VDR^{+/+}$  and  $VDR^{-/-}$  receiving a normal diet (D+) and 2) to evaluate the role of the vitamin D or the  $1,25(OH)_2D_3$  in the regulation of gene expression with animals receiving a vitamin D deficient diet (D-). Each group received the vehicle (basal), lithocholic acid (LCA),  $16\alpha$ - carbonitrile pregnane pregnenolone (PCN), the  $1,25(OH)_2D_3$  or the combined mix of these products. Gene expressions were evaluated by Northern analysis. Our results show that vitamin D deficiency diminishes significantly the intestinal *CYP3A11* and *CYP2B10* gene expression. The activation of PXR (pregnane X receptor) may reduce partially the impact of vitamin D deficiency or completely if  $1,25(OH)_2D_3$  was administered concomitantly with PCN. The *CYP3A11* induction by LCA needs the obligatory participation of the  $VDR_n$  and the presence of  $1,25(OH)_2D_3$  or of a PXR agonist. These observations shed new light on the importance of the role of the vitamin D endocrine and orphan receptor systems in the modulation of P450 gene expression.

**Keys words:**  $1,25(OH)_2D_3$ , vitamin D receptor, lithocholic acid, CYP3A11, CYP2B10

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES TABLEAUX .....	X
LISTE DES FIGURES .....	XI
LISTE DES SIGLES .....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XV
REMERCIEMENTS .....	XVI
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1. Métabolisme des endobiotiques et des xénobiotiques .....	2
1.1 Les cytochromes P450 .....	2
1.1.1 Mode d'action .....	4
1.1.2 Les gènes <i>CYP3A</i> .....	5
1.1.3 Les gènes <i>CYP2B</i> .....	7
1.2 Les récepteurs nucléaires orphelins .....	8
1.2.1 Le récepteur PXR .....	9
1.2.2 Le récepteur CAR .....	11
2. Système endocrinien de la vitamine D .....	14
2.1 Introduction .....	14
2.2 Métabolisme de la vitamine D .....	14
2.2.1 Les sources de vitamine D .....	14
2.2.2 Bioactivation de la vitamine D .....	16
A) La D-25 hydroxylase ( <i>CYP27A1</i> ) .....	18
B) La 25OHD-1 $\alpha$ hydroxylase ( <i>CYP27B1</i> ) .....	19
2.2.3 Catabolisme de la vitamine D .....	20
2.3 Modes d'action .....	21

2.3.1	Le récepteur nucléaire de la vitamine D .....	21
2.3.2	Le récepteur membranaire de la vitamine D .....	25
2.3.3	Fonctions traditionnelles biologiques de la vitamine D .....	25
	A) Actions génomiques .....	25
	B) Actions non-génomiques .....	26
2.3.4	Fonctions non traditionnelles de la vitamine D .....	27
2.4	Altérations de l'homéostasie du système endocrinien de la vitamine D .....	28
	2.4.1 Hypervitaminose D <sub>3</sub> .....	28
	2.4.2 Déficience nutritionnelle en vitamine D .....	28
	2.4.3 Déficience d'origine génétique .....	29
	A) Chez l'homme .....	29
	B) Chez l'animal .....	31
3.	Rôle du système para-orphelin de la vitamine D .....	33
	3.1 Implication du VDR <sub>n</sub> dans l'expression génique des <i>CYP</i> par la 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	33
	3.2 Implication du VDR <sub>n</sub> dans l'expression génique du <i>CYP3A4</i> par l'acide lithocholique (ALC) .....	34
4.	Prémice et hypothèse .....	36
	4.1 Prémice .....	36
	4.2 Hypothèse .....	36
5.	Objectifs .....	37
<b>CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....		38
6.	Protocole expérimental .....	39
	6.1 Modèle animal .....	39
	6.1.1 La souris de type sauvage (VDR <sup>+/+</sup> ) .....	39
	6.1.2 La souris de type VDR <sup>-/-</sup> .....	40
	6.2 Diète .....	40



6.2.1	Diète normale .....	42
6.2.2	Diète carencée en vitamine D <sub>3</sub> .....	43
6.3	Traitements .....	43
6.3.1	Gavage .....	45
6.3.2	Administration de 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	45
6.3.3	Sacrifices .....	46
6.4	Analyses des concentrations sériques de calcium ionisé (Ca <sup>2+</sup> ) .....	46
6.5	Analyses relatives à l'évaluation de l'expression génique .....	46
6.5.1	Extraction des ARN .....	46
6.5.2	Synthèse d'ADNc .....	47
6.5.3	Réaction de PCR .....	48
6.5.4	Électrophorèse et transfert de Northern .....	50
6.5.5	Synthèse des sondes .....	51
6.5.6	Hybridation de transfert Northern .....	51
6.6	Analyses statistiques .....	54
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS .....</b>		<b>56</b>
Note	.....	56 B
7. Résultats	.....	57
7.1	Caractérisation du modèle animal .....	57
7.1.1	Concentrations sériques de calcium .....	57
7.1.2	Caractérisation de l'expression génique des <i>CYP3A11</i> , <i>CYP2B10</i> et <i>CYP24</i> intestinaux à l'état basal chez les souris de type VDR <sup>+/+</sup> et VDR <sup>-/-</sup> normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-) .....	59
7.2	Effets de divers inducteurs sur l'expression génique du <i>CYP3A11</i> intestinal chez les souris de type VDR <sup>+/+</sup> et VDR <sup>-/-</sup> normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-) .....	62

7.2.1 Chez l'animal de type VDR <sup>+/+</sup> au statut nutritionnel normal (D+) .....	62
7.2.2 Chez l'animal de type VDR <sup>+/+</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-) .....	65
7.2.3 Chez l'animal de type VDR <sup>-/-</sup> au statut nutritionnel normal (D+) .....	65
7.2.4 Chez l'animal de type VDR <sup>-/-</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-) .....	66
7.2.5. Résumé de l'effet des traitements sur l'ensemble des animaux .....	66
7.3 Effet de divers inducteurs sur l'expression génique du cytochrome <i>CYP2B10</i> intestinal chez les souris de type VDR <sup>+/+</sup> et VDR <sup>-/-</sup> normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-) .....	67
7.3.1 Chez l'animal de type VDR <sup>+/+</sup> au statut nutritionnel normal (D+) .....	70
7.3.2 Chez l'animal de type VDR <sup>+/+</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-) .....	70
7.3.3 Chez l'animal de type VDR <sup>-/-</sup> au statut nutritionnel normal (D+) .....	71
7.3.4 Chez l'animal de type VDR <sup>-/-</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-) .....	71
7.3.5. Résumé de l'effet des traitements sur l'ensemble des animaux .....	72
7.4. Effets de divers inducteurs sur l'expression génique du <i>CYP24</i> intestinal chez les souris de type VDR <sup>+/+</sup> et VDR <sup>-/-</sup> normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-) .....	72
7.4.1 Chez l'animal de type VDR <sup>+/+</sup> au statut nutritionnel normal (D+) .....	73

7.4.2 Chez l'animal de type VDR <sup>+/+</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-) .....	76
7.4.3 Chez l'animal de type VDR <sup>-/-</sup> au statut nutritionnel normal (D+) et carencé en vitamine D (D-) .....	76
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>77</b>
8. Discussion .....	78
9. Conclusion .....	86
<b>CHAPITRE V : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>88</b>
10. Références .....	89

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1	
Résumé des diètes.....	42
Tableau 2	
Résumé des traitements.....	44
Tableau 3	
Description des séquences d'amorces.....	49
Tableau 4	
Description des programmes PCR (synthèse de fragments ADNc).....	49
Tableau 5	
Description des conditions et des tampons d'hybridations.....	53
Tableau 6	
Description des conditions d'hybridations pour chacune des sondes.....	53

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1.	
Fonctions métaboliques et homéostatiques du système endocrinien de la vitamine D .....	17
Figure 2.	
Modèle schématique de l'action de la 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> contrôlée par son récepteur nucléaire, le VDR <sub>n</sub> (récepteur à la vitamine D) .....	23
Figure 3.	
Résumé schématique du modèle animal et des diètes .....	41
Figure 4.	
Effet de la carence en vitamine D sur les concentrations sériques de calcium ionisé (Ca <sup>2+</sup> ) à l'état basal chez la souris de type VDR <sup>+/+</sup> et VDR <sup>-/-</sup> normale (D+) ou carencée en vitamine D (D-) .....	58
Figure 5.	
Effet de la carence en vitamine D sur l'expression génique des <i>CYP3A11</i> (A), <i>CYP2B10</i> (B) et <i>CYP24</i> (C) à l'état basal dans l'intestin de souris de type VDR <sup>+/+</sup> et VDR <sup>-/-</sup> normale (D+) ou carencée en vitamine D (D-) .....	61

## Figure 6.

Expression génique du *CYP3A11* intestinal suite au traitement de divers inducteurs dans l'intestin de souris de type VDR<sup>+/+</sup> et VDR<sup>-/-</sup> normale (D+) ou carencée en vitamine D (D-) .....64

## Figure 7.

Expression génique du *CYP2B10* intestinal suite au traitement de divers inducteurs dans l'intestin de souris de type VDR<sup>+/+</sup> et VDR<sup>-/-</sup> normale (D+) ou carencée en vitamine D (D-) .....69

## Figure 8.

Expression génique du *CYP24* intestinal suite au traitement de divers inducteurs dans l'intestin de souris de type VDR<sup>+/+</sup> et VDR<sup>-/-</sup> normale (D+) ou carencée en vitamine D (D-) .....75

## LISTE DES SIGLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN <sub>c</sub>	ADN complémentaire
ALC	Acide lithocholique
ARN	Acide ribonucléique
CAR	Récepteur constitutif aux androstanes
cpm	counts per minute
CYP	Cytochrome P450
dCTP	Déoxycytosine-triphosphate
DBD	DNA binding domain
E.T.	Erreur-type
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
IU	International units
I.V.	Intraveineuse
Kb	Kilobase
LBD	Ligand binding domain
N-CoR	Nuclear receptor corepressor
N.D.	Non déterminé
N.S.	Non-significatif
PCN	Pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile
PCR	Réaction en chaîne de polymérase
PTH	Parathormone
PXR	Récepteur X aux pregnanes
RARE	Élément de réponse de l'acide rétinoïque
RIA	Radioimmunoassay
RT	Reverse transcriptase
RXR	Récepteur X aux rétinoïdes

SMRT	Silencing mediator of retinoid and thyroid receptor
SXR	Récepteur X aux stéroïdes et xénobiotiques
TBE	Tris/Borate/EDTA
UV	Ultraviolet
VDR	Récepteur à la vitamine D
VDRE	Élément de réponse du récepteur à la vitamine D



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$1\alpha\text{OHD}_3$	1- $\alpha$ hydroxyvitamine D <sub>3</sub>
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1,25-dihydroxyvitamine D <sub>3</sub>
$1,24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	1,24,25-trihydroxyvitamine D <sub>3</sub>
$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	24,25-dihydroxyvitamine D <sub>3</sub>
$25(\text{OH})\text{D}_3$	25-hydroxyvitamine D <sub>3</sub>
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium ionisé
D-	Animal carencé en vitamine D <sub>3</sub>
CYP	Cytochrome P-450
CYP27A1	Vitamine D <sub>3</sub> -25 hydroxylase ou 25 hydroxylase
CYP27B1	25OHD <sub>3</sub> -1- $\alpha$ hydroxylase ou 1- $\alpha$ hydroxylase
D <sub>3</sub>	Vitamine D <sub>3</sub>
Dex	Dexaméthasone
P	Degré de probabilité d'erreur
P450	Pigment 450
PB	Phénobarbital
PCN	Pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile
PG	Propylène glycol
VDR <sup>+/+</sup>	Souris de type sauvage
VDR <sup>-/-</sup>	Souris dont le récepteur à la vitamine D (VDR <sub>n</sub> ) est inactif

## REMERCIEMENTS

Je souhaite d'abord remercier le Docteur Marielle Gascon-Barré de m'avoir accueillie au sein de son équipe et supervisée tout au long de ma maîtrise. Je remercie particulièrement Christian Demers pour son soutien technique dans tous les aspects de mon projet ainsi que Jean-Luc Petit pour sa précieuse aide notamment en ce qui concerne la manipulation des animaux. Je remercie également les autres étudiants pour l'aide qu'ils m'ont apportée. Cela a été un réel plaisir de travailler dans cette équipe.

**CHAPITRE I**  
**INTRODUCTION**

# **1. MÉTABOLISME DES ENDOBIOTIQUES ET DES XÉNOBIOTIQUES**

Bien que le foie soit le principal organe responsable du métabolisme des endobiotiques et des xénobiotiques par l'intermédiaire des cytochromes P450, ces enzymes sont également exprimées dans l'intestin et le rein. La membrane cellulaire constitue une barrière efficace qui protège la cellule des xénobiotiques hydrosolubles, la plupart d'entre eux étant éliminés par le rein. En revanche, les substances liposolubles peuvent traverser la membrane cellulaire et ainsi s'accumuler dans la cellule et exercer leur effet biologique (endobiotiques) ou pharmacologique (xénobiotiques). Ces substances doivent être transformées en métabolites plus hydrosolubles afin de permettre leur élimination de l'organisme et éviter ainsi leur accumulation (1).

## **1.1 Les cytochromes P450**

Les cytochromes P450 jouent des rôles clés dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, dans l'activation et la détoxification de plusieurs médicaments et de différents contaminants environnementaux, dans le métabolisme des acides gras polyinsaturés (acide arachidonique et les prostaglandines) et des acides

biliaires ainsi que dans l'activation des vitamines A et D<sub>3</sub> en hormones actives (1,2).

Ces enzymes se retrouvent associées aux membranes du réticulum endoplasmique lisse ou des mitochondries et forment la superfamille des cytochromes P450 (CYP). La transcription génique des cytochromes P450 est modulée par différents composés qui peuvent être ou non le substrat de l'enzyme induite. Bien que l'induction de ces cytochromes semble être un avantage dans la plupart des cas, elle peut, également, être associée à diverses conséquences pharmacologiques et/ou toxicologiques telles que l'altération de l'efficacité d'un médicament, l'interaction entre différents médicaments et l'activation métabolique de procarcinogènes (3).

C'est Klingenberg en 1958 qui a signalé l'existence, chez le rat, de la présence d'un pigment qui, lorsque complexé au monoxyde de carbone, présente un pic d'absorption à 450 nm, d'où le nom de cytochrome P450 (P pour pigment) (4). Ces enzymes sont caractérisées par un groupement hème indispensable à leur fonctionnement. L'humain possède 19 familles de cytochromes P450 dont parmi elles seulement les trois premières CYP1, CYP2 et CYP3 sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques.

### 1.1.1 Mode d'action

La biotransformation des composés par les cytochromes P450 s'effectue grâce à deux types de réactions, soit les réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse (phase I) et les réactions de conjugaison (phase II). Tous les cytochromes contiennent un atome de fer à l'intérieur d'un groupe hème. Cet atome de fer utilise les électrons pour charger un atome d'oxygène, alors hautement réactif, qui provoque différents changements sur le composé. Les réactions d'oxydations ont pour but de greffer un groupement polaire (-OH, -COOH, -SH<sub>2</sub>, *etc.*) sur une molécule afin d'augmenter son hydrosolubilité. Selon les molécules, la greffe de groupements polaires par les CYP peut diminuer la toxicité ou, au contraire, produire des métabolites réactifs potentiellement toxiques. Les réactions de conjugaison permettent la liaison sur les molécules oxydées de molécules endogènes hydrosolubles tels l'acide glucuronique, le glutathion, les sulfates et les acides aminés. Elles modifient ainsi l'activité pharmacologique des médicaments et augmentent leur hydrosolubilité favorisant ainsi leur élimination dans la bile ou par le rein. Ces transformations facilitent donc leur évacuation de l'organisme par une excrétion rénale ou hépatique.

### 1.1.2 Les gènes *CYP3A*

Parmi les différents cytochromes P450 exprimés dans le foie et l'intestin, la famille la plus répandue est celle des CYP3A (30-60%). L'isoenzyme CYP3A4 est la plus abondante chez l'humain alors que chez la souris c'est le CYP3A11 (90-91). Cette enzyme est responsable du métabolisme de 50% des médicaments présentement utilisés ainsi que d'une variété de différents composés incluant les hormones stéroïdiennes, les toxines et les carcinogènes. L'expression du CYP3A dans le foie est principalement localisée dans les hépatocytes de la région centrilobulaire ou péricentrale. Dans l'intestin, son expression se fait au niveau de l'épithélium. En plus du foie et de l'intestin grêle, on retrouve le CYP3A dans le rein, l'estomac, le poumon, dans certaines cellules sanguines (neutrophiles, lymphocytes), le pancréas, le colon et le rectum. Les principaux substrats endogènes du CYP3A4 sont les stéroïdes. Chez l'adulte, la principale voie d'inactivation de la testostérone, de la progestérone, de l'androstenedione et du cortisol s'effectue par une 6 $\alpha$ -hydroxylation catalysée par le CYP3A4 (5). De plus, le CYP3A4 est impliqué dans l'hydroxylation des acides biliaires, de l'acide lithocholique (ALC) et de l'acide taurochenodeoxycholique (TCDC) (6,7). Chez les rongeurs, l'acide lithocholique est également hydroxylé par les membres de la sous-famille des CYP3A (8).

L'expression génique du *CYP3A4* peut être induite par une grande diversité de substances exogènes tels que la dexaméthasone, la rifampicine, le phénobarbital (PB), l'agent antifongique clotrimazole, *etc* (9). Des différences marquées du potentiel d'induction ou d'inhibition de différentes substances ont été observées entre les espèces. Par exemple, le PCN est un fort inducteur du CYP3A chez le rat (*CYP3A23*) et la souris (*CYP3A11*), par contre chez l'homme et le lapin, il a très peu d'effets sur l'induction du CYP3A. Le mifépristone induit le CYP3A chez l'homme et la souris mais n'a pas d'effet chez le rat et le lapin. La rifampicine induit le CYP3A chez l'humain mais pas chez les rongeurs. Des études ont démontré que plusieurs mécanismes d'inductions enzymatiques sont conservés entre les espèces. Ces études suggèrent que les différences observées sont plutôt dues à des différences au niveau du domaine de liaison du ligand (LBD) des récepteurs nucléaires orphelins (1,10,11).

L'expression génique du *CYP3A* peut également être inhibée par certaines substances telles le kétoconazole, l'érythromycine, par certains constituants du jus de pamplemousse le furanocoumarine bergamottin et le flavanone naringine. L'inhibition du CYP3A en combinaison avec la prise de médicaments métabolisés par cette enzyme peut entraîner des conséquences graves et même se révéler fatale (12,81).



L'expression et l'activité des CYP3A varient d'un individu à l'autre. Ainsi un dysfonctionnement du CYP3A chez certains individus pourrait les prédisposer à différents cancers causés par des carcinogènes environnementaux normalement métabolisés par ce cytochrome P450 (12).

### 1.1.3 Les gènes *CYP2B*

On a longtemps pensé que le CYP2B jouait un rôle mineur dans le métabolisme des xénobiotiques. Cependant, de récentes études ont permis l'identification de différences ethniques dans l'expression génique du *CYP2B*, l'identification de nouveaux substrats (possiblement partagés avec CYP3A) et suggèrent également que l'activation transcriptionnelle du *CYP2B* est régulée par des mécanismes similaires à ceux affectant le *CYP3A* (13). Le premier gène de la famille des cytochromes *CYP2B* a été cloné et séquencé dans les années 1980. Depuis ce temps, l'induction des gènes de la famille *CYP2B* par le phénobarbital (PB) a été démontrée chez le rat (*CYP2B1* et *CYP2B2*), chez la souris (*CYP2B9* et *CYP2B10*) et chez l'homme (*CYP2B6*) (3). Un élément de réponse au PB (PBREM, pour phenobarbital-responsive enhancer module) contenant un motif DR4 a été identifié dans la région promotrice ses gènes répondant au PB (1). Le CYP2B est responsable du métabolisme de 30% des médicaments présentement utilisés.

## 1.2 Les récepteurs nucléaires orphelins

Les récepteurs nucléaires appartiennent à la superfamille des facteurs de transcriptions qui inclut les récepteurs aux stéroïdes, aux rétinoïdes et à l'hormone thyroïdienne. Les membres de cette famille possèdent des structures communes telles une portion variable N-terminale, une région centrale hautement conservée servant à la liaison à l'ADN, le DBD (DNA-binding domain) composé de deux doigts de zinc et d'un site de liaison du ligand, le LBD (ligand-binding domain) dans la région C-terminale. Généralement, un récepteur nucléaire possède deux sites d'activation transcriptionnelle, le AF-1 (activation function 1) dans la région N-terminale et le AF-2 dans la région C-terminale. La liaison du ligand au LBD entraîne un changement de conformation au site AF-2 ce qui déstabilise l'interaction des corépresseurs (N-CoR et SMRT) et permet ainsi l'interaction de coactivateurs de la transcription (protéines de la famille SRC-1). Le récepteur activé stimule alors l'expression génique de gènes cibles par liaison à leur élément de réponse (11,14).

Le génome humain contient 48 récepteurs nucléaires; ces protéines sont catégorisées en deux groupes selon le statut de leur ligand (88). Le premier groupe comprend les récepteurs pour les hormones endocrines classiques incluant les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les estrogènes, les androgènes, la progestérone, l'hormone thyroïdienne, la vitamine D et tous les

acides trans-rétinoïques. Le second groupe comprend des récepteurs nucléaires possédant un très haut degré d'homologie avec les récepteurs nucléaires classiques. Cependant, pour ces derniers, aucun ligand physiologique n'a encore été identifié; ils sont donc nommés comme récepteurs « orphelins ». Parmi ceux-ci, les récepteurs PXR et CAR agissent dans la défense de l'organisme contre les endobiotiques et les xénobiotiques toxiques en stimulant la synthèse de gènes impliqués dans le métabolisme des composés potentiellement toxiques, les *CYP3A* et *CYP2B*.

### 1.2.1 Le récepteur PXR

C'est en 1998 que le récepteur PXR (pregnane X receptor) a été identifié comme senseur des xénobiotiques, régulant l'expression des gènes *CYP3A*. Le PXR interagit avec les éléments de réponse des gènes cibles par une hétérodimérisation avec le RXR (retinoid X receptor). Plusieurs études ont démontré l'importance du PXR dans l'induction de l'expression génique du *CYP3A*. En effet, le PXR et le *CYP3A* sont tous deux hautement exprimés dans le foie et l'intestin. De plus, le PXR est activé par presque tous les xénobiotiques et autres composés qui activent le *CYP3A* car le PXR se lie au promoteur du *CYP3A* (DR-3 et ER-6) (15). Le PXR induit également un

second cytochrome impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques, le CYP2B, mais jusqu'à maintenant très peu d'études lui ont été accordées.

Le PXR a été nommé ainsi parce qu'il est inductible par le pregnenolone et ses dérivés (incluant le PCN chez les rongeurs), par les glucocorticoïdes synthétiques, la progestérone, le cortisol, la cortisone, l'estradiol, la dihydrotestostérone, *etc.* Le PXR a été cloné chez le rat (16), le lapin (17), la souris (18) et chez l'homme (19). Le PXR est toujours localisé dans le noyau et il existe une corrélation directe entre la liaison de son ligand et l'activation du PXR. L'hétérodimérisation du PXR avec le RXR permet l'activation des XREM (DR3 et ER6) dans la région promotrice des gènes *CYP3A*. Le PXR possède la même configuration générale que les récepteurs nucléaires mais son LBD est plus large et composé de résidus hydrophobes pouvant accommoder les substrats lipophiles (11).

Le catabolisme du cholestérol produit les acides biliaires, et malgré leur fonction bénéfique, une accumulation en excès d'acides biliaires peut entraîner des dommages irréversibles au foie et une cholestase. Le récepteur PXR a été identifié comme senseur de l'ALC. Il joue ainsi un rôle essentiel dans la détoxification des acides biliaires (11). Cependant, lorsque l'ALC est administré à la souris *PXR<sup>-/-</sup>*, une induction hépatique de l'expression du *CYP3A* est encore discernable, suggérant l'implication d'autres récepteurs

nucléaires (20). Les sujets humains souffrant de prurit secondaire à une augmentation des niveaux sériques des acides biliaires sont traités à la rifampicine, un inducteur du PXR. Des études ont démontré que l'utilisation du PCN ou l'activation génique du PXR étaient suffisantes pour conférer une résistance à la toxicité de l'ALC (11). Le prétraitement des souris de type sauvage au PCN leur apporte une protection contre les dommages hépatiques causés par l'ALC alors que le prétraitement au PCN de souris PXR<sup>-/-</sup> ne leur apporte aucune protection contre cet acide biliaire secondaire hépatotoxique (21). Chez la souris PXR<sup>-/-</sup>, aucune induction du *CYP3A11* hépatique n'a été remarquée suivant le traitement au PCN et à la dexaméthazone (11,14,22).

### 1.2.2 Le récepteur CAR

Le récepteur CAR (constitutive androstane receptor) a été cloné en 1994 et a d'abord été caractérisé comme un activateur constitutif des éléments de réponse de l'acide rétinoïque (RARE). C'est la découverte que son activité constitutive pouvait être inhibée par des antagonistes tels les métabolites de l'androstane qui a permis son identification comme récepteur aux xénobiotiques. Le premier rôle du CAR en tant que récepteur aux xénobiotiques régulant l'expression des gènes du *CYP2B* fut démontré en 1998, à l'aide d'un agoniste du CAR, le phénobarbital (PB) (11). Le CAR a été

cloné chez la souris, le rat, le singe et l'homme (1). Le récepteur nucléaire CAR complexé sous forme d'hétérodimère avec le RXR lie l'ADN et active la transcription génique de façon constitutive. L'inhibition de son activité par l'androstanol ou l'androsténol s'exerce par une dissociation du complexe (CAR-RXR)-DNA du coactivateur SRC-1. En présence de PB, la liaison des métabolites androstanes est abolie et l'activité constitutive reprend (23). Ce complexe CAR-RXR, en plus de reconnaître les éléments de réponse RARE, peut également reconnaître les éléments de réponse PBRE (phenobarbital response element) des gènes *CYP2B* (15). Le complexe CAR-RXR peut également lier les XREM (DR3 et ER6) présents dans la région promotrices des gènes *CYP* (11). Des études ont démontré que le CAR est principalement localisé dans le cytoplasme des cellules du foie (à l'exception des cellules HepG2) et que sa translocation au niveau du noyau est dépendante de la liaison du ligand. Les mécanismes régulant son induction/répression n'ont pas encore été élucidés. Les hormones stéroïdiennes exercent des effets divergents sur le CAR, en effet l'estrone et le 17 $\beta$ -estradiol l'activent alors que la progestérone, les androgènes et les androstanoles ont plutôt un effet inhibiteur. Cette sensibilité aux stéroïdes du CAR pourrait contribuer au dimorphisme sexuel retrouvé dans l'expression génique du *CYP2B* chez la souris (1).

Des études chez la souris  $CAR^{-/-}$  ont démontré que l'induction de l'expression génique du *CYP2B10* par le PB est bien dépendante du récepteur CAR dans le foie et l'intestin (1,3).

Une autre caractéristique fonctionnelle du PXR et du CAR est le chevauchement des gènes qui sont régulés par ces récepteurs. Ainsi le PXR peut réguler les gènes du *CYP2B* et le CAR peut réguler ceux du *CYP3A*. Ce mécanisme de réaction croisée serait lié aux éléments de réponse DR3 et ER6 que les deux récepteurs partagent (11,12,13). Un phénomène compensatoire pourrait donc s'exercer lors d'une dysfonction de l'un ou l'autre des récepteurs (1). Comme dans le cas du PXR, un prétraitement par un inducteur du récepteur CAR confère une résistance à l'ALC, effet non retrouvé chez la souris  $CAR^{-/-}$  (20). Des études ont identifié le CAR comme senseur de l'ALC, cependant, chez la souris  $CAR^{-/-}$ , une induction de l'expression du *CYP3A* est observée suivant l'administration de l'ALC (20). Une souris  $PXR^{-/-}CAR^{-/-}$  a donc été générée afin d'étudier l'implication de ces deux récepteurs dans l'induction du *CYP3A* et du *CYP2B* par l'ALC. Aucune augmentation de l'expression du *CYP2B* n'a été observée chez la souris  $PXR^{-/-}CAR^{-/-}$ , ce résultat était cependant attendu puisque cette réponse étant également abolie chez la  $CAR^{-/-}$ . L'expression du *CYP3A* est significativement atténuée chez la souris  $PXR^{-/-}CAR^{-/-}$  mais demeure cependant présente (20).

## **2. SYSTÈME ENDOCRINIEN DE LA VITAMINE D**

### **2.1 Introduction**

La vitamine D, nommée ainsi parce qu'elle fut d'abord associée à une carence nutritionnelle entraînant le rachitisme, est plus une hormone qu'une vitamine. Ce séco-stéroïde inerte provenant de l'alimentation ou synthétisé par l'organisme doit subir deux étapes métaboliques spécifiques catalysées par des enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP) afin d'acquérir son potentiel hormonal. Son principal rôle est le maintien de l'homéostasie phospho-calcique nécessaire à la formation et à la croissance normale des os.

### **2.2 Métabolisme de la vitamine D**

#### **2.2.1 Les sources de vitamine D**

La vitamine D (D) est un composé liposoluble, inactif à l'état naturel. Elle existe sous deux formes : le cholécalciférol ou vitamine D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>) (d'origine animale et dérivé du cholestérol) et l'ergocalciférol ou vitamine D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>) (d'origine végétale et dérivé de l'ergostérol). La principale source de vitamine D est endogène, elle n'est donc pas réellement une vitamine. La synthèse de la

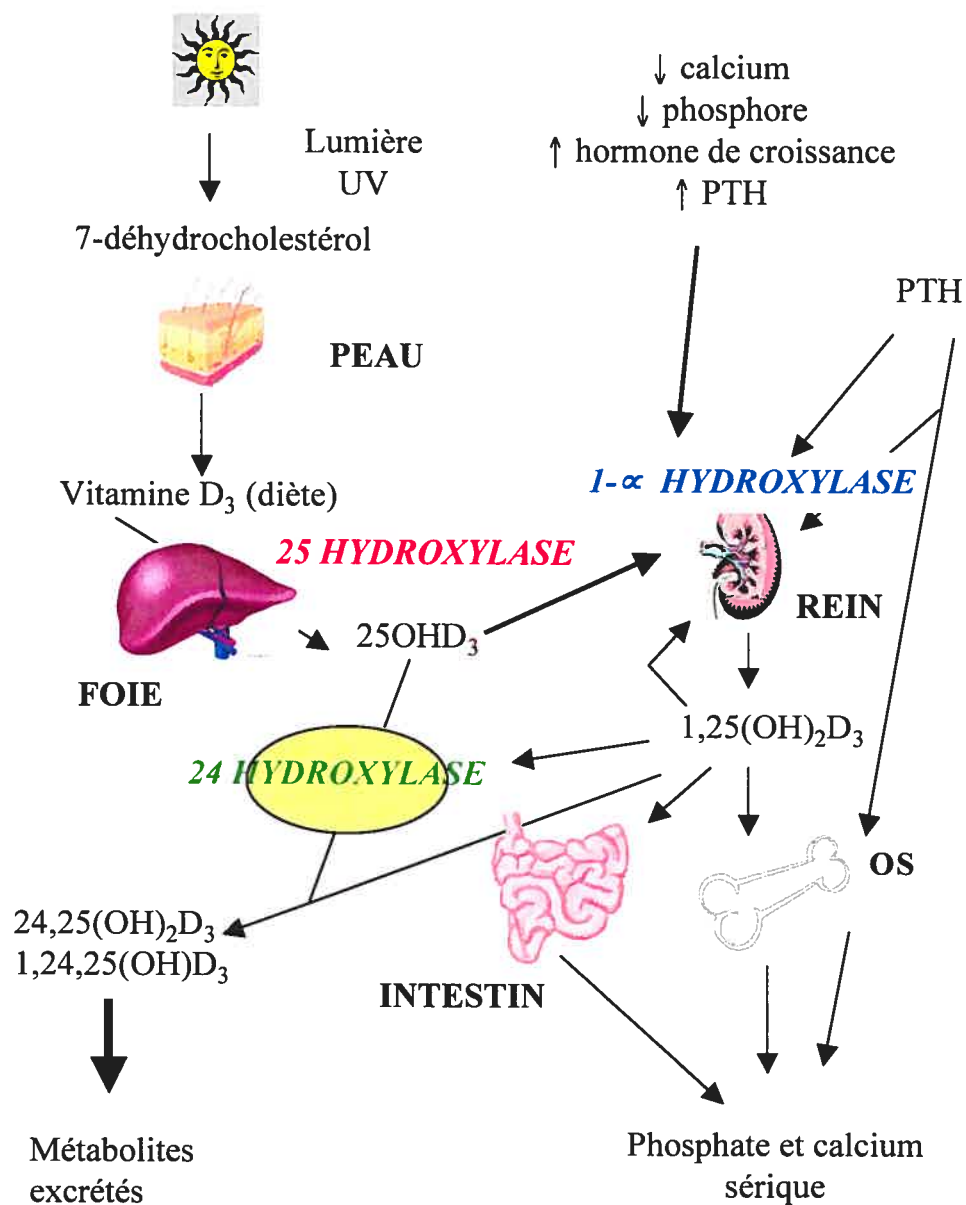


vitamine D est initiée dans la peau à partir d'une composante membranaire épidermique et dermique le 7-déhydrocholestérol qui, sous l'effet des rayons ultraviolets du soleil, subit une conversion photolytique qui entraîne sa transformation en prévitamine D<sub>3</sub>. Celle-ci est ensuite rapidement transformée par la chaleur du corps (isomérisation thermique) en vitamine D<sub>3</sub> (24). Une fois la synthèse terminée, la vitamine D<sub>3</sub> est transloquée de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire où elle se complexe avec sa protéine de liaison la DBP (vitamin D-binding protein) afin de pénétrer la circulation systémique (25). Les concentrations sanguines de vitamine D<sub>3</sub> sont faibles et ne reflètent pas l'état nutritionnel en D.

La vitamine D peut également provenir d'un apport exogène par l'alimentation. Cependant, on ne la retrouve à l'état naturel que dans peu d'aliments : les poissons gras, l'huile de foie de morue et dans le jaune d'œuf. L'apport exogène de la vitamine D dépend donc, en grande partie, de la fortification des aliments tels le lait et la margarine. Une fois ingérée, la vitamine D est absorbée par l'intestin sous la forme d'un complexe chylomicron/lipoprotéine médié par les sels biliaires et les acides gras (26).

### **2.2.2 Bioactivation de la vitamine D**

La vitamine D est un composé qui doit subir deux hydroxylations successives pour acquérir son potentiel hormonal. La première hydroxylation est effectuée principalement dans le foie par l'enzyme mitochondriale CYP27A1 et la seconde au niveau du rein par l'enzyme CYP27B1, deux enzymes appartenant à la famille des cytochromes P450. La figure 1 présente les fonctions métaboliques et homéostatiques du système endocrinien de la vitamine D.



**Figure 1.** Fonctions métaboliques et homéostatiques du système endocrinien de la vitamine D. *Légende:* ↑ sur-régulation, ↓ sous-régulation. (Tiré de : Sutton A.L., MacDonald P.N. Vitamin D: More Than a “Bone-a-Fide” Hormone. *Mol. Endocrino.* 17 (5):777-791, 2003.)

### 2.2.2.1 La D-25 hydroxylase (CYP27A1)

La première hydroxylation de la vitamine D, en position C-25, est effectuée par une enzyme appartenant à la superfamille des cytochromes P450, la D-25 hydroxylase ou CYP27A1 (27). Cette dernière a été nommée ainsi car elle fut d'abord identifiée comme étant la 27-cholestérol hydroxylase, une enzyme responsable de la synthèse des acides biliaires (26). Elle est principalement localisée dans les mitochondries hépatiques mais on la retrouve aussi dans d'autres tissus incluant la peau, l'intestin, le poumon et le rein (28). L'existence de trois enzymes microsomaux est également postulée mais jusqu'à maintenant la CYP2D25 n'a été clonée que chez le porc (29,30); alors que des études ont démontré l'implication du cytochrome CYP2R1 chez l'humain et du CYP2C11 chez le rat comme enzymes microsomaux responsables de l'hydroxylation en C-25 de la vitamine D (79,80).

L'expression génique du *CYP27A1* est régulée par plusieurs hormones et produits endogènes tels les acides biliaires, les glucocorticoïdes, l'insuline et l'hormone de croissance (28). L'enzyme est également régulée de façon négative par trois éléments : les concentrations du précurseur, du produit et de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (31,32,33). Suite à la première hydroxylation, la 25-hydroxyvitamine D ou calcidiol (25(OH)D) est synthétisée. Il représente la principale forme circulante de la vitamine D chez l'humain (25-125 nmol/L)

(3-4). La concentration sanguine de 25(OH)D représente donc le meilleur indicateur du statut nutritionnel en vitamine D.

### **2.2.2.2 La 25OHD-1 $\alpha$ hydroxylase (CYP27B1)**

Afin d'acquérir tout son potentiel hormonal, la 25(OH)D doit subir une seconde hydroxylation, en position C-1 $\alpha$ . Cette hydroxylation permettant ainsi la synthèse de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D (calcitriol), la forme active de la vitamine D. La concentration sérique de 1,25(OH)<sub>2</sub>D est approximativement 1000 fois inférieure à celle de la 25(OH)D chez l'humain (48-156 pmol/L) (34). Le principal site d'hydroxylation de la 25OHD se situe dans le rein et nécessite la participation de l'enzyme 25OHD-1 $\alpha$  hydroxylase ou CYP27B1, nommée ainsi parce que sa séquence est très similaire à celle de la CYP27A1. Cette enzyme mitochondriale fait également partie de la famille des cytochromes P450 et est sujette à l'influence de plusieurs facteurs régulateurs. Par exemple, une baisse du calcium sérique entraîne une augmentation de la PTH qui stimule alors l'enzyme et ainsi la production de 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Inversement, des concentrations élevées de 1,25(OH)<sub>2</sub>D exercent une rétro-inhibition sur l'enzyme (35,36). Le calcium (indépendamment de la PTH), le phosphore, les estrogènes, la calcitonine et l'hormone de croissance ont également été identifiés comme facteurs pouvant réguler l'enzyme (37). Des études cliniques

sur des sujets souffrant d'insuffisance rénale chronique (38) et sur des animaux néphrectomisés (39) ont permis d'identifier le rein comme principal site de synthèse de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  et donc de l'enzyme CYP27B1. Cependant certaines études ont identifié des sites extra-rénaux de production de l'enzyme. On la retrouve donc dans des tissus tels le placenta et les cellules du système lympho-hématopoïétique (37). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ainsi produite localement a une action autocrine/paracrine, cette production ne serait cependant que secondaire car elle ne peut maintenir les niveaux de vitamine D chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique.

### **2.2.3 Catabolisme de la vitamine D**

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  possède la caractéristique de pouvoir réguler son propre catabolisme et donc de prévenir un état d'intoxication. La concentration sérique du calcitriol est régulée de deux façons, soit au niveau de sa synthèse par inhibition de l'enzyme CYP27B1, soit par une activation de son catabolisme par la D-24 hydroxylase ou CYP24, un autre membre de la famille des cytochromes P450. Contrairement aux cytochromes impliqués dans la synthèse du calcitriol (CYP27A1 et CYP27B1) qui sont très localisés, cette enzyme catabolique est exprimée de façon ubiquitaire. On la retrouve donc dans le rein, l'intestin, l'os ainsi que dans plusieurs tissus possédant le

récepteur à la vitamine D ( $VDR_n$ ). Le CYP24 produit une hydroxylation en position C-24 de la  $25(OH)D_3$  et de la  $1,25(OH)_2D_3$ . Cette hydroxylation produit la 24,25-dihydroxyvitamine  $D_3$  ( $24,25(OH)_2D_3$ ) et la 1,24,25-trihydroxyvitamine  $D_3$  ( $1,24,25(OH)_2D_3$ ) respectivement afin d'entraîner une perte progressive de leur activité biologique (40). Ils sont subséquemment catabolisés en acide calcitroïque, un composé biologiquement inerte, pour ensuite être excrétés dans l'urine (41).

Certaines études effectuées chez la souris  $CYP24^{-/-}$  suggèrent que le métabolite  $24,25(OH)_2D_3$  possède une activité biologique spécifique et distincte de celle de la  $1,25(OH)_2D_3$ . Cette hypothèse n'a cependant pas encore été confirmée (42,43).

## **2.3 Mode d'action**

### **2.3.1 Le récepteur nucléaire de la vitamine D**

Les actions génomiques du calcitriol sont médiées par son récepteur nucléaire le  $VDR_n$ , un membre 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) (44).

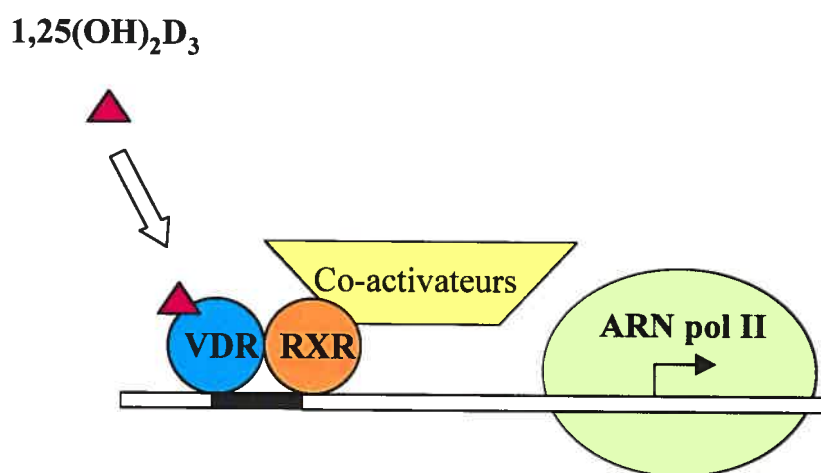
Ces récepteurs interagissent, par l'intermédiaire de leur ligand propre, à la stimulation ou à la répression de gènes spécifiques au sein des tissus cibles. L'expression génique médiée par le  $VDR_n$  est contrôlée par plusieurs étapes présentées à la figure 2 et énoncées ci-dessous. 1) la liaison du ligand ( $1,25(OH)_2D_3$ ) à son récepteur ( $VDR_n$ ) 2) l'hétérodimérisation du  $VDR_n$  avec le récepteur aux rétinoïdes (RXR) 3) la liaison du complexe VDR-RXR aux éléments de réponse de la vitamine D (VDREs) des gènes ciblés par l'hormone et 4) le recrutement de coactivateurs nécessaires à l'initiation de la transcription (26,45).



**Exemples de gènes cibles :**

↑ 24 hydroxylase  
ostéocalcine

↓ 1-α hydroxylase  
PTH



**Figure 2.** Modèle schématique de l'action de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> contrôlée par son récepteur nucléaire, le VDR (récepteur à la vitamine D). Une liste de gènes connus cibles de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> peuvent être sur-régulés (↑) ou sous-régulés (↓) au niveau transcriptionnel. (Tiré de : Brown AJ et coll. *Am. J. Physiol.* **277** (46): F157-F175, 1999; Akutsu N. et coll. *Mol. Endocrinol.* **15** (7): 1127-1139, 2001).

Le VDR<sub>n</sub> est une protéine de 48 et 60 kilodaltons (selon les espèces) qui a été découverte par l'équipe de Haussler (46). Elle possède une séquence en acides aminés fortement conservée entre les espèces. La protéine est constituée dans sa partie C-terminale, d'un site de liaison du ligand, d'un site permettant son hétérodimérisation avec le RXR et d'un site nécessaire à l'activation de la transcription. Dans sa portion N-terminale se trouve un site de liaison à l'ADN composé deux doigts de zinc permettant la liaison aux VDRE (47). Le VDR a été cloné chez le poulet (48), l'humain (49), la souris (50) et le rat (51). Principalement distribué dans l'intestin (3000-6000 fmol/mg de protéine), on le retrouve aussi dans l'os, le rein et d'autres tissus où sa distribution est plus faible. De nombreux facteurs peuvent influencer l'efficacité du VDR<sub>n</sub>, l'accessibilité du ligand, le contenu cellulaire et les modifications post-traductionnelles du VDR<sub>n</sub>, ainsi que la disponibilité des coactivateurs (45).

Plus de 60 gènes ont été identifiés comme étant régulés par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Parmi eux, plusieurs sont directement impliqués soit au métabolisme du calcium ou de la vitamine D (l'ostéocalcine, l'ostéopontine, la 24- et la 1 $\alpha$ -hydroxylase, les CaBP 9 et 28K ainsi que la PTH) (26), alors que d'autres sont impliqués dans la différenciation cellulaire (cystatine M, protéase M), dans l'antiprolifération (CDK, TGF- $\beta$ ), ainsi qu'au niveau de la protection génique (GADD45 $\alpha$ , NRF2) (52).

### **2.3.2 Le récepteur membranaire de la vitamine D**

Bien que plusieurs études suggèrent la présence d'un récepteur membranaire à la vitamine D ( $VDR_m$ ), celui-ci n'a pas encore été cloné. Jusqu'à présent, il a été identifié chez quelques espèces seulement et sur un petit nombre de cellules telles les cellules intestinales de poulet, des myoblastes, des chondrocytes de rat ainsi que dans plusieurs organes dont le foie et le côlon (45,53,54). Selon certains auteurs, la présence d'un  $VDR_m$  expliquerait certaines actions non-génomiques de la  $1,25(OH)_2D_3$ .

### **2.3.3 Fonctions traditionnelles biologiques de la vitamine D**

#### **2.3.3.1 Actions génomiques**

Certaines études ont identifié la PTH (à court terme) et la  $1,25(OH)_2D_3$  (à long terme) comme principaux régulateurs de l'homéostasie phospho-calcique. La PTH relâchée en réponse à une hypocalcémie stimule l'enzyme CYP27B1, ce qui entraîne une augmentation de la production de calcitriol. Celle-ci agit au niveau de l'intestin en augmentant l'absorption du calcium et du phosphate, au niveau du rein en augmentant la réabsorption de  $Ca^{2+}$  et au niveau de l'os en mobilisant les réserves de  $Ca^{2+}$  (45). La  $1,25(OH)_2D_3$  assure ainsi le maintien

de leurs concentrations sanguines à des niveaux normaux. Cette régulation permet le maintien de certaines fonctions cellulaires vitales telles la conduction neuromusculaire, la transmission des signaux intracellulaires, la coagulation sanguine et l'ossification (26). Une fois l'homéostasie rétablie, la vitamine D réprime l'expression des gènes de la PTH et de la CYP27B1 limitant ainsi sa production et elle stimule l'expression du gène de la CYP24 induisant sa dégradation (45). La vitamine D contribue au bon développement et à la minéralisation de l'os en facilitant la formation osseuse par une induction de la synthèse des protéines matricielles de l'os ainsi que l'apposition minérale.

### **2.3.3.2 Actions non-génomiques**

Les actions non-génomiques de la vitamine D qui surviennent très rapidement, permettent, entre autres, l'activation de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  bidirectionnels, de récepteurs couplés aux protéines G et des voies de signalisation de MAPK (mitogen activated protein kinase) et de la protéine kinase C (PKC) (45,55). Ces actions pourraient être médiées par un récepteur membranaire.

### 2.3.4 Fonctions non traditionnelles de la vitamine D

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  exhibe des propriétés anti-inflammatoires et immuno-régulatrices, telles l'inhibition de l'interleukine-2 (IL-2), de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et des immunoglobulines. La vitamine D et ses analogues hypocalcémiques sont donc de bons candidats dans le traitement de maladies telles que le psoriasis, la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde, le diabète et lors de transplantation (45,54). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  présente trois fonctions clés dans la chimoprévention, soit comme agent antiproliférateur (augmentation de TGF- $\beta$ , CDK,  $p27^{\text{KIP1}}$  et inhibition de VEGF-related protein, Cyr61) entraînant une accumulation des cellules en phase  $G_0/G_1$ , soit comme agent pro-différenciateur (inhibition N-cadherin, SCCA et augmentation de cystatin M, protéase M), soit comme agent protecteur (augmentation GADD45 $\alpha$ , impliqué dans la réparation de l'ADN). Cette fonction a été observée chez plusieurs modèles cellulaires telles les cellules cancéreuses du sein, de la prostate, du côlon, les cellules leucémiques, les cellules de l'os et du cartilage, les cellules hématopoïétiques et les kératinocytes (52,54,55). La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  peut également stimuler le processus de mort cellulaire programmée en inhibant l'expression de bcl-2 un agent anti-apoptotique et en stimulant l'expression de bax et de p53, deux protéines pro-apoptotiques (45,55).

## **2.4 Altérations de l'homéostasie du système endocrinien de la vitamine D**

### **2.4.1 Hypervitaminose D<sub>3</sub>**

Une exposition prolongée aux rayons ultraviolets ne peut pas provoquer une hypervitaminose D<sub>3</sub>. L'organisme possède en effet des points de contrôle (par action des rayons UV) limitant la surproduction de la vitamine en transformant la prévitamine D<sub>3</sub> et la vitamine D<sub>3</sub> en composés biologiques inertes (24). L'hypervitaminose D<sub>3</sub> est donc uniquement de provenance alimentaire. Elle est associée à tous les symptômes reliés à l'hypercalcémie qu'elle induit, soit de la fatigue, une soif intense, des douleurs abdominales et une calcification des tissus mous (vaisseaux sanguins, reins). Une hypervitaminose D<sub>3</sub> sévère peut provoquer des troubles de la vigilance, voire un coma. Son traitement consiste à arrêter la prise de la vitamine et à soigner les symptômes de l'hypercalcémie.

### **2.4.2 Déficience nutritionnelle en vitamine D**

La carence en vitamine D est causée par une déficience nutritionnelle et une faible exposition solaire qui est insuffisante pour combler les besoins en cette vitamine. L'hypovitaminose D<sub>3</sub>, longtemps considérée spécifique à l'enfant

(rachitisme), est maintenant reconnue chez tous les groupes d'âge (ostéomalacie). La carence entraîne une décalcification osseuse provoquant un rachitisme/ostéomalacie qui est caractérisé par des déformations osseuses qui s'accompagnent de troubles biologiques (54,56). Des études de nature empirique ont démontré une corrélation entre la latitude et la production de vitamine D. Ainsi les individus des régions nordiques sont plus susceptibles à une carence en vitamine D. La quantité de mélanine présente dans la peau est un autre facteur pouvant limiter la synthèse de vitamine D. Une seconde corrélation a également été démontrée entre l'incidence de certaines maladies et la latitude, ces données viennent donc renforcer l'implication de la vitamine D dans la prévention de certaines maladies telles les cancers du côlon, de la prostate et du sein et le diabète (24). La carence en vitamine D peut également être secondaire à différentes pathologies telles la maladie de Crohn, la maladie de Whipple, la maladie coeliaque et un dysfonctionnement hépatique (57).

### **2.4.3 Déficience d'origine génétique**

#### **2.4.3.1 Chez l'homme**

Le rachitisme dépendant de la D de type I est caractérisé par une mutation du gène de l'enzyme 25(OH)D-1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) qui entraîne son

dysfonctionnement et donc une faible synthèse de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . La très faible concentration de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  mesurée dans le sang entraîne une hypocalcémie et une hyperparathyroïdie secondaire. Ce défaut génétique se traite par le remplacement hormonal de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

Le rachitisme dépendant de la D de type II est caractérisé par une mutation du gène du  $\text{VDR}_n$ , entraînant ainsi une résistance généralisée à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Les personnes atteintes souffrent de rachitisme (ou ostéomalacie), d'une hypocalcémie, d'une hypophosphorémie et d'une hyperparathyroïdie secondaire. L'alopecie est parfois observée chez certains sujets. L'apparition des symptômes est contrée par un apport alimentaire de calcium et de phosphore alors que le rachitisme et l'ostéomalacie sont traités par des infusions intraveineuses répétées de ces minéraux.

Chez l'homme, une mutation du gène *CYP27A1* est responsable de la maladie xanthomatose cérébrotendineuse (CTX) caractérisée par une réduction de la formation normale des acides biliaires. Les sujets présentent des niveaux élevés de cholestérol et de cholestanol dans presque tous les tissus. Les niveaux de  $25(\text{OH})\text{D}$  sont faibles, et les sujets souffrent de retard mental, d'ataxie cérébelleuse et de xanthes tendineux.



### 2.4.3.2 Chez l'animal

Le développement de deux modèles de souris  $VDR^{-/-}$  a permis de mimer chez l'animal le rachitisme de type II. Ces souris  $VDR^{-/-}$  sont porteuses de l'ablation d'une région codante du gène  $VDR_n$  entraînant ainsi son inactivation. L'équipe de Kato (58) a aboli l'exon II du premier doigt de zinc du  $VDR_n$  (souris japonaise) alors que l'équipe de Demay (59) a aboli l'exon III du second doigt de zinc (souris américaine), les deux doigts de zinc sont essentiels à la liaison de l'ADN au  $VDR_n$ . À la naissance, les souris  $VDR^{-/-}$  sont phénotypiquement indissociables des souris  $VDR^{+/+}$ . Des études antérieures chez le rat ont démontré que l'absorption intestinale de calcium et de phosphore est un processus non saturable et indépendant de la vitamine D jusqu'à l'âge de 18 jours pour ensuite décroître et être remplacé par une voie saturable et régulée par la  $1,25(OH)_2D_3$ ; ce qui expliquerait l'absence de symptôme durant l'allaitement. Cependant, à l'âge de 21 jours, les souris  $VDR^{-/-}$  développent graduellement une hypocalcémie qui favorise une hyperparathyroïdie secondaire entraînant alors une hypophosphorémie. À 35 jours, les symptômes du rachitisme (ostéomalacie) sont nettement visibles. À la quatrième semaine, les souris développent graduellement une alopecie qui se généralisera sur tout le corps au cours des trois mois suivant les premiers symptômes (59).

Des études chez des souris  $VDR^{-/-}$  et chez des sujets atteints du rachitisme dépendant de la D de type II ont démontré que leur absorption intestinale de calcium était diminuée de 20 à 60% (60). Le phénotype de ces souris peut être partiellement corrigé par l'intermédiaire d'une diète riche en lactose (20%), en calcium (2%) et en phosphore (1,25%). Cette diète balancée entraîne une normalisation de l'homéostasie phospho-calcique qui permet de corriger l'hypocalcémie, l'hypophosphorémie et l'hyperparathyroïdie secondaire. La diète permet également la prévention et la guérison du rachitisme. Seule l'alopécie demeure irréversible (61). Il est à noter, que l'alopécie n'a jamais été observée chez les sujets atteints de rachitisme dépendant de la D de type I, la combinaison de ces données implique directement le  $VDR_n$  dans la croissance des poils. Ces données laissent présumer que le complexe  $1,25(OH)_2D_3$ - $VDR_n$  n'est pas nécessaire au fonctionnement normal de l'os et que son rôle physiologique principal est le maintien de l'homéostasie phosphocalcique par le biais de son influence sur le processus d'absorption intestinale.

Des souris  $CYP27A1^{-/-}$  ont également été créées, mais elles ne présentent pas le même phénotype que chez l'humain. Elles ne souffrent pas de la maladie xanthomateuse cérébrotendineuse et ne présentent pas d'accumulation de cholestérol ni de cholestanol. Cependant, ces souris présentent une augmentation marquée de l'activité des cytochromes CYP3A (7-10 fois) et CYP2B (4 fois), caractéristique non retrouvée chez l'humain (62).

Des souris *CYP24*<sup>-/-</sup> ont été générées, elles présentent des niveaux toxiques de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> qui entraînent la calcification des organes (rein). Aucun autre phénotype n'est associé à une mutation du gène *CYP24* (26).

Le développement d'un modèle de souris *CYP27B1*<sup>-/-</sup> a permis de mimer chez l'animal le rachitisme de type I. À la naissance les souris *CYP27B1*<sup>-/-</sup>, tout comme les souris *VDR*<sup>-/-</sup>, sont phénotypiquement indissociables des souris sauvages. Les symptômes sont les mêmes que ceux retrouvés chez la souris *VDR*<sup>-/-</sup> et apparaissent progressivement avec le sevrage (82-83).

### **3. RÔLE DU SYSTÈME PARA-ORPHELIN DE LA VITAMINE D**

#### **3.1 Implication du VDR<sub>n</sub> dans l'expression génique des *CYP* par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>**

Des études réalisées chez l'humain ont démontré une induction de l'expression du *CYP3A* et du *CYP2B* dans le duodénum, dans les hépatocytes et dans une lignée de cellules cancéreuses du côlon les Caco-2 (ces cellules n'expriment pas le PXR) suivant un traitement à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Cette induction réalisée par l'hétérodimérisation du VDR<sub>n</sub> avec le RXR lie ensuite les éléments DR3 et ER6 des gènes *CYP* (63,64,65). Cependant, aucun de ces cytochromes n'est

impliqué dans le métabolisme de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Le rôle de celle-ci dans l'induction de ces cytochromes n'a pas encore été élucidé mais pourrait contribuer aux mécanismes de détoxication (1,13,33).

### **3.2 Implication du $\text{VDR}_n$ dans l'expression génique du *CYP3A4* par l'ALC.**

Les maladies cholestatiques du foie sont caractérisées par une rétention progressive intra-hépatique des acides biliaires qui entraîne la cirrhose du foie et fréquemment la mort. Parmi les différents composés des acides biliaires, l'ALC est le plus toxique. Cet acide biliaire secondaire hydrophobe est formé à partir de l'acide chénodéoxycholique (CDCA) par des bactéries intestinales. À forte concentration, l'ALC entraîne des bris des brins d'ADN, inhibe les enzymes qui les réparent et stimule la formation de cancer chez l'animal. Les patients souffrant du cancer colorectal présentent souvent des taux très élevés d'ALC (66). Dernièrement, l'équipe de Makishima a identifié le récepteur  $\text{VDR}_n$  comme senseur de l'ALC et de certains de ses métabolites dont l'acide 3-kéto-lithocholique (67,68,70). Leur affinité pour le récepteur ainsi que leur capacité de stimuler l'hétérodimérisation du  $\text{VDR}_n$  avec le RXR sont inférieures à celle de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Les trois ligands du  $\text{VDR}_n$  présentent des sites de liaison à des acides aminés distincts mais se chevauchant, entraînant

ainsi des changements de conformation spécifique (68,69). Ces différentes conformations du VDR<sub>n</sub> semblent induire différents coactivateurs, le SCR-1 stimulé par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> qui ne répond que partiellement aux deux autres ligands (68,69). La concentration d'acides biliaires nécessaire à l'activation du VDR<sub>n</sub> est inférieure à celle nécessaire à l'activation du PXR. La liaison de l'ALC au VDR<sub>n</sub>, comme dans le cas de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, entraîne une induction de l'expression génique du *CYP3A* (67). L'ALC peut également induire le *CYP3A* dans les cellules humaines cancéreuses du côlon (HT-29) ainsi que dans des cellules embryonnaires épithéliales dérivées du jéjunum/iléon (intestine-407) (69). Cette enzyme qui permet la détoxification des acides biliaires pourrait contribuer à l'effet préventif de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sur la carcinogénèse du côlon attribuée à une diète à forte teneur en gras ou à une toxicité des acides biliaires (11).

## **4. PRÉAMBULE ET HYPOTHÈSE**

### **4.1 Préambule**

Dernièrement, le système cellulaire de la vitamine D<sub>3</sub> s'est étendu pour inclure une signalisation croisée empruntant, non seulement les VDRE, mais aussi les motifs DR3 et ER6 des XERM (xenobiotic-responsive enhancer module) et les DR4 des PBREM (phenobarbital-responsive enhancer module). Cette signalisation croisée mène à l'induction de cytochromes P450 des familles CYP3A et CYP2B, deux des familles les plus importantes dans le métabolisme des substances endogènes et exogènes chez l'humain. De plus, des travaux récents rapportent que cette signalisation croisée englobe, également, la liaison de l'acide biliaire cytotoxique lithocholique (ALC) et certains de ses métabolites au VDR<sub>n</sub> résultant également en l'activation et l'induction des cytochromes CYP3A.

### **4.2 Hypothèse**

Le système endocrinien de la vitamine D est impliqué dans la réponse de détoxification-cytoprotection aux xénobiotiques ou aux endobiotiques. Par conséquent, l'ablation du VDR<sub>n</sub> ou la carence en vitamine D accroîtra la sensibilité aux effets nocifs de ces produits.

## 5. OBJECTIFS

Le système endocrinien de la vitamine D est un système à deux composantes pouvant être étudié soit en tenant compte 1) uniquement de la réponse via son récepteur nucléaire  $VDR_n$  (génotype), c'est-à-dire l'implication de celui-ci dans l'induction de cytochromes ou 2) du statut nutritionnel en vitamine D, c'est-à-dire l'effet de la vitamine D ( $25(OH)D_3$ ) ou de la  $1,25(OH)_2D_3$  indépendamment du  $VDR_n$ . L'objectif du travail de recherche est d'étudier l'implication du  $VDR_n$  dans l'activation du cytochrome *CYP3A11* par l'ALC et d'évaluer l'expression génique du *CYP3A11* et du *CYP2B10* dans l'intestin après traitement à l'ALC, à la  $1,25(OH)_2D_3$ , au PCN ou les différentes combinaisons chez la souris normale  $VDR^{+/+}$ , la souris  $VDR^{-/-}$  ainsi que chez la souris soumise à une diète carencée en vitamine  $D_3$  et basse en calcium (D-).

**CHAPITRE II**  
**MATÉRIEL ET MÉTHODES**



## **6. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL**

### **6.1 Modèle animal**

Les animaux ont été traités selon les standards éthiques pour l'expérimentation animale du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Les protocoles ont été approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux du CHUM (CIPA).

Afin de vérifier l'implication du récepteur nucléaire à la vitamine D ( $VDR_n$ ) dans la modulation de l'expression génique des cytochromes P450, deux types de souris ont été utilisés. La souris de type sauvage ( $VDR^{+/+}$ ) à titre d'animal témoin et la souris dont le  $VDR_n$  est inactif ( $VDR^{-/-}$ ) (59).

#### **6.1.1 Souris de type sauvage ( $VDR^{+/+}$ )**

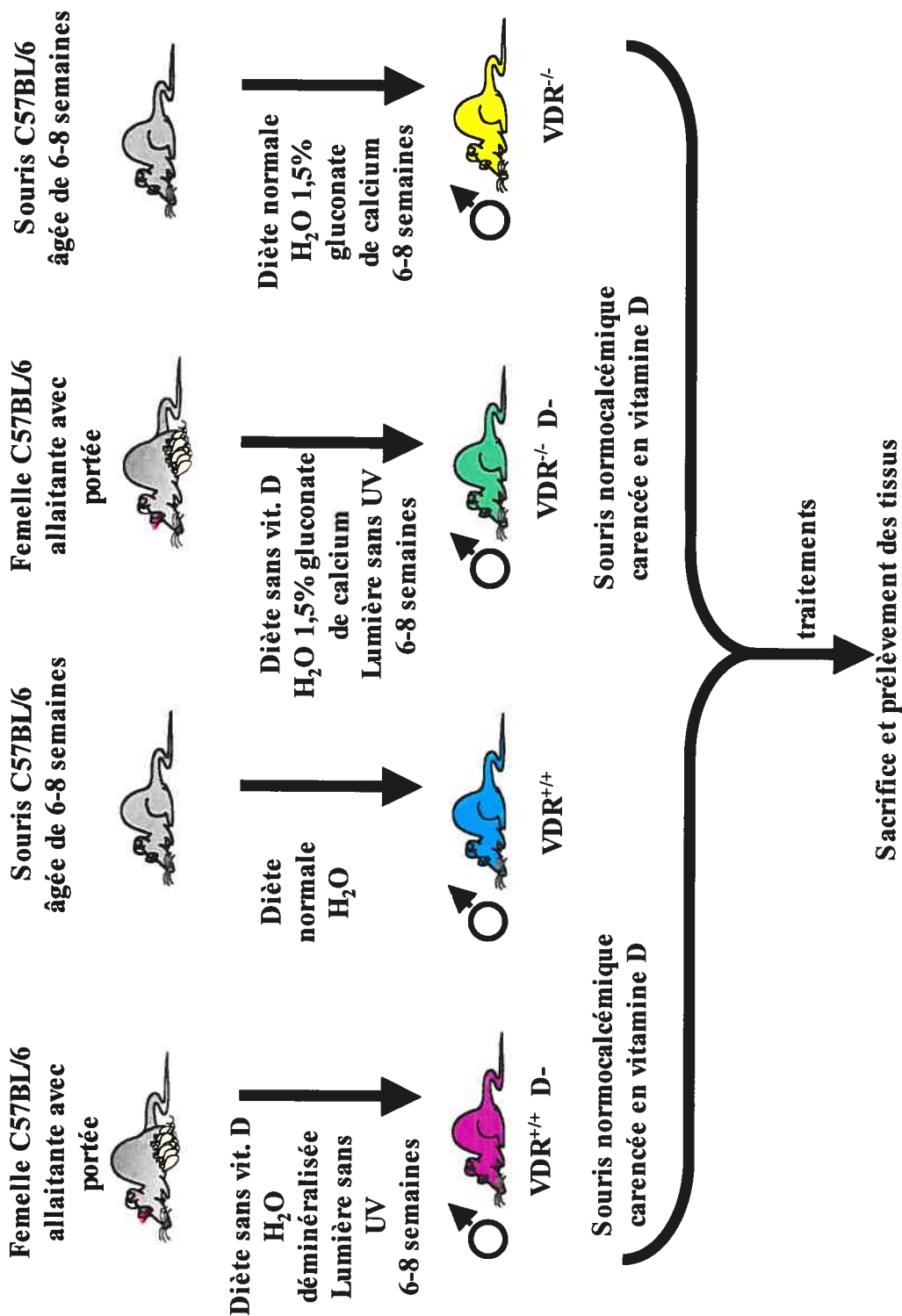
La souche de souris C57BL/6 du fournisseur Charles River (St-Constant, Qué.) a été utilisée comme animal témoin ( $VDR^{+/+}$ ). Elle a été paillée pour l'âge avec les animaux de type  $VDR^{-/-}$ .

### 6.1.2 Souris de type VDR<sup>-/-</sup>

L'implication du récepteur à la vitamine D<sub>3</sub> (VDR<sub>n</sub>) dans la régulation de l'expression génique des cytochromes P450 a été vérifiée à l'aide d'une souris de la souche C57BL/6 dont la partie codante du second doigt de zinc (exon 3) du gène VDR<sub>n</sub> a été supprimée (VDR<sup>-/-</sup>) (59). La colonie, gracieusement fournie par l'équipe de Demay (59), est maintenue et conservée à l'animalerie des animaux transgéniques du Centre de recherche du CHUM.

### 6.2 Diète

Pour vérifier l'implication de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dans l'activation des cytochromes P450, une carence en vitamine D (D-) a été induite chez les 2 groupes d'animaux (VDR<sup>+/+</sup> et VDR<sup>-/-</sup>). Pour vérifier l'expression génique à l'état basal des cytochromes P450, les 2 groupes d'animaux ont reçu une diète normale. Un résumé des diètes est présenté au tableau 1 et à la figure 3 qui présentent la schématisation du modèle animal et des diètes.



**Figure 3.** Résumé schématique du modèle animal et des diètes.

Légende: souris sauvage (VDR<sup>+/+</sup>), souris dont le récepteur VDR<sub>n</sub> a été aboli (VDR<sup>-/-</sup>), statut nutritionnel normal (D<sup>+</sup>), statut nutritionnel carencé en vitamine D (D<sup>-</sup>)

**TABLEAU 1**

## Résumé des Diètes

<b>Groupes</b>	<b>Diètes</b>
Souris de type sauvage VDR <sup>+/+</sup>	Normale ou D-, eau déminéralisée
Souris de type VDR <sup>-/-</sup>	Normale, gluconate de calcium 1.5% ou D-, gluconate de calcium 1.5%

**6.2.1 Diète normale**

Les souris VDR<sup>+/+</sup> ont reçu une diète normale (Teklab global 18% protein rodent diet, Harlan, Indianapolis, Indiana, USA). Les animaux avaient accès *ad libitum* à de l'eau du robinet. Les souris VDR<sup>-/-</sup> ont reçu la même diète mais avaient accès à de l'eau déminéralisée supplémentée en gluconate de calcium (1.5%) pour maintenir la concentration de calcium sérique (Ca<sup>2+</sup>) à un niveau normal et ainsi assurer la survie des animaux (59).

### 6.2.2 Diète carencée en vitamine D<sub>3</sub>

Des animaux carencés en vitamine D (D-) ont été utilisés pour vérifier l'implication du calcitriol dans l'induction de l'expression génique des cytochromes P450. Pour obtenir ces animaux carencés (D-), une femelle allaitante et sa portée de 6 souris âgées de 5-7 jours ont été isolées dans une pièce à atmosphère contrôlée équipée d'un système d'éclairage constant (12h de clarté) sans rayons ultraviolets. Les animaux ont été nourris avec une diète déficiente en vitamine D contenant 0,5% de carbonate de calcium et 0,9% de phosphore. Cette diète a été préparée dans notre laboratoire (71). Les souriceaux ont été sevrés à l'âge de 28 jours et maintenus à la diète carencée pour une période de 8 semaines. Les animaux avaient accès *ad libitum* à l'eau déminéralisée. Les souris VDR<sup>-/-</sup> ont reçu la même diète et avaient accès *ad libitum* à l'eau déminéralisée supplémentée en gluconate de calcium (1.5%).

### 6.3 Traitements

La régulation de l'expression génique des cytochromes P450 a été produite par différents inducteurs enzymatiques connus pour leur induction sélective de certains cytochromes P450. Le 16 $\alpha$ -carbonitrile pregnane pregnenolone (PCN) et la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sont les ligands respectifs du PXR (Pregnane X receptor) et

du VDR<sub>n</sub>; ils induisent le *CYP3A11* (1,10,63,64). L'acide lithocholique (ALC) par le biais du PXR et du VDR<sub>n</sub> induit également le *CYP3A11* dans l'intestin (67). La 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> a été utilisée comme inducteur du *CYP24*. Un résumé des traitements administrés est présenté au tableau 2.

**TABLEAU 2**

Résumé des traitements

Traitements	Doses	Administrations	CYP Cibles
VÉH	200 µl/j	Gavage 3 jours	Témoin
PCN	0.3 mg/g	Gavage 3 jours	CYP3A11 et CYP2B10
ALC	4 mg/j	Gavage 3 jours	CYP3A11
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	28 pmol/50µl	i.v. 6 heures avant le sacrifice	CYP3A11 et CYP24

*Légende* : véhicule (VÉH), 16 $\alpha$ -carbonitrile pregnane pregnenolone (PCN), acide lithocholique (ALC), calcitriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), cytochrome P450 (CYP), injection intraveineuse (i.v.)

### 6.3.1 Gavage

Les inducteurs, le PCN (0.3 mg/g) (Sigma-Aldrich Inc., St-Louis, MO, USA) et l'ALC (4 mg/j) (Sigma-Aldrich Inc., St-Louis, MO, USA), ont été administrés par gavage alors que le propylène glycol (200 µl/j) a été utilisé comme véhicule et à titre de contrôle (VÉH). Les animaux étaient gavés une fois par jour pour une période de 3 jours. Tous les animaux ont été sacrifiés au jour quatre.

### 6.3.2 Administration de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

L'administration de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (gracieusement fournie par Roche, Laval, Qué.) a été réalisée par injection intraveineuse sous anesthésie au forane (isoflurane, Baxter Corporation, Toronto, Ont.). Une dose aiguë de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (28 pmol/50µl) a été administrée 6 heures avant le sacrifice tel que décrit précédemment (84).

### **6.3.3 Sacrifices**

Aux sacrifices, le sang et le sérum ont été conservés pour l'analyse des paramètres biologiques; l'intestin (duodénum) a été prélevé et immédiatement congelé dans l'azote liquide. Les tissus congelés ont été conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN.

### **6.4 Analyses des concentrations sériques de calcium ionisé (Ca<sup>2+</sup>)**

Les concentrations sériques de calcium ionisé (Ca<sup>2+</sup>) ont été déterminées par l'analyseur RapidLab 348 (Bayer, Pointe-Claire, Québec, Can).

### **6.5 Analyses relatives à l'évaluation de l'expression génique**

#### **6.5.1 Extraction des ARN**

Les ARN totaux ont été extraits en utilisant l'isothiocyanate de guanidine et chlorure de lithium tel que décrit par Chirgwin et coll. (72). L'ARN a été resuspendu dans l'eau traitée au DEPC (DiEthyl PyroCarbonate) (Sigma-



Aldrich Inc., St-Louis, MO, USA) et sa concentration a été dosée par densité optique à 260 et 280 nm selon la formule suivante :

$$\text{Concentration d'ARN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{D.O. 260 nm} - \text{D.O. 280 nm} \times (\text{f. dilution})}{0.01}$$

Les ARN totaux ont été utilisés et analysés selon la méthode de Northern, afin de vérifier l'induction de l'expression génique des *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* dans l'intestin. À titre de contrôle interne, l'ARN ribosomal 18S humain a été utilisé.

### 6.5.2 Synthèse d'ADNc

Les ARN totaux ont été purifiés par traitement à la DNase à l'aide de la trousse RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ont.). Une réaction de transcription inverse (RT), en présence de 1 µg d'ARN total et de l'oligonucléotide hexamère aléatoire pd(N)<sub>6</sub> utilisé comme amorce, a permis la synthèse d'ADNc (First-Strand cDNA Synthesis Kit, GE Healthcare, Baie D'Urfé, Qc, Can). La réaction de transcription inverse a été réalisée à 37°C pour une période d'une heure.

### 6.5.3 Réaction de PCR

Les réactions PCR des gènes décrits ci-dessous ont été utilisées afin de produire des fragments d'ADNc, préalables à la synthèse de sondes radiomarquées et à l'hybridation des membranes pour l'analyse de type Northern. Les réactions PCR ont été réalisées en présence de 2 µl de la réaction de RT avec des séquences d'amorces spécifiques à la souris afin d'amplifier les fragments d'ADNc correspondant aux gènes des cytochromes *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* (tableau 3).

Les amorces ont été élaborées à l'aide du logiciel Primer3 ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) et synthétisées par la compagnie Sigma Genosys (Mississauga, ON). La synthèse des amorces *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* a été réalisée selon les séquences publiées respectivement par Yanagimoto et coll. (73), Saito et coll. (74) et Itoh et coll (75). La description des amorces des différents gènes étudiés est présentée au tableau 3. La réaction PCR de 42 µl a été constituée de 20 µM de chacune des amorces spécifiques et d'un mélange déjà prêt pour une amplification quantitative contenant 1,26 unités d'enzyme Taq ADN Polymerase (Sigma-Aldrich Inc., St-Louis, MO, USA). Les réactions ont été effectuées à l'aide d'un appareil PCR (Touchdown Thermal Cycling system, Hybaid, Teddington,

UK). Les conditions d'amplification PCR des gènes *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* sont présentées au tableau 4.

**Tableau 3**

Description des séquences des amorces

Oligo-nucléotides	Séquences	Nombre de bases
<i>CYP3A11</i>	5'-CTTGCTGTCACAGACCCAGA-3'	318-337
	5'-TCCACGTTCACTCCAAATGA-3'	635-654
<i>CYP2B10</i>	5'-GCCATACACAGAGGCAGTCA-3'	1059-1088
	5'-AAGCGGATCTGGTATGTTGG-3'	1469-1484
<i>CYP24</i>	5'-CCTGCTGGAAGCTCTGTACC-3'	641-660
	5'-CACAAGGCAGATGCTTTCAA-3'	937-956

**Tableau 4**

Description des programmes PCR.

Synthèse de fragments d'ADNc (préalable à la synthèse des sondes)

Gènes	Programmes PCR
<i>CYP3A11</i>	95°C (3 min), 1 cycle; 95°C (30 sec), 59°C (45 sec), 72°C (1 min 30), 30 cycles; 72°C (10 min), 52°C (2 min) 1 cycle
<i>CYP2B10</i>	95°C (3 min), 1 cycle; 95°C (30 sec), 59°C (45 sec), 72°C (1 min), 30 cycles; 72°C (10 min), 52°C (2 min) 1 cycle
<i>CYP24</i>	95°C (3 min), 1 cycle; 95°C (30 sec), 59°C (1 min), 72°C (1 min 30), 25 cycles; 72°C (10 min), 52°C (2 min) 1 cycle

#### 6.5.4 Électrophorèse et transfert de Northern

Les ARN totaux ont été transférés sur membranes de type Northern afin de vérifier l'expression génique des *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* dans l'intestin. Les ARN totaux (15 µg) ont été dénaturés à l'aide d'un tampon dénaturant contenant 50% de formamide (v/v) et 6% de formaldéhyde (v/v) à 65°C pendant 15 minutes. Ils ont ensuite été déposés dans les puits d'un gel d'agarose 1.2% (p/v) contenant 6% (v/v) de formaldéhyde. La migration du gel d'électrophorèse a été effectuée avec un tampon de migration contenant du MOPS 1% (v/v) à 35 volts pour une période de 16 heures par un appareil BRL (Life Technologies). Le gel a ensuite subi deux lavages consécutifs dans de l'eau distillée ainsi que deux autres lavages dans une solution de 10X SSC. Les ARN ont ensuite été transférés sur une membrane de nylon (Biodyne A membrane, 0.45 µm, Gelman Laboratory, Mississauga, Ont.) par capillarité avec une solution de 10X SSC à l'aide d'un appareil de transfert BIOS (BIOS Corp. New Heaven, CT, USA). La membrane a été séchée à la température de la pièce et les ARN ont été fixés par une exposition aux rayons ultraviolets (0.6 J/cm<sup>2</sup>) pendant 3 minutes.

### 6.5.5 Synthèse des sondes

Les sondes moléculaires des gènes étudiés ont été fabriquées à partir des fragments d'ADNc générés avec des ARN totaux de souris à partir des amorces spécifiques à la souris décrites au tableau 3 et par les programmes PCR décrits au tableau 4. Les fragments obtenus ont été clonés dans des vecteurs pCRII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) et excisés par l'enzyme de restriction EcoRI. Les fragments d'ADNc ont ensuite été séquencés pour confirmer leurs identités. Les sondes moléculaires radioactives ont été synthétisées par la méthode des oligohexamères aléatoires à partir des fragments d'ADNc en présence de 20  $\mu\text{Ci}$  de dCTP [ $\alpha\text{-P}^{32}$ ] (3000 Ci/mol) (GE Healthcare, Baie D'Urfé, Qc, Can) à l'aide d'une enzyme DNA Polymerase I Kleenow à 37°C pendant 2 heures.

### 6.5.6 Hybridation pour analyse de Northern

Les membranes de nylon contenant les ARN ont été pré-hybridées avec 10 ml de tampon d'hybridation (tableau 5) pendant 1 heure. Les membranes ont ensuite été hybridées avec  $1 \times 10^6$  cpm/ml de sondes radiomarquées (tableau 6) pour une période de 24 heures avec 10 ml de tampon d'hybridation (tableau 5) et 48  $\mu\text{g/ml}$  d'ADN de sperme de saumon dénaturé (Sigma-Aldrich Inc., St-

Louis, MO, USA). Les membranes ont ensuite été lavées à deux reprises pendant 5 minutes à température de la pièce avec une première solution de lavage (tableau 5). Elles ont ensuite été lavées à 52°C ou à 65°C (tableau 6) pendant 10 minutes avec la deuxième solution de lavage; un dernier lavage de 10 minutes à 52°C ou 65°C a été réalisé avec la troisième solution de lavage tel que décrite au tableau 5. Les membranes ont été séchées et autoradiographiées sur film X-Omat AR (Kodak) pour une période de 2 à 7 jours à -80°C en utilisant des écrans d'intensification Cronex lighting plus (Dupont Canada Inc., Mississauga, Ont.). Les films ont été analysés par photodensitométrie (Scan Jet Plus, Hewlett-Packard Canada Ltd., Mississauga, Ont.) à l'aide du logiciel Collage (Fotodyne Inc., New Berlin, WI). Entre chacune des sondes utilisées, les membranes sont lavées avec la troisième solution diluée ½. Cette solution est portée à 100°C, les membranes sont ajoutées et laissées jusqu'à ce que la solution soit à température pièce. Comme contrôle interne, un fragment d'ARN ribosomal 18S humain de 1.5 kilobases (kb) issu du vecteur pBluescript SK (ATCC, Rockville, MD, USA) a été utilisé dans le but de vérifier la quantité d'ARN déposée sur le gel.

TABLEAU 5

Description des conditions et des tampons d'hybridation

Températures	Tampons d'hybridation	Solutions de lavages
Hyb : 42°C  Lavage : 65°C	<b>Tp. pré-hyb. Dextran :</b> Formamide 50%, 6X SSC, 5% Denhardt's et SDS 5% <b>Tp. Hyb. Dextran :</b> Formamide 50%, NaCl 1M, 2.8% Denhardt's, 10% Dextran Sulfate et SDS 0.5%	<b>I :</b> 2X SSC <b>II :</b> 2X SSC et SDS 0.1% <b>III :</b> 0.1 SSC et SDS 0.1%
Hyb : 52°C  Lavage : 52°C	<b>Tp. Phosphate SDS :</b> NaPO <sub>4</sub> 0.5M, EDTA 1mM, BSA 1% et SDS 7%	NaPO <sub>4</sub> 0.2M, EDTA 1mM et SDS 1% (Une seule solution)
Hyb : 65°C  Lavage : 65°C	<b>Tp. SSPE :</b> 5X SSPE, 5% Denhardt's et SDS 0.5%	<b>I :</b> 2X SSPE et SDS 0.1% <b>II :</b> 1X SSPE et SDS 0.1% <b>III :</b> 0.1X SSPE et SDS %

Légende : hybridation (Hyb), tampon (Tp),

TABLEAU 6

Description des conditions d'hybridation pour chacune des sondes.

Sondes	Tampons d'hybridation
<i>CYP3A11</i>	Tampon Phosphate (0.5M) SDS (7%)
<i>CYP2B10</i>	Tampon Phosphate (0.5M) SDS (7%)
<i>CYP24</i>	Tampon pré-hybridation. et hybridation Dextran (10%)
<i>18S</i>	Tampon SSPE (5X)

Légende : cytochrome P450 (CYP)

## 6.6 Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  l'erreur-type à la moyenne (E.T.). Les effets de la diète, du génotype et des différents traitements ont été évalués par l'analyse multifactorielle de variance (ANOVA) et les comparaisons inter-groupes ont été évaluées par le test de Bonferonni/Dunn. Les souris traitées avec le véhicule sont utilisées comme groupe de référence. Les différences entre les groupes dont le degré d'erreur est inférieur à la valeur calculée par le test pour chacune des analyses furent considérées statistiquement significatives.

Dans une première analyse, les effets du génotype et/ou de la carence en D sur l'expression génique des différents gènes furent évalués. Dans une seconde analyse, nous avons évalué les effets des différents traitements sur l'expression génique, pour la comparaison inter-groupes, notre groupe de référence était le groupe de souris traitées au propylène glycol (expression à l'état basal) qui a été comparé à chacun des traitements, les différences statistiquement significatives sont illustrées par un ou plusieurs astérisques (\*) tel que décrit dans chacune des légendes. Finalement, dans une troisième analyse, nous avons évalué l'impact du génotype et de la diète sur l'expression génique d'un traitement en particulier. Pour la comparaison inter-groupes, notre groupe de référence était le groupe de souris VDR<sup>+/+</sup> ayant reçu une diète normale en D



(D+) (VDR<sup>+/+</sup> D+) qui a été comparé à chacun des autres groupes de souris, les différences statistiquement significatives sont illustrées par un ou plusieurs dièses (#) tel que décrit dans chacune des légendes. Les différences entre les groupes dont le degré d'erreur était inférieur à la valeur calculée par le test pour chacune des analyses furent considérées statistiquement significatives.

## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS**

**Note :**

Ce document analyse l'expression génique des cytochromes P450 *CYP3A11* et *CYP2B10* intestinaux chez la souris. Pour l'analyse des cytochromes hépatiques, se référer au mémoire de Mme Marilyn Carrier (89).

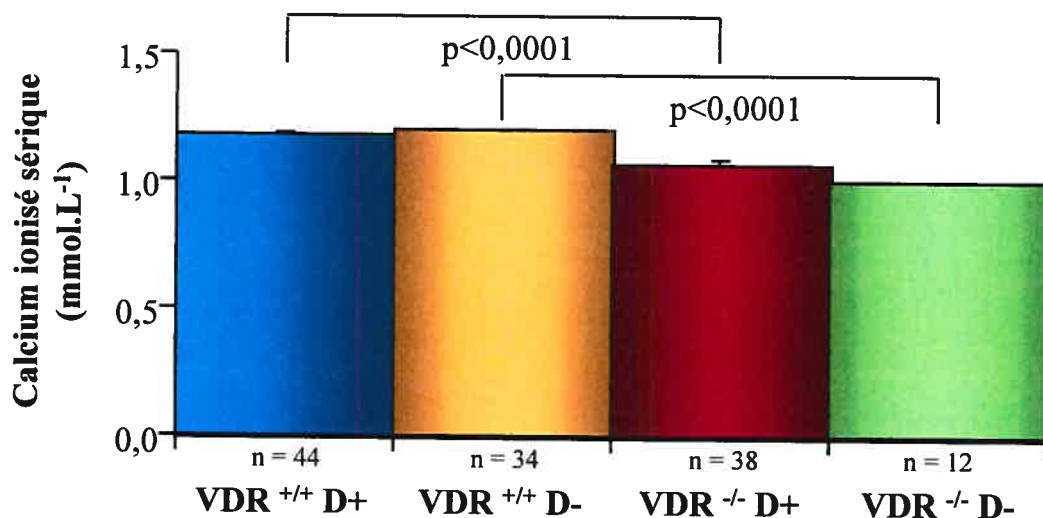
Il est à noter que certaines données sont manquantes (N.D.), plusieurs facteurs (l'approvisionnement en souris mâle de type  $VDR^{-/-}$ , la carence en vitamine D, ainsi que le nombre d'animaux utilisés pour chacun des 7 traitements) nous ont empêchés de compléter cette étude.

## 7. RÉSULTATS

### 7.1 Caractérisation du modèle animal

#### 7.1.1 Concentrations sériques de calcium

Les concentrations sériques de calcium ionisé ( $\text{Ca}^{2+}$ ) des souris  $\text{VDR}^{+/+}$  et  $\text{VDR}^{-/-}$  normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-) sont présentées à la figure 4. Les concentrations sériques sont significativement diminuées chez les animaux ayant une ablation fonctionnelle du  $\text{VDR}_n$  ( $\text{VDR}^{-/-}$ ) ( $p < 0,0001$ ) et ce malgré la supplémentation en calcium dans la diète. Cependant, la calcémie n'est pas influencée par la carence en vitamine D.



**Figure 4.** Effet de la carence en vitamine D sur les concentrations sériques de calcium ionisé ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à l'état basal chez la souris de type  $\text{VDR}^{+/+}$  et  $\text{VDR}^{-/-}$  normale (D+) ou carencée en vitamine D (D-). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et d'erreur-type à la moyenne (E.T.). Les effets de la diète et du génotype furent évalués par l'analyse multifactorielle de variance (ANOVA) et les comparaisons inter-groupes furent évaluées par le test de Bonferonni/Dunn. Les différences entre les groupes dont le degré d'erreur est inférieur à la valeur calculée par le test pour chacune des analyses furent considérées statistiquement significatives. L'effet du génotype est statistiquement significatif ( $p < 0,0001$ ).

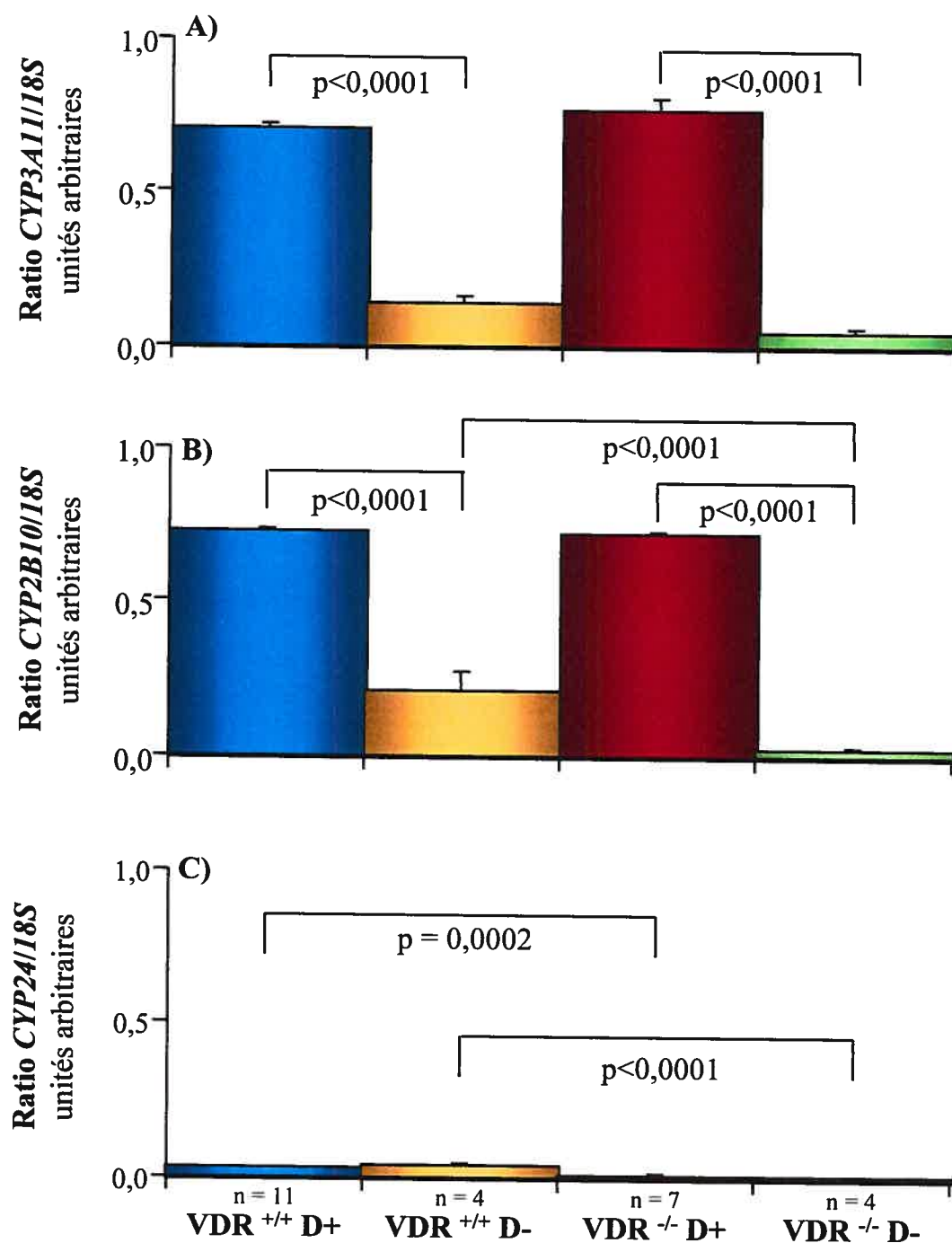
### **7.1.2 Caractérisation de l'expression génique des *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* intestinaux à l'état basal chez les souris de type $VDR^{+/+}$ et $VDR^{-/-}$ normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-)**

Afin de vérifier l'implication du récepteur  $VDR_n$  et de la  $1,25(OH)_2D_3$  dans la régulation des cytochromes *CYP3A11*, *CYP2B10* et *CYP24* intestinaux, nous avons évalué l'expression génique de ces cytochromes chez des souris de type  $VDR^{+/+}$  et  $VDR^{-/-}$  (implication du récepteur  $VDR_n$ ) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-) (implication de la vitamine  $D_3$  ou de l'hormone  $1,25(OH)_2D_3$ ). La figure 5 présente l'analyse de Northern de l'expression du *CYP3A11* (A), du *CYP2B10* (B) et du *CYP24* (C) à l'état basal.

Nos résultats montrent que la carence en vitamine D (D-) entraîne une baisse statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ) de l'expression génique des cytochromes *CYP3A11* (fig. 5A) et *CYP2B10* (fig. 5B) chez les deux génotypes  $VDR^{+/+}$  et  $VDR^{-/-}$ . Alors que l'ablation du récepteur  $VDR_n$  n'affecte pas l'expression de ces deux cytochromes. Cependant chez la souris  $VDR^{-/-}$  carencée en D (D-), l'expression du *CYP2B10* est significativement inférieure ( $p < 0,0001$ ) à celle observée chez la souris  $VDR^{+/+}$  soumise à la même diète.

À l'état basal, l'expression du *CYP24* (fig. 5C) est pratiquement indétectable chez les quatre groupes d'animaux. Nos résultats montrent que l'ablation du  $VDR_n$  entraîne une diminution significative de l'expression du *CYP24* chez les souris normales (D+) ( $p = 0,0002$ ) et carencées en D (D-) ( $p < 0,0001$ ).

**Figure 5.** Effet de la carence en vitamine D sur l'expression génique des *CYP3A11* (A), *CYP2B10* (B) et *CYP24* (C) à l'état basal dans l'intestin de souris de type  $VDR^{+/+}$  et  $VDR^{-/-}$  normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-). L'expression mesurée chez les animaux traités uniquement au véhicule (propylène-glycol) représente l'expression à l'état basal. Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  E.T. Les effets de la diète et du génotype furent évalués par l'analyse multifactorielle de variance (ANOVA) et les comparaisons inter-groupes furent évaluées par le test de Bonferonni/Dunn. Les différences entre les groupes dont le degré d'erreur est inférieur à  $p < 0,0083$  furent considérées d'après le test de Bonferonni/Dunn statistiquement significatives. L'effet de la carence nutritionnelle en vitamine D est statistiquement significatif sur l'expression des *CYP3A11* ( $p < 0,0001$ ) et *CYP2B10* ( $p < 0,0001$ ). L'effet du génotype est statistiquement significatif sur l'expression du *CYP24* ( $p < 0,0001$ ).



**Figure 5.** Effet de la carence en vitamine D sur l'expression génique des *CYP3A11* (A), *CYP2B10* (B) et *CYP24* (C) à l'état basal dans l'intestin de souris de type VDR<sup>+/+</sup> et VDR<sup>-/-</sup> normales (D<sup>+</sup>) ou carencées en vitamine D (D<sup>-</sup>).



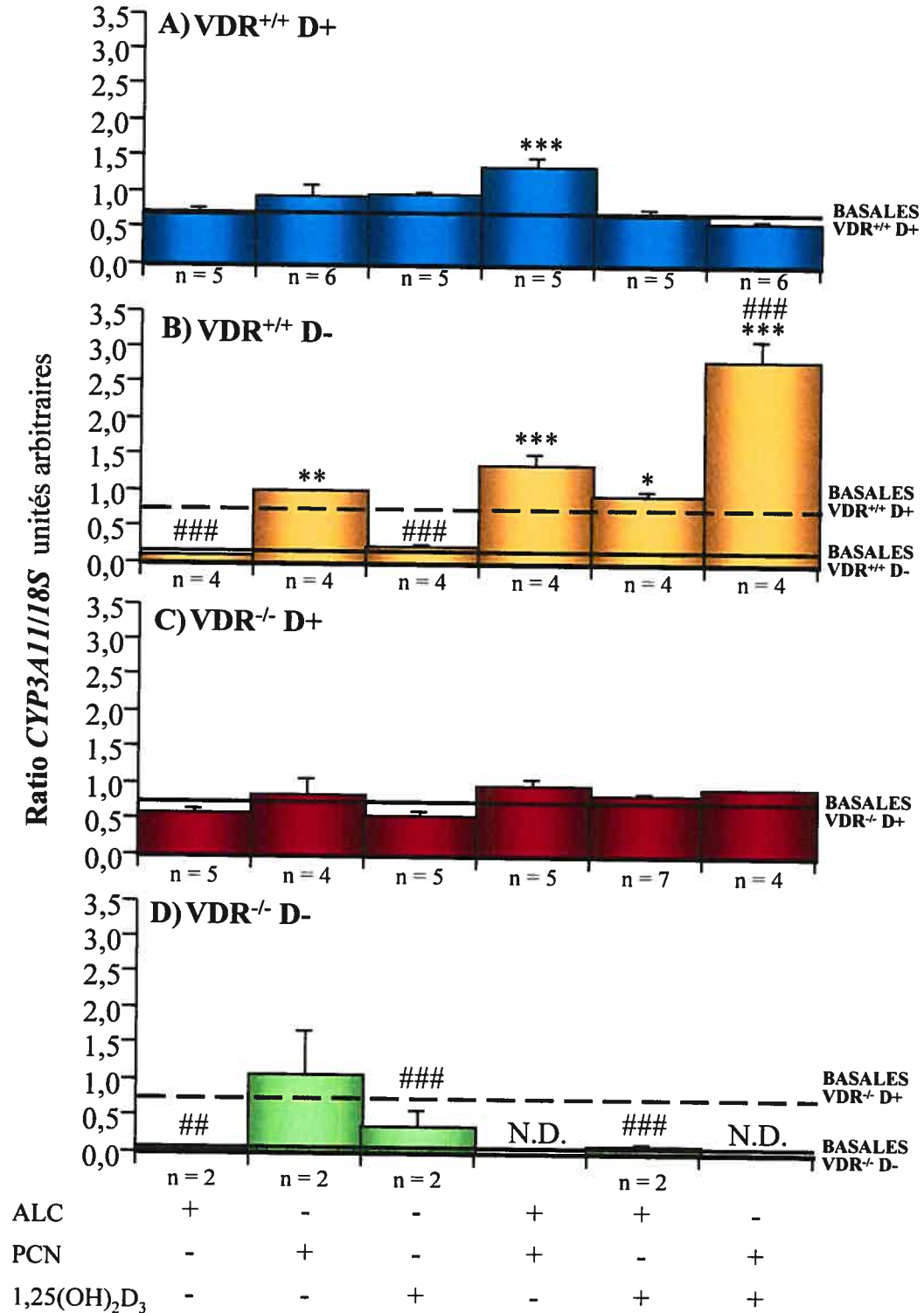
## **7.2 Effets de divers inducteurs sur l'expression génique du *CYP3A11* intestinal chez les souris de type $VDR^{+/+}$ et $VDR^{-/-}$ normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-)**

La figure 6 présente l'analyse de Northern de l'expression génique du *CYP3A11* intestinal suite au traitement de divers inducteurs chez des souris de type  $VDR^{+/+}$  (A,B) et  $VDR^{-/-}$  (C,D) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-). Les souris ont reçu l'ALC, le PCN, la  $1,25(OH)_2D_3$  ou l'une des combinaisons suivantes : ALC+PCN, ALC+ $1,25(OH)_2D_3$  et PCN+ $1,25(OH)_2D_3$ .

### **7.2.1 Chez l'animal de type $VDR^{+/+}$ au statut nutritionnel normal (D+)**

Nos résultats, chez l'animal  $VDR^{+/+}$  soumis à la diète régulière (fig. 6A), montrent que l'expression du *CYP3A11* est significativement augmentée, comparativement à l'état basal, suite au traitement avec la combinaison ALC+PCN ( $p < 0,0001$ ). L'expression du *CYP3A11* ne semble pas être influencée par les autres traitements.

**Figure 6.** Effets de divers inducteurs sur l'expression génique du *CYP3A11* intestinal chez des souris de type  $VDR^{+/+}$  (A,B) et  $VDR^{-/-}$  (C,D) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-). L'expression mesurée chez les animaux traités uniquement au véhicule (propylène-glycol) représente l'expression à l'état basal (—) ou (- - -); traités à l'acide lithocholique (ALC); au PCN; à la  $1,25(OH)_2D_3$  et des combinaisons ALC+PCN; ALC+ $1,25(OH)_2D_3$  et PCN+ $1,25(OH)_2D_3$ . Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  E.T. Les effets de la diète et du génotype furent évalués par l'analyse multifactorielle de variance (ANOVA) et les comparaisons inter-groupes (basal vs traitement) furent évaluées par le test de Bonferonni/Dunn. Les différences entre les groupes dont le degré d'erreur est inférieur à  $p < 0,005$  furent considérées d'après le test de Bonferonni/Dunn statistiquement significatives. L'astérisque (\*) représente les différences suite au traitement par rapport à l'état basal, alors que le dièse (#) représente les différences reliées au génotype et à la diète. (\*  $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ )



**Figure 6.** Expression génique du *CYP3A11* intestinal suite au traitement de divers inducteurs dans l'intestin de souris de type VDR<sup>+/+</sup> (A,B) et VDR<sup>-/-</sup> (C,D) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-).

### **7.2.2 Chez l'animal de type VDR<sup>+/+</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-)**

En condition de carence en vitamine D (fig. 6B), l'administration du PCN ( $p = 0,0002$ ) ou de la combinaison ALC+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $p = 0,0004$ ) permet à la souris carencée VDR<sup>+/+</sup> de rétablir l'expression du *CYP3A11* au même niveau que celui retrouvé chez la souris soumise à la diète régulière. De plus, l'administration des combinaisons ALC+PCN ( $p < 0,0001$ ) et PCN+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ( $p < 0,0001$ ) à cet animal nous permet d'observer une augmentation encore plus significative du *CYP3A11* comparativement à l'état basal. L'administration de l'ALC ou de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> n'affecte pas l'expression du *CYP3A11*.

### **7.2.3 Chez l'animal de type VDR<sup>-/-</sup> au statut nutritionnel normal (D+)**

L'expression du *CYP3A11* de la souris normale (D+) dont le récepteur VDR<sub>n</sub> n'est pas fonctionnel (fig. 6C) n'est affecté par aucun des traitements administrés.

#### **7.2.4 Chez l'animal de type VDR<sup>-/-</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-)**

L'expression du *CYP3A11* de l'animal VDR<sup>-/-</sup> carencé en D (D-) (fig. 6D), n'est pas significativement influencée par les différents traitements administrés. Aucune donnée n'est disponible pour les traitements ALC+PCN et PCN+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (N.D.).

#### **7.2.5 Résumé de l'effet des traitements sur l'ensemble des animaux**

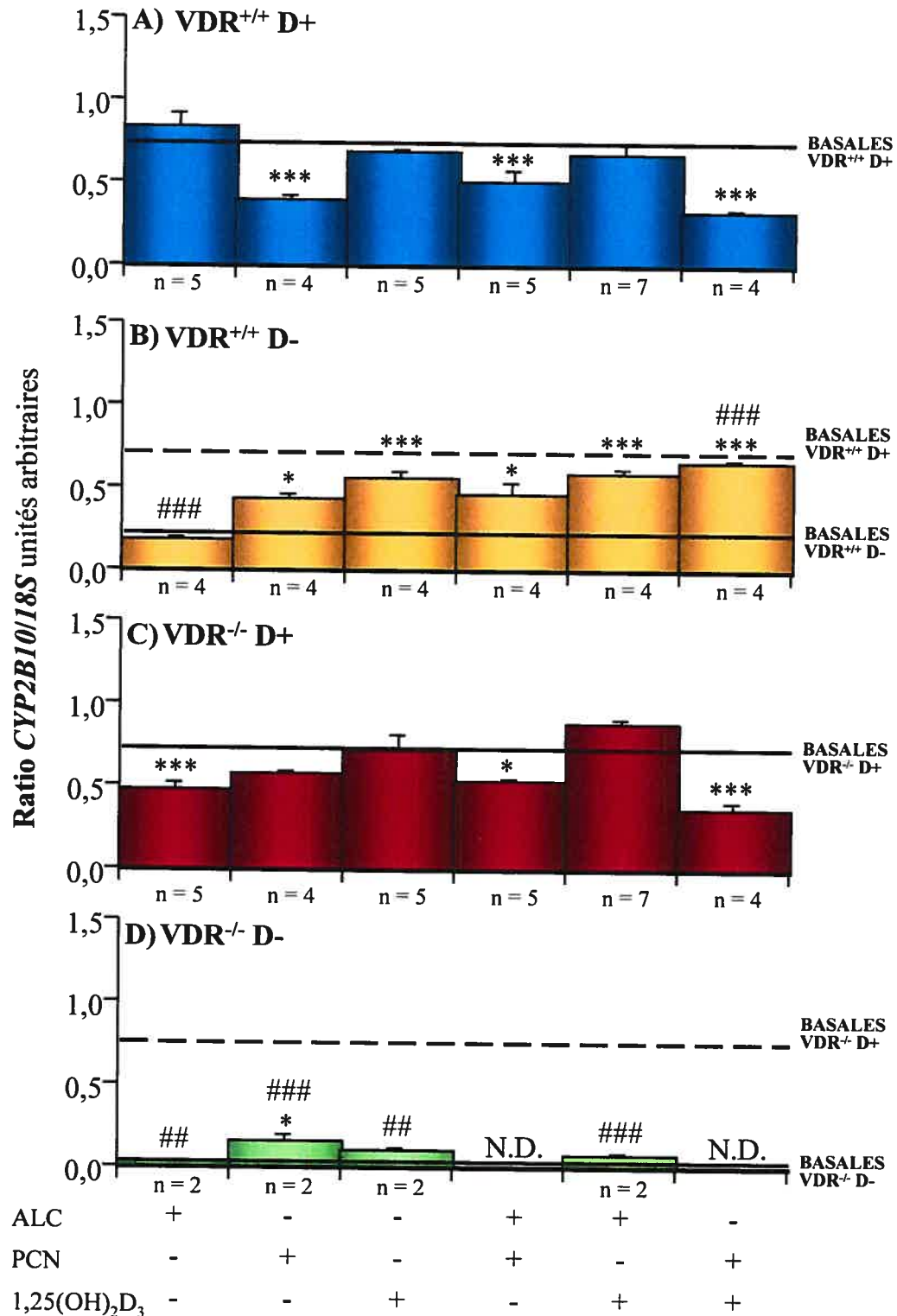
Le traitement à l'ALC ou à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ne permet pas la restauration de l'expression génique chez les animaux carencés en D ( $p < 0,0001$ ) alors que les traitements au PCN et celui à l'ALC+PCN restaurent l'expression au niveau des animaux ayant une diète normale en D. Finalement, nous observons un impact à la fois de la carence ( $p < 0,001$ ) et du génotype ( $p < 0,0001$ ) sur l'expression génique du *CYP3A11* suite au traitement combiné d'ALC et de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. En effet, nous observons que ce traitement permet de retrouver l'expression observée chez l'animal recevant une diète normale en D uniquement chez l'animal VDR<sup>+/+</sup>. De manière surprenante, nous observons une induction importante ( $p < 0,0001$ ) du *CYP3A11* chez l'animal VDR<sup>+/+</sup> et

carencé en D qui dépasse largement celles qui sont observées chez les animaux ayant reçu la diète normale. Toutefois, nous n'avons pas de données disponibles pour les animaux  $VDR^{-/-}$  soumis à la diète carencée.

### **7.3 Effet de divers inducteurs sur l'expression génique du cytochrome *CYP2B10* intestinal chez les souris de type $VDR^{+/+}$ et $VDR^{-/-}$ normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-)**

La figure 7 présente l'analyse de Northern de l'expression génique du *CYP2B10* intestinal suite au traitement par divers inducteurs chez des souris de type  $VDR^{+/+}$  (A,B) et  $VDR^{-/-}$  (C,D) normales (D+) ou carencées en D (D-). Les souris ont reçu l'ALC, le PCN, la  $1,25(OH)_2D_3$  ou l'une des combinaisons suivantes : ALC+PCN, ALC+ $1,25(OH)_2D_3$  et PCN+ $1,25(OH)_2D_3$ .

**Figure 7.** Effets de divers inducteurs sur l'expression génique du *CYP2B10* intestinal chez des souris de type  $VDR^{+/+}$  (A,B) et  $VDR^{-/-}$  (C,D) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-). L'expression mesurée chez les animaux traités uniquement au véhicule (propylène-glycol) représente l'expression à l'état basal (—) ou (- - -); traités à l'acide lithocholique (ALC); au PCN; à la  $1,25(OH)_2D_3$  et des combinaisons ALC+PCN; ALC+ $1,25(OH)_2D_3$  et PCN+ $1,25(OH)_2D_3$ . Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  E.T. Les effets de la diète et du génotype furent évalués par l'analyse multifactorielle de variance (ANOVA) et les comparaisons inter-groupes furent évaluées par le test de Bonferonni/Dunn. Les différences entre les groupes dont le degré d'erreur est inférieur à  $p < 0,005$  furent considérées d'après le test de Bonferonni/Dunn statistiquement significatives. L'astérisque (\*) représente les différences suite au traitement par rapport à l'état basal, alors que le dièse (#) représente les différences reliées au génotype et à la diète. (\*  $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ )



**Figure 7.** Expression génique du *CYP2B10* intestinal suite au traitement de divers inducteurs dans l'intestin de souris de type VDR<sup>+/+</sup> (A,B) et VDR<sup>-/-</sup> (C,D) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-).



### **7.3.1 Chez l'animal de type VDR<sup>+/+</sup> au statut nutritionnel normal (D+)**

L'administration du PCN et des combinaisons ALC+PCN et PCN+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> entraîne une baisse significative ( $p < 0,0001$ ) de l'expression du *CYP2B10* chez l'animal VDR<sup>+/+</sup> soumis à la diète normale (fig. 7A). L'administration de l'ALC et de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, seul ou en combinaison, n'affecte pas l'expression du *CYP2B10* comparativement à l'état basal.

### **7.3.2 Chez l'animal de type VDR<sup>+/+</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-)**

L'expression du *CYP2B10* chez la souris VDR<sup>+/+</sup> carencée en D (fig. 7B) est significativement plus élevée suite à l'administration du PCN ( $p = 0,0011$ ) ou de la combinaison ALC+PCN ( $p = 0,0003$ ) et encore plus ( $p < 0,0001$ ) par l'administration de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et des combinaisons ALC+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et PCN+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. L'ALC seul n'affecte pas l'expression du *CYP2B10* chez ces souris.

### **7.3.3 Chez l'animal de type $VDR^{-/-}$ au statut nutritionnel normal (D+)**

L'expression du *CYP2B10* de la souris dont le récepteur à la vitamine D n'est pas fonctionnel (fig. 7C) est significativement plus faible suite au traitement à la combinaison ALC+PCN ( $p = 0,001$ ) et encore plus ( $p < 0,0001$ ) par l'ALC et la combinaison PCN+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> comparativement à l'état basal. L'administration du PCN, de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et de la combinaison ALC+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> n'affecte pas l'expression du *CYP2B10* de ces animaux.

### **7.3.4 Chez l'animal de type $VDR^{-/-}$ au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-)**

L'expression du *CYP2B10* de l'animal  $VDR^{-/-}$  carencé en D (fig. 7D) est significativement plus élevée suite à l'administration du PCN ( $p = 0,002$ ). L'administration de l'ALC, de la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et de la combinaison ALC+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> n'influence pas l'expression du *CYP2B10* chez ces animaux. Aucune donnée n'est disponible pour les traitements ALC+PCN et PCN+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (N.D.).

### **7.3.5 Résumé de l'effet des traitements sur l'ensemble des animaux**

Le traitement à l'ALC ne permet pas la restauration de l'expression génique chez les animaux carencés en D ( $p < 0,0001$ ) alors que les traitements au PCN et à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (seuls ou en combinaison) augmentent de façon significative l'expression du *CYP2B10*. Cependant, seule la combinaison PCN+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  permet de rétablir l'expression au niveau des animaux ayant une diète normale en D. Finalement, nous observons un impact à la fois de la carence ( $p < 0,001$ ) et du génotype ( $p < 0,001$ ) sur l'expression génique du *CYP2B10* suite au traitement de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . En effet, nous observons que ce traitement permet d'augmenter l'expression uniquement chez l'animal  $\text{VDR}^{+/+}$ .

### **7.4. Effets de divers inducteurs sur l'expression génique du *CYP24* intestinal chez les souris de type $\text{VDR}^{+/+}$ et $\text{VDR}^{-/-}$ normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-)**

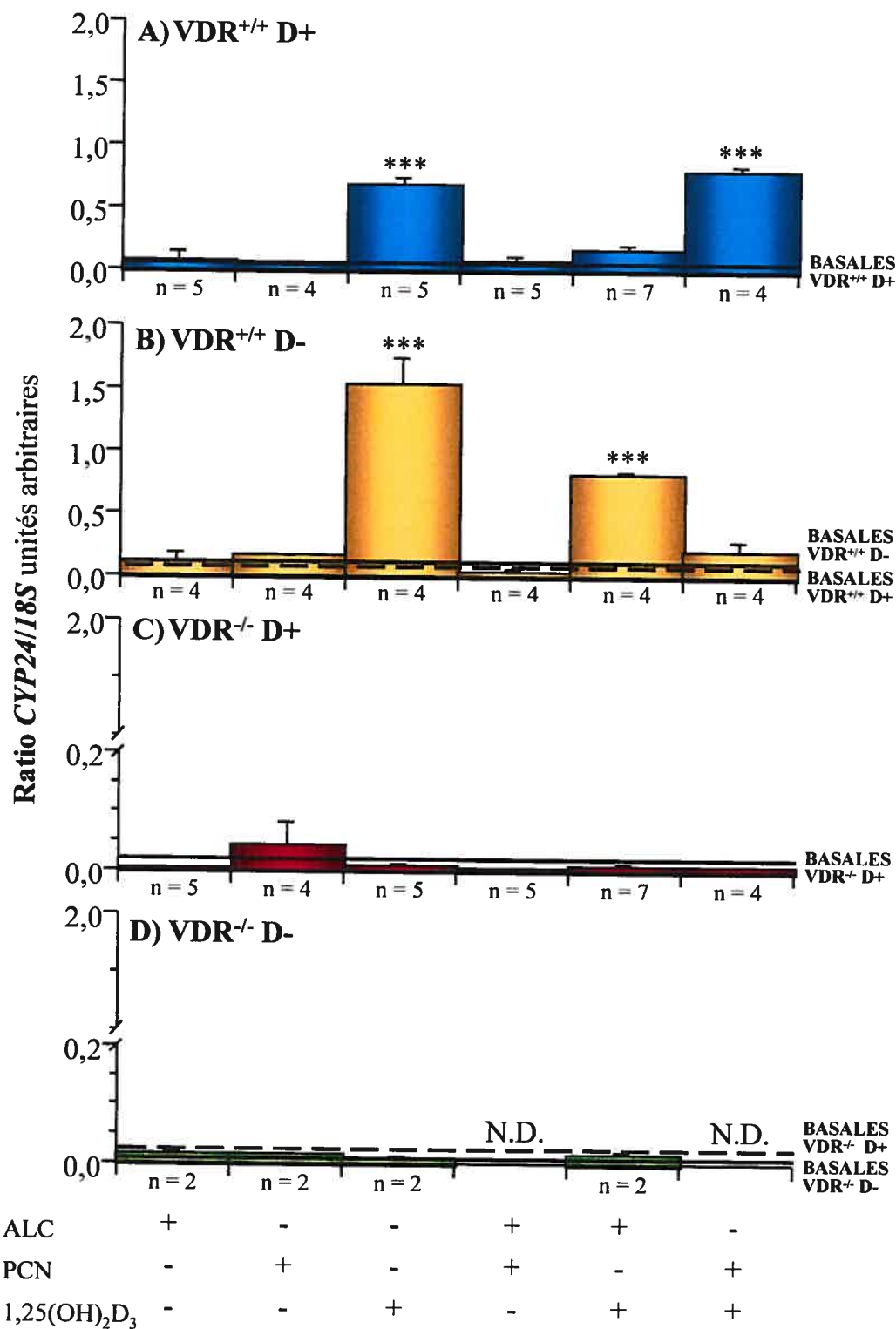
La figure 8 présente l'analyse de Northern de l'expression génique du *CYP24* intestinal après traitement par divers inducteurs chez des souris de type  $\text{VDR}^{+/+}$  (A,B) et  $\text{VDR}^{-/-}$  (C,D) normales (D+) ou carencées en D (D-). Les souris ont

reçu l'ALC, le PCN, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ou l'une des combinaisons suivantes : ALC+PCN, ALC+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  et PCN+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

#### **7.4.1 Chez l'animal de type $\text{VDR}^{+/+}$ au statut nutritionnel normal (D+)**

L'expression du *CYP24* de l'animal  $\text{VDR}^{+/+}$  soumis à la diète régulière (D+) (fig. 8A) est significativement plus élevée ( $p < 0,0001$ ) suite au traitement à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  ou à la combinaison PCN+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . L'administration de l'ALC, du PCN et des combinaisons ALC+PCN et ALC+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  à ces animaux n'affecte pas l'expression du *CYP24*.

**Figure 8.** Expression génique du *CYP24* intestinal chez des souris de type  $VDR^{+/+}$  (A,B) et  $VDR^{-/-}$  (C,D) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-). L'expression mesurée chez les animaux traités uniquement au véhicule (propylène-glycol) représente l'expression à l'état basal (—) ou (- - -); traités à l'acide lithocholique (ALC); au PCN; à la  $1,25(OH)_2D_3$  et des combinaisons ALC+PCN; ALC+ $1,25(OH)_2D_3$  et PCN+ $1,25(OH)_2D_3$ . Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  E.T. Les effets de la diète et du génotype furent évalués par l'analyse multifactorielle de variance (ANOVA) et les comparaisons inter-groupes furent évaluées par le test de Bonferonni/Dunn. Les différences entre les groupes dont le degré d'erreur est inférieur à  $p < 0,005$  furent considérées d'après le test de Bonferonni/Dunn statistiquement significatives. (\*  $p < 0,005$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ )



**Figure 8.** Expression génique du *CYP24* intestinal suite au traitement de divers inducteurs dans l'intestin de souris de type VDR<sup>+/+</sup> (A,B) et VDR<sup>-/-</sup> (C,D) normales (D+) ou carencées en vitamine D (D-).

#### **7.4.2 Chez l'animal de type VDR<sup>+/+</sup> au statut nutritionnel carencé en vitamine D (D-)**

La carence en D conjuguée au traitement à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou à la combinaison ALC+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (fig. 8B) entraîne une augmentation significative de l'expression du *CYP24* alors que les autres traitements n'altèrent pas le *CYP24* chez ces animaux.

#### **7.4.3 Chez l'animal de type VDR<sup>-/-</sup> au statut nutritionnel normal (D+) et carencé en vitamine D (D-)**

L'expression du *CYP24* n'est pas influencée par aucun des traitements chez l'animal dont le récepteur n'est pas fonctionnel, en état de carence alimentaire (D-) ou ayant un statut nutritionnel en D normal (D+) (fig. 8C,D).

**CHAPITRE IV**  
**DISCUSSION ET CONCLUSION**



## 8. DISCUSSION

Dernièrement, le système cellulaire de la vitamine D<sub>3</sub> s'est étendu pour inclure une signalisation croisée qui mène à l'induction de cytochromes P450 des familles CYP3A et CYP2B, deux des familles les plus importantes dans le métabolisme des substances endogènes et exogènes chez l'humain (63-65). De plus, des travaux récents rapportent que cette signalisation croisée englobe également la liaison de l'acide biliaire cytotoxique lithocholique (ALC) au VDR<sub>n</sub>, résultant également en l'activation et l'induction du cytochrome CYP3A (67,68,70). Dans ce contexte, il s'avérait primordial de vérifier l'implication du système endocrinien de la vitamine D dans la régulation des cytochromes CYP3A11 et CYP2B10. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris de génotype VDR<sup>+/+</sup> et VDR<sup>-/-</sup> afin de vérifier l'implication directe du récepteur nucléaire à la vitamine D (VDR<sub>n</sub>) dans l'induction de ces cytochromes P450. De plus, nous avons soumis ces deux groupes d'animaux à une diète carencée en D afin de vérifier l'implication de la vitamine D<sub>3</sub> ou de l'hormone 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (indépendamment du VDR<sub>n</sub>) dans la modulation de l'expression de ces cytochromes P450.

À l'état basal, chez les animaux dont le statut nutritionnel est normal, l'expression des *CYP3A11* et *CYP2B10* intestinaux est similaire chez les deux génotypes. Cette expression similaire du *CYP3A11* entre les deux génotypes a

également été observée chez les animaux mutants  $CAR^{-/-}$ ,  $PXR^{-/-}$  et  $PXR^{-/-}CAR^{-/-}$  (20,87). Ces résultats ne permettent pas d'impliquer un seul récepteur dans la modulation de ces CYP et suggèrent plutôt, dans le cas des animaux que nous avons étudiés, la participation d'autres récepteurs (i.e. PXR) ou encore un effet compensatoire par l'un ou l'autre de ces récepteurs lors d'une déficience de l'un d'entre eux.

Notre équipe a déjà montré que la carence nutritionnelle en vitamine D entraînait une baisse de l'expression des *CYP3A* hépatiques chez le rat (86). Nos résultats montrent ici pour la première fois que la carence en D entraîne une baisse de plus de 80% de l'expression des *CYP3A11* et *CYP2B10* intestinaux et ce, chez les deux génotypes. Nous remarquons également que l'expression du *CYP2B10* est encore plus faiblement exprimée chez la souris  $VDR^{-/-}$  soumise à la carence en D, comparativement à la souris sauvage soumise à la même diète. Ces résultats impliquent directement l'hormone  $1,25(OH)_2D_3$  dans la régulation des deux cytochromes P450 et suggèrent qu'une carence nutritionnelle en vitamine D pourrait prédisposer les sujets à une accumulation et/ou aux effets toxiques des divers xénobiotiques, l'expression des deux principaux cytochromes P450 impliqués dans leurs métabolismes y étant faiblement exprimés.

Des études ont montré que les diètes à forte teneur en gras sont associées à une augmentation de l'excrétion fécale des acides biliaires dont l'acide lithocholique (ALC) qui, contrairement aux acides primaires, est peu réabsorbé par la circulation entérohépatique et se retrouve donc ainsi dans le côlon. L'ALC est un agent hépatotoxique qui peut également promouvoir la formation de cancer colorectal. Cependant, des études ont montré qu'un supplément en vitamine D pouvait permettre de réduire l'incidence du cancer du côlon associé aux diètes à forte teneur en gras. Alors que des études ont déjà montré que les acides biliaires pouvaient moduler les CYP par le biais des récepteurs PXR et CAR (15,22), une nouvelle hypothèse a été émise impliquant plutôt le  $VDR_n$  comme senseur de l'acide lithocholique dans l'induction de l'expression génique du *CYP3A11* (67). Afin de vérifier cette hypothèse nous avons soumis les deux génotypes  $VDR_n$  à l'ALC. De plus, nous avons également administré le  $16\alpha$ -carbonitrile pregnane pregnenolone (PCN) et la  $1,25(OH)_2D_3$  pour comparer leur pouvoir inducteur sur l'expression des *CYP3A11* et *CYP2B10* (1,10,63,64).

Contrairement à ce qui a été observé par l'équipe de Mangelsdorf (67), nous n'observons pas d'augmentation significative de l'expression du *CYP3A11* intestinal chez les animaux ayant un statut nutritionnel normal après traitement à l'ALC, au PCN ou à la  $1,25(OH)_2D_3$ . Cet effet peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas utilisé les mêmes portions de l'intestin, nous observons

toutefois une induction de plus de 178 % du *CYP3A11* hépatique suite au traitement PCN (89). Seule la combinaison ALC+PCN entraîne une augmentation significative de ce cytochrome intestinal chez la souris VDR<sup>+/+</sup>. Le PCN étant un inducteur connu du CYP3A par le biais du PXR, l'effet additif provoqué par l'ajout de l'ALC suggère l'implication d'un autre récepteur. En effet, l'ablation du récepteur à la vitamine D (VDR<sub>n</sub>) semble abolir l'augmentation du *CYP3A11* suite au traitement de la combinaison ALC+PCN. Ces résultats supportent l'hypothèse voulant que le récepteur VDR<sub>n</sub> soit un senseur de l'ALC dans l'induction du *CYP3A11* intestinal. L'activation du récepteur PXR conjointement à l'ALC pourrait donc augmenter la protection contre les effets toxiques de cet acide biliaire par une augmentation du *CYP3A11*.

En situation de carence en D, peu importe le génotype, le PCN entraîne une augmentation des *CYP3A11* et *CYP2B10* intestinaux. Ces résultats appuient les études précédentes qui suggèrent le PCN comme agoniste du PXR dans l'induction de ces cytochromes (5,13,19). L'activation du PXR par le PCN permet à l'animal de contrer totalement l'effet de la carence en D sur l'expression du *CYP3A11* et partiellement l'effet sur le *CYP2B10*. Cependant lorsque l'animal a un statut nutritionnel normal, nous observons que le PCN a alors un effet inverse sur le *CYP2B10* (i.e. une diminution) qui peut s'expliquer par divers facteurs tels la voie d'administration utilisée (gavage), la dose plus

élevée, ainsi que le type cellulaire (entérocytes). De plus cet effet n'est pas observé au niveau du foie (89). La régulation de ce cytochrome intestinal par le PXR semble donc également être influencée par le statut nutritionnel en D.

Les résultats obtenus dans cette étude, montrent pour la première fois que l'animal carencé en D est plus sensible aux effets nocifs de l'ALC. En effet, l'administration de l'ALC aux deux génotypes carencés n'affecte pas l'expression des *CYP3A11* et *CYP2B10* intestinaux. Nos animaux carencés ayant des *CYP3A* et *CYP2B* très faiblement exprimés, l'ALC pourrait alors s'accumuler dans l'organisme et exercer ses effets toxiques. Cependant, lorsque nous administrons la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  conjointement à l'ALC, nous observons alors une augmentation de l'expression du *CYP3A11*. Ce résultat suggère que la modulation du *CYP3A11* intestinal par l'ALC nécessite la participation de l'hormone. De plus, cette augmentation n'est pas retrouvée chez la souris dont l'expression du récepteur a été abolie. Ces résultats suggèrent que le récepteur nucléaire à la vitamine D est également nécessaire à la régulation de ce cytochrome par l'ALC. L'administration conjointe de l'ALC et de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  permet à l'animal de contrer totalement l'effet la carence en D sur l'expression du *CYP3A11*. Alors que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  seule n'influence pas significativement le *CYP3A11* contrairement à ce qui a déjà été observé chez l'animal normal (33). Il semble donc que l'animal carencé soit moins sensible que l'animal normal au traitement de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . De plus,

nous remarquons que le traitement de ces animaux avec la combinaison ALC+PCN apporte une protection supérieure à celle engendrée par le PCN seul ou par la combinaison ALC+1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, en augmentant de façon plus importante l'expression du *CYP3A11*. Cependant, l'administration conjointe du PCN avec la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> entraîne un effet additif encore plus exacerbé sur le *CYP3A11*. Ces résultats suggèrent la participation des deux récepteurs PXR et VDR<sub>n</sub> dans l'induction du *CYP3A11* et appuient les études précédentes qui montrent que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> possède une plus grande affinité pour le VDR<sub>n</sub> que l'ALC (67,68,70). Ces deux agonistes qui utilisent des sites de liaison à des acides aminés distincts engendrent des conformations différentes du récepteur et modifient ainsi la modulation de différents cofacteurs (68).

Pour la première fois, les résultats lors de notre étude montrent que chez l'animal carencé, l'expression du *CYP2B10* peut être augmenté par la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. De plus, cette régulation du *CYP2B10* nécessite la participation du VDR<sub>n</sub> puisque cette réaction est abolie chez l'animal dont le récepteur n'est pas fonctionnel. Ces résultats suggèrent donc que l'administration de l'hormone aux sujets souffrants d'hypovitaminose D, pourrait apporter une certaine protection en augmentant le cytochrome CYP2B, bien que cette augmentation soit loin d'être suffisante pour abolir totalement l'effet engendré par la carence en D. Cependant, l'administration conjointe du PCN avec la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> entraîne un effet additif sur le *CYP2B10* qui permet alors à

l'animal de contrer totalement l'effet de la carence. Il est postulé que l'administration conjointe d'agonistes des récepteurs PXR et VDR<sub>n</sub> aux sujets hypovitaminiques D, pourrait apporter une protection importante contre divers xénobiotiques en rétablissant complètement le *CYP2B10* et en augmentant fortement le *CYP3A11*.

La 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> possède la caractéristique de pouvoir réguler son propre catabolisme par une activation de la D-24 hydroxylase (*CYP24*) par le biais du récepteur nucléaire à la vitamine D (45). En effet, nos résultats chez la souris VDR<sup>+/+</sup>, peu importe le statut nutritionnel, montrent que le traitement à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> permet une augmentation du *CYP24*. Cette augmentation est cependant supérieure chez l'animal carencé. Tel que prévu, l'expression du *CYP24* intestinal des animaux dont le récepteur à la vitamine D n'est pas fonctionnel n'est pas ou très peu détectable. De plus, aucun des inducteurs utilisés ALC, PCN, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou une combinaison de ceux-ci, n'a pu augmenter l'expression du *CYP24*; c'est-à-dire que le *CYP24* est totalement silencieux chez ces animaux VDR<sup>-/-</sup> et ce, indépendamment du statut nutritionnel en vitamine D.

De plus, nos résultats montrent pour la première fois que l'administration de l'ALC conjointement à la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, peu importe le statut nutritionnel,

permet de contrer à 50% l'augmentation du *CYP24* entraînée par l'hormone seule.

Récemment, l'équipe de Vilarem (85) a montré, dans le foie et le rein de souris, une augmentation de l'expression génique du *CYP24* suivant le traitement au PCN et au dexaméthazone, deux agonistes du PXR. Nos résultats ne nous permettent pas de confirmer cette étude puisque nous ne détectons pas d'augmentation significative du *CYP24* intestinal suite à un traitement au PCN. Cependant, nos résultats chez l'animal carencé (seulement) montrent que l'administration conjointe du PCN et de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  permet de contrer presque totalement l'augmentation du *CYP24* engendrée par l'hormone. Des études ont déjà montré que le PCN ne pouvait pas lier le  $\text{VDR}_n$ , ce qui suggère plutôt une compétition entre les deux récepteurs pour le VDRE du *CYP24*. Cette réaction pourrait favoriser l'organisme en prolongeant la durée d'action de l'hormone et en favorisant ainsi la régulation des cytochromes P450 par la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



## CONCLUSION

Le système cellulaire de la vitamine D<sub>3</sub> s'est dernièrement étendu pour inclure une signalisation croisée qui mène à l'induction de cytochromes P450 des familles CYP3A et CYP2B. L'acide lithocholique (ALC) est un acide biliaire secondaire particulièrement toxique. Il est métabolisé par les cytochromes P450 et, dernièrement, certaines études ont identifié le récepteur à la vitamine D comme senseur de cet acide biliaire. En effet, nos résultats chez l'animal au statut normal montrent que l'ALC permet une augmentation du *CYP3A11* lorsqu'il est administré conjointement avec le PCN et cette induction est abolie lorsque le VDR<sub>n</sub> n'est pas fonctionnel, suggérant ainsi l'implication du VDR<sub>n</sub> dans la régulation du *CYP3A* par l'ALC. Alors que l'ablation du récepteur à la vitamine D ne semble pas influencer l'expression des cytochromes à l'état basal, nous observons cependant que la carence nutritionnelle en vitamine D entraîne une diminution significative de l'expression génique des cytochromes *CYP3A11* et *CYP2B10*. L'hypovitaminose D pourrait donc rendre plus sensibles les sujets aux effets de l'accumulation de substances toxiques et/ou aux effets de divers xénobiotiques. De plus, nos résultats chez les animaux carencés montrent pour la première fois, que l'ALC seul n'influence pas l'expression génique des *CYP3A11* et *CYP2B10* intestinaux. Il est donc présumé que les sujets souffrants d'hypovitaminose D pourraient être plus sensibles aux effets nocifs de l'ALC. Nos résultats montrent que la

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et son récepteur sont nécessaires à l'induction du *CYP3A11* par l'ALC. De plus, nous observons que l'ALC mène à une inhibition de 50% de l'induction du CYP24 normalement observée suite à l'administration de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Nos résultats montrent également que l'activation du PXR apporte une protection contre la carence en D, en entraînant une augmentation significative des cytochromes *CYP3A11* et *CYP2B10*. L'activation PXR apporte donc une certaine protection en carence vitaminique D. De plus, l'ajout de l'ALC au traitement PCN entraîne un effet additif sur le *CYP3A11* qui serait attribuable à l'activation du VDR<sub>n</sub>, puisque cette réaction est abolie chez la souris VDR<sup>-/-</sup>. Cependant, l'activation de ce récepteur se révèle être plus sensible à son ligand propre, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, puisque la combinaison 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>+PCN entraîne une augmentation beaucoup plus significative du *CYP3A11* que la combinaison ALC+PCN.

Le statut nutritionnel en vitamine D, plus que le génotype VDR<sub>n</sub>, semble être un élément important et primordial dans la régulation des cytochromes P450 CYP3A et CYP2B. En cas de carence en D, l'activation d'autres récepteurs pourrait conférer une certaine protection.

**CHAPITRE V**  
**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## 10. RÉFÉRENCES BIOGRAPHIQUES :

- 1- **Handschin C. and Meyer U.A.** Induction of drug metabolism : the role of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*. **55** (4) : 649-673, 2003.
- 2- **Estabrook R.W.** A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab. And Dispos.* **31** (12) : 1461-1473, 2003.
- 3- **Sueyoshi T. and Negishi M.** Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41** : 123-143, 2001.
- 4- **Klingberg M.** Pigments of rats liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75** (2) : 376-386, 1958.
- 5- **Goodwin B., Redinbo M.R. and Kliewer S.A.** Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane X receptor. *Annu. Rev. Pharm. Toxic.* **42** : 1-23, 2002.
- 6- **Araya Z. and Wikvall K.** 6alpha-hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A in human liver microsomes. *Bioch. Biophys. Acta.* **1438** (1) : 47-54, 1999.
- 7- **Xie W., Radominska-Pandya A., Shi Y., Simon C.M., Nelson M.C., Ong E.S., Waxman D.J. and Evans R.M.** An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98** (6) : 3375-3380, 2001.

- 8- Teixeira J. and Gil G.** Cloning, expression, and regulation of lithocholic acid 6 beta-hydroxylase. *JBC*. **266** (31) : 21030-36, 1991.
- 9- Klierer S.A., Goodwin B. and Wilson T.M.** The nuclear pregnane X receptor : a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr. Reviews*. **23** (5) : 687-702, 2002.
- 10- Handschin C., Podvinec M., Stockli J., Hoffmann K. and Meyer U.A.** Conservation of signaling pathways of xenobiotic-sensing orphan nuclear receptors, chicken xenobiotic receptor, constitutive androstane receptor, and pregnane x receptor, from birds to humans. *Molec. Endocrin.* **15** (9) : 1571-1585, 2001.
- 11- Xie W., Uppal H., Saini S.P.S., Mu Y., Little J.M., Radomska-Pandya A. and Zemaitis M.A.** Orphan nuclear receptor-mediated xenobiotic regulation in drug metabolism. *Reviews/research focus*. **9** (10) : 442-449, 2004.
- 12- Burk O. and Wojnowski L.** Review : Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **369** : 105-124, 2004.
- 13- Pascussi J.M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Maurel P. and Vilarem M.J.** The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes : a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochimica Biophysica Acta*. **1619** : 243-253, 2003.
- 14- Klierer S.A.** The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification. *Nutr. Genom. In Cancer Processes*. : S2444-S2447, 2003.

- 15-Xie w., Barwick J.L., Simon C.M., Pierce A.M., Safe S., Blumberg B., Guzelian P.S. and Evans R.M.** Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes and Devel.* **14** : 3014-3023, 2000.
- 16-Zhang H., LeCulyse E., Liu L., Hu M., Matoney L., Zhu W. and al.** Rat pregnane X receptor : molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **368** : 14-22, 1999.
- 17-Savas U., Wester M.R., Griffin K.J. and Johnson E.F.** Rabbit pregnane X receptor is activated by rifampicin. *Drug Metab. Dispos.* **28** : 529-537, 2000.
- 18-Kliewer S.A., Moore J.T., Wade L., Staudinger J.L., Watson M.A. and al.** An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92** : 73-82, 1998.
- 19-Lehmann J.M., McKee D.D., Watson M.A., Wilson T.M., Moore J.T. and Kliewer S.A.** The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* **102** : 1016-1023, 1998.
- 20-Zhang J., Huang W., Qatanani M., Evans R.M. and Moore D.D.** The constitutive androstane receptor and pregnane x receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J. Biolog. Chemis.* **279** (47) : 49517-49522, 2004.

- 21-Xie W. and al.** An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. **98** (6) : 3375-3380, 2001.
- 22-Staudinger J.L., Goodwin B., Jones S.A., Hawkins-Brown D., MacKenzie K.I., LaTour A., Liu Y., Klaassen C.D., Brown K.K., Reinhard J., Willson T.M., Koller B.H. and Kliewer S.A.** The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **98** : 3369-3374, 2001.
- 23-Waxman D.J.** Minireview : P450 gene induction by structurally divers xenochemicals : Central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch. Biochem. Biophys.* **369** (1) : 11-23, 1999.
- 24-Holick M.F.** Potobiology of vitamin D. In : *Vitamin D* edited by D. Feldman, F.H. Glorieux and J.W. Pike. San Diego, CA : academic, chap. 3, p. 33-39, 1997.
- 25-Brown A.J., Dusso A. and Slatopolsky E.** Vitamin D. *Invited Review.* : F157-F175, 1999.
- 26-Omdahl J.L., Morris H.A. and May B.K.** Hydroxylases enzymes of the vitamin D pathway : Expression, function and regulation. *Annu. Rev. Nutr.* **22** : 139-166, 2002.

- 27-Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C. and Nebert D.W.** P-450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. **6** (1) : 1-42, 1996.
- 28-Gascon-Barré M.** The vitamin D 25-hydroxylase. In : *Vitamin D* edited by D. Feldman, F.H. Glorieux and J.W. Pike. San Diego, CA : academic, chap. 4, p. 41-55, 1997.
- 29-Hosseinpour F. and Wikvall K.** Porcine microsomal vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase (*CYP2D25*). *J. Biol. Chem.* **275** (44) : 34650-34655, 2000.
- 30-Axén E., Bergman T. and Wikvall K.** Microsomal 25-hydroxylation of vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in pig liver. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **51** (1/2) : 97-106, 1994.
- 31-Théodoropoulos C., Demers C., Mirshahi A. and Gascon-Barré M.** 1,25-Dihydrovitamin D<sub>3</sub> downregulates the rat intestinal vitamin D<sub>3</sub>-25-hydroxylase *CYP27A*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281** (2) : E315-E325, 2001.
- 32-Théodoropoulos C., Demers C., Petit J.L. and Gascon-Barré M.** High sensitivity of rat hepatic vitamin D<sub>3</sub>-25-hydroxylase *CYP27A* to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> administration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284** (1) : E138-E147, 2003.



- 33-Theodoropoulos C., Demers C., Delvin E., Ménard D. and Gascon-Barré M.** Calcitriol regulates the expression of the genes encoding the three key vitamin D<sub>3</sub> hydroxylases and the drug-metabolizing enzyme CYP3A4 in the human fetal intestine. *Clinical Endocrinology*. **58** : 489-499, 2003.
- 34-Horst R.L. and Reinhardt T.A.** Vitamin D Metabolism. In : *Vitamin D* edited by D. Feldman, F.H. Glorieux and J.W. Pike. San Diego, CA : academic, chap. 2, p. 13-31, 1997.
- 35-Fraser D.R. and Kodicek E.** Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature*. **228** (273) : 764-766, 1970.
- 36-Henry H.L., Midgett R.J. and Norman A.W.** Studies on calciferol metabolism X : Regulation of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1-hydroxylase, *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **249** : 7584-7592, 1974.
- 37-Henry H.L.** The 25-Hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -Hydroxylase. In : *Vitamin D* edited by D. Feldman, F.H. Glorieux and J.W. Pike. San Diego, CA : academic, chap. 5, p. 57-68, 1997.
- 38-Mawer E.B., Taylor C.M., Backhouse J., Lumb G.A. and Stanbury S.W.** Failure of formation of 1,25-dihydroxycholecalciferol in chronic renal insufficiency. *Lancet*. **1** : 626-628, 1973.
- 39-Hartenbower D.L., Stella F.J., Norman A.W., Friedler R.M. and Coburn J.W.** Impaired vitamin D metabolism in acute uremia. *J. Lab. Clin. Med.* **90** : 760-766, 1977.

- 40-Knutson J.C. and DeLuca H.F.** 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-24-hydroxylase. Subcellular location and properties. *Biochemistry*. **13** (7) : 1543-1548, 1974.
- 41-Reddy G.S. and Tserng K.Y.** Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> through C-24 oxidation pathway. *Biochemistry*. **28** (4) : 1763-1769, 1989.
- 42-Omdahl J.L., Bobrovnikova E.A., Choe S., Dwivedi P.P. and May B.K.** Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway. *Steroids*. **66** : 381-389, 2001.
- 43-Henry H.L.** The 25(OH)D<sub>3</sub>/1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-24R-hydroxylase : a catabolic or biosynthetic enzyme ? *Steroids*. **66** : 391-398, 2001.
- 44-Evans R.M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240** (4854) : 889-895, 1988.
- 45-Issa L.L., Leong G.M. and Eisman J.A.** Review : molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm. Res.* **47** : 451-475, 1998.
- 46-Haussler M.R. and Norman A.W.** Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. **62** (1) : 155-162, 1969.
- 47-Barsony J. and Prufer K.** Vitamin D receptor and retinoid X receptor interactions in motion. In : *Vitamins and Hormones, volume 65*. : 345-376, 2002.

- 48-McDonnell D.P., Mangelsdorf D.J., Pike J.W., Haussler M.R. and O'Malley B.W.** Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science*. **235** (4793) : 1214-1217, 1987.
- 49-Baker A.R., McDonnell D.P., Hughes M., Crips T.M., Mangelsdorf D.J., Haussler M.R., Pike J.W., Shine J. and O'Malley B.W.** Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. **85** (10) : 3294-3298, 1988.
- 50-Kamei Y., Kawada T., Fukuwatari T., Ono T., Kato S. and Sugimoto E.** Cloning and sequencing of the gene encoding the mouse vitamin D receptor. *Gene*. **152** (2) : 281-282, 1995.
- 51-Burmester J.K., Maeda N. and DeLuca H.F.** Isolation and expression of rat 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA*. **85** (4) : 1005-1009, 1988.
- 52-White J.H.** Profiling 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-regulated gene expression by microarray analysis. *Steroid Biochem. Molec. Biol.* **89-90** : 239-244, 2004.
- 53-Nemere I., Schwartz Z., Pedrozo H., Sylvia V.L., Dean D.D. and Boyan B.D.** Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> which mediates rapid activation of protein kinase C. *J. Bone Mineral Res.* **13** : 1353-1359, 1998.

- 54-Bouillon R., Okamura W.H. and Norman A.W.** Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocrine Reviews*. **16** (2) : 200-257,1995.
- 55-Chatterjee M.** Review : Vitamin D and genomic stability. *Mutation Res.* **475** : 69-88, 2001.
- 56-Fuleihan G.E-H., Nabulsi M., Choucair M., Salamoun M., Shahine C., Kizirian A. and Tannous R.** Hypovitaminosis D in healthy schoolchildren. *Pediatrics*. **107** (4) : 1-7, 2001.
- 57-Holick M.F.** Vitamin D : Photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In : *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Favus M, editor. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. : 92-98, 1999.
- 58-Yoshizawa T., Handa Y., Uematsu Y., Takeda S., Sekine K., Yoshihara Y., Kawakami T., Arioka K., Sato H., Uchiyama Y., Masushige S., Fukamizu A., Matsumoto T. and Kato S.** Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nature genetics* **16** : 391-397, 1997.
- 59-Li Y.C., Pirro A.E., Amling M., Delling G., Baron R., Bronson R. and Demay M.B.** 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.

- 60-Van Cromphaut S.J., Dewerchin M., Hoenderop J.G.J., Stockmans I., Van Herck E., Kato S., Bindels R.J.M., Collen D., Carmeliet P., Bouillon R. and Carmeliet G.** Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice : Functional and molecular aspects. *PNAS*. **98** (23) : 13324-13329, 2001.
- 61-Li Y.C., Amling M., Pirro A.E., Priemel M., Meuse J., Baron R., Delling G. and Demay M.B.** Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor ablated mice. *Endocrinology*. **139** (10) : 4391-4396, 1998.
- 62-Goodwin B., Gauthier K.C., Umetani M., Watson M.A., Lochansky M.I., Collins J.L., Leitersdorf E., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A. and Repa J.J.** Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *PNAS*. **100** (1) : 223-228, 2003.
- 63-Thompson P.D., Jurutka P.W., Whitfield G.K., Myskowski S.M., Eichhorst K.R., Dominguez C.E., Haussler C.A. and Haussler M.R.** Liganded VDR induces CYP3A4 in small intestinal and colon cancer cells via DR3 and ER6 vitamin D responsive elements. *Biochem. Biophys. Research Commun.* **299** : 730-738, 2002.

- 64-Thummel K.E., Brimer C., Yasuda K., Thottassery J., Senn T., Lin Y., Ishizuka H., Kharasch E., Schuetz J. and Schuetz E.** Transcriptional control of intestinal cytochrome P4503A by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Molecular Pharmacol.* **60** (6) : 1399-1406, 2001.
- 65-Drocourt L., Ourlin J-C., Pascussi J-M., Maurel P. and Vilarem M-J.** Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **277** (28) : 25125-25132, 2002.
- 66-Owen R.W., Dodo M., Thompson M.H. and Hill M.J.** Fecal steroids and colorectal cancer. *Nutr. Cancer* **9** : 73-80, 1987.
- 67-Makishima M., Lu T.T., Xie W., Whitfield G.K., Domoto H., Evans R.M., Haussler M.R. and Mangelsdorf D.J.** Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* **296** : 1313-1316, 2002.
- 68-Adachi R., Shulman A.I., Yamamoto K., Shimomura I., Yamada S., Mangelsdorf D.J. and Makishima M.** Structural determinants for vitamin D receptor response to endocrine and xenobiotic signals. *Molecular Endocrin.* **18** (1) : 43-52, 2004.
- 69-Jurutka P.W., Thompson P.D., Whitfield G.K., Eichhorst K.R., Hall N., Dominguez C.E., Hsieh J-C., Haussler C.A. and Haussler M.R.** Molecular and functional comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and the novel vitamin D receptor ligand, lithocholic acid, in activating transcription of cytochrome P450 3A4. *J. Cellular Biochem.* **11** (16) :1-20, 2003.

- 70-Adachi R., Honma Y., Masuno H., Kawana K., Shimomura I., Yamada S. and Makishima M.** Selective activation of vitamin D receptor by lithocholic acid acetate, a bile acid derivative. *J. Lipid Research.* **46** : 46-57, 2005.
- 71-Thompson P.D., Remus L.S., Hsieh J-C., Jurutka P.W., Whitfield G.K., Galligan M.A., Dominguez C.E., Haussler C.A. and Haussler M.R.** Distinct retinoid X receptor activation function-2 residues mediate transactivation in homodimeric and vitamin D receptor heterodimeric contexts. *Jour. Mole. Endoc.* **27** : 211-227, 2001.
- 72-Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J. and Rutter W.J.** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* **18** (24) : 5294-5299, 1979.
- 73-Yanagimoto T., Itoh S., Muller-Enoch D. and Kamataki T.** Mouse liver cytochrome P-450 (P-450IIIAM1) : its cDNA cloning and inductibility by dexamethasone. *Biochim. Biophys. Acta.* **1130** (3) : 329-332, 1992.
- 74-Saito S., Iida A., Sekine A., Kawauchi S., Higuchi S., Ogawa C. and Nakamura Y.** Catalog of 680 variations among eight cytochrome P-450 (*CYP*) genes, nine esterase genes, and two other genes in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* **48** (5) : 249-270, 2003.

- 75-Itoh S., Yoshimura T., Iemura O., Yamada E., Tsujikawa K., Kohama Y. and Mimura T.** Molecular cloning of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase (*CYP24*) from mouse kidney : its inductibility by vitamin D<sub>3</sub>. *Biochim. Biophys. Acta.* **1264** (1) : 26-28, 1995.
- 76-Mootha V.K., Bunkenborg J., Olsen J.V., Hjerrild M., Wisniewski J.R., Stahl E., Bolouri M.S., Ray H.N., Sihag S., Kamal M., Patterson N., Lander E.S. and Mann M.** Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell.* **115** (5) : 629-640, 2003.
- 77-Quack M. and Carlberg C.** Ligand-triggered stabilization of vitamin D receptor/retinoid X receptor heterodimer conformations on DR4-type response elements. *J. Mol. Biol.* **296** : 743-756, 2000.
- 78-Makinen J., Frank C., Jyrkkarinne J., Gynther J., Carlberg C. And Honkakoski P.** Modulation of mouse and human phenobarbital-responsive enhancer module by nuclear receptors. *Mol. Pharmacol.* **62**: 366-378, 2002.
- 79-Cheng J.B., Levine M.A., Bell N.H., Mangelsdorf D.J. and Russell D.W.** Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *PNAS.* **101** (20) : 7711-7715, 2004.
- 80-Yamasaki T., Izumi S., Ide H. and Ohyama Y.** Identification of a novel rat microsomal vitamin D<sub>3</sub> 25-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **279** (22) : 22848-22856, 2004.



- 81-Lin H., Kent U.M. and Hollenberg P.F.** The grapefruit juice effect is not limited to cytochrome P450 (P450) 3A4: Evidence for bergamottin-dependent inactivation, heme destruction, and covalent binding to protein in P450s 2B6 and 3A5. *J. Pharm. And Exp. Therapeutics.* **313** (1) : 154-164, 2005.
- 82-Dardenne O., Prud'homme J., Arabian A., Glorieux F.H. and St-Arnaud R.** Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1- $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology.* **142** (7) : 3135-3141, 2001.
- 83-Panda D.K., Miao D., Tremblay M.L., Sirois J., Farookhi R., Hendy G.N. and Goltzman D.** Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *PNAS.* **98** (13) : 7498-7503, 2001.
- 84-Demers C., Lemay J., Hendy G.N. and Gascon-Barré M.** Comparative *in vivo* expression of the calcitriol-24-hydroxylase gene in kidney and intestine. *J. Mol. Endo.* **18**: 37-48, 1997.
- 85-Pascussi J.M., Robert A., Minh N., Walrant-Debray O., Garabedian M., Martin P., Pineau T., Saric J., Navarro F., Maurel P. and Vilarem M.J.** Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J. Clini. Invest.* **115** (1) : 177-186, 2005.

- 86-Jaffry N.** Impact de l'insuffisance rénale sur le système endocrinien de la vitamine D<sub>3</sub> chez le rat. *Mémoire de maîtrise*. Avril 2004.
- 87-Uppal H., Toma D., Saini A.P.S., Ren S., Jones T.J. and Xie W.** Combined loss of orphan receptors PXR and CAR heightens sensitivity to toxic bile acids in mice. *Hepatology*. **41** (1) : 168-176, 2005.
- 88-Gigère V.** Orphan nuclear receptors : From gene to function. *Endocrine Reviews*. **20** (5) : 689-725, 1999.
- 89- Carrier M.** Rôle du système endocrinien de la vitamine D<sub>3</sub> sur l'induction de cytochromes hépatiques impliqués dans la détoxification-cytoprotection. *Mémoire de maîtrise*. Novembre 2005.
- 90- Goodwin B., Gauthier K.C., Umetani M., Watson M.A., Lochansky M.I., Collins J.L., Leitersdorf E., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A. and Repa J.J.** Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *PNAS*. **100** (1) : 223-228, 2003.
- 91- Xu D-X., Chen Y-H., Wang J-P., Sun M-F., Wang H., Wei L-Z. And Wei W.** Perinatal lipopolysaccharide exposure downregulates pregnane X receptor and CYP3A11 expression in fetal mouse liver. *Toxicological Sciences*. **87** (1): 38-45, 2005.