

Université de Montréal

**Rôle du système endocrinien de la vitamine D₃ sur l'induction de cytochromes P450
hépatiques impliquées dans la détoxification-cytoprotection**

par
Marilyn Carrier

Département de pharmacologie
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 pharmacologie

Décembre 2006

© Marilyn Carrier, 2006



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 endocrinien de la vitamine D₃ sur l'induction de cytochromes P450
hépatiques impliqués dans la détoxification-cytoprotection

Présenté par :
Marilyn Carrier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

| | |
|------------------------|------------------------|
| Yves Théorêt: | président-rapporteur |
| Marielle Gascon-Barré: | directeur de recherche |
| Edgard Delvin: | membre du jury |

RÉSUMÉ

Le foie est impliqué dans l'homéostasie de la vitamine D₃ (D₃) et exprime son récepteur (VDR). La production de la 25-hydroxyvitamine D₃ (25OHD₃), précurseur de la forme active 1,25-hydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃), nécessite le CYP27A1, aussi impliqué dans la synthèse d'un précurseur de l'acide lithocholique (ALC), qui est un puissant produit hépatotoxique. Le foie participe également, via les cytochromes P450 des familles CYP3A et CYP2B, au processus de détoxification de substances comme l'ALC. Il a été suggéré que le VDR est, comme le récepteur des pregnanes (PXR), un médiateur de l'ALC ciblant les CYP3A. L'objectif de cette étude est d'analyser l'influence de la carence en D₃ et de la non-fonctionnalité du VDR sur les niveaux d'ARNm hépatiques codant pour les *CYP3A11*, *CYP2B10*, *CYP27A1* et *PXR*. À cette fin, des souris normales (VDR^{+/+}) ou possédant un VDR non-fonctionnel (VDR^{-/-}), carencées ou non en D₃, ont été traitées avec l'ALC, le PCN (pregnenolone 16 α -carbonitrile) ou la 1,25(OH)₂D₃, puis comparées aux souris non traitées. Chez les VDR^{+/+}, la carence provoque une forte baisse des niveaux d'ARNm codant pour le *CYP2B10* et une inductibilité accrue des *CYP2B10* et *CYP3A11*. La fonctionnalité du VDR a une influence moindre, mais les souris VDR^{-/-} présentent de plus faibles niveaux d'ARNm codant pour le *CYP2B10*. L'ALC n'ayant pas induit le *CYP3A11*, nos travaux ne permettent pas de confirmer le rôle de médiateur du VDR hépatique dans sa détoxification. Nos résultats illustrent l'importance du système de la vitamine D₃, et particulièrement de son statut nutritionnel, dans le processus de détoxification-cytoprotection.

Mots clé : CYP3A11, CYP2B10, CYP27A1, PXR, VDR, carence, foie, ALC, PCN

ABSTRACT

The liver plays a role in vitamin D₃ (D₃) homeostasis and expresses the vitamin D receptor (VDR). The production of 25OHD₃, the precursor of the active form 1,25(OH)₂D₃, requires CYP27A1, which is also implicated in the synthesis of a precursor of the strongly hepatotoxic lithocholic acid (LCA). The liver also participates, via the CYP3A and CYP2B cytochrome P450 families, in the detoxification process of substances like LCA. It has been suggested that VDR is, like the pregnane X receptor (PXR), a sensor of LCA targeting CYP3A. The aim of this study was to analyse the influence of vitamin D deficiency and assess the contribution of VDR on hepatic mRNA levels coding for *CYP3A11*, *CYP2B10*, *CYP27A1* and *PXR*. For this purpose, normal (VDR^{+/+}) or VDR null (VDR^{-/-}) mice were fed a regular or D₃ deficient diet and were treated with LCA, PCN (pregnenolone 16 α -carbonitrile) or 1,25(OH)₂D₃ and compared to untreated mice. Vitamin D deficiency caused a strong reduction in the basal levels of *CYP2B10* mRNA in wild-type mice and increased the induction of *CYP2B10* and *CYP3A11* mRNA following treatments. Loss of VDR had a less dramatic effect on gene expression, although VDR^{-/-} mice displayed reduced expression of the gene coding for *CYP2B10*. LCA did not induce the gene coding for CYP3A11. Thus our work cannot confirm the sensor role of hepatic VDR in its detoxification. Our results provide a better understanding into the importance of the vitamin D₃ system and its nutritional status in the detoxification-cytoprotection process.

Key words: CYP3A11, CYP2B10, CYP27A1, PXR, VDR, deficiency, liver, LCA, PCN

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|----------|
| RÉSUMÉ..... | iii |
| ABSTRACT | iv |
| TABLE DES MATIÈRES..... | v |
| LISTE DES TABLEAUX | viii |
| LISTE DES FIGURES | ix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xi |
| REMERCIEMENTS..... | xiii |
| | |
| CHAPITRE I INTRODUCTION | 1 |
| 1. Rôle et organisation cellulaire du foie..... | 2 |
| 2. La vitamine D | 3 |
| 2.1 Généralités | 3 |
| 2.2 Rôles de la vitamine D..... | 3 |
| 2.3 Synthèse de la vitamine D..... | 4 |
| 2.3.1 La 25-hydroxylation | 4 |
| 2.3.2 La 1 α -hydroxylation..... | 5 |
| 2.4 La 24-hydroxylation | 7 |
| 2.5 La carence en vitamine D | 7 |
| 3. Le récepteur de la vitamine D..... | 8 |
| 3.1 Généralités | 8 |
| 3.2 Localisation..... | 8 |
| 3.3 Structure..... | 9 |
| 3.4 Signalisation par le VDR | 11 |
| 3.5 Mutations délétères du VDR | 13 |
| 4. Détoxification des acides biliaires | 13 |
| 4.1 Généralités | 13 |
| 4.2 Les acides biliaires..... | 13 |
| 4.3 Synthèse des acides biliaires..... | 14 |
| 4.4 Toxicité des acides biliaires secondaires | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5 Régulation des acides biliaires | 15 |
| 4.5.1 Rôle du PXR..... | 15 |
| 4.5.2 Autres récepteurs..... | 15 |
| 4.6 Le VDR comme médiateur des acides biliaires toxiques..... | 16 |
| 5. Les cytochromes P450..... | 16 |
| 5.1 Généralités..... | 16 |
| 5.2 Le CYP3A11 | 17 |
| 5.3 Le CYP2B10 | 18 |
| 5.4 Induction des cytochromes P450 par le pregnenolone 16 α -carbonitrile | 19 |
| 6. Hypothèse et objectifs | 19 |
| 6.1 Hypothèse de recherche..... | 19 |
| 6.2 Objectifs | 20 |
| CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 21 |
| 7. Modèles animaux utilisés et traitements | 22 |
| 7.1 Présentation générale..... | 22 |
| 7.2 Inactivation fonctionnelle du VDR | 22 |
| 7.3 Description des diètes | 22 |
| 7.3.1 Diète normale | 22 |
| 7.3.1 Diète carencée en vitamine D..... | 23 |
| 7.4 Conditions générales de traitement | 23 |
| 7.5 Traitements..... | 24 |
| 8. Méthode : Analyse de l'expression génique..... | 28 |
| 8.1 Matériel | 28 |
| 8.2 Analyse de l'expression génique..... | 28 |
| 8.2.1 Extraction des ARN..... | 28 |
| 8.2.2 Électrophorèse et transfert de Northern..... | 28 |
| 8.2.3 Synthèse des sondes | 29 |
| 8.2.4 Hybridation avec les sondes | 29 |
| 9. Analyses statistiques..... | 32 |

| | |
|--|----|
| CHAPITRE III RÉSULTATS | 32 |
| 10. Concentrations sériques de calcium et des métabolites de la vitamine D | 34 |
| 11. Les niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre | 34 |
| 11.1 CYP3A11 | 35 |
| 11.2 CYP2B10..... | 39 |
| 11.3 CYP27A1 | 43 |
| 11.4 PXR | 44 |
| | |
| CHAPITRE IV DISCUSSION ET CONCLUSION | 51 |
| 12. Discussion | 52 |
| 13. Conclusion..... | 59 |
| | |
| CHAPITRE V RÉFÉRENCES | 61 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau I | |
| Description des séquences d'amorces..... | 30 |
| Tableau II | |
| Description des cycles de PCR des gènes amplifiés et taille des fragments obtenus..... | 31 |
| Tableau III | |
| Concentrations sériques de calcium ionisé, de 25(OH)D ₃ et de 1,25(OH) ₂ D ₃ | 34 |
| Tableau IV | |
| Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le <i>CYP3A11</i> | 38 |
| Tableau V | |
| Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le <i>CYP2B10</i> | 42 |
| Tableau VI | |
| Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le <i>CYP27A1</i> | 46 |
| Tableau VII | |
| Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le <i>PXR</i> | 48 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 | |
| Fonctions métaboliques et homéostatiques du système endocrinien de la vitamine D.... | 6 |
| Figure 2 | |
| Localisation du VDR dans le foie chez le rat..... | 10 |
| Figure 3 | |
| Modèle schématique de l'action de la 1,25(OH) ₂ D ₃ contrôlée par son récepteur nucléaire, le VDR (récepteur à la vitamine D)..... | 12 |
| Figure 4 | |
| Description des modèles animaux..... | 26 |
| Figure 5 | |
| Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le <i>CYP3A11</i> à l'état basal et après exposition aux différents traitements (1,25(OH) ₂ D ₃ , ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète | 37 |
| Figure 6 | |
| Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le <i>CYP2B10</i> à l'état basal et après exposition aux différents traitements (1,25(OH) ₂ D ₃ , ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète | 42 |
| Figure 7 | |
| Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le <i>CYP27A1</i> à l'état basal et après exposition aux différents traitements (1,25(OH) ₂ D ₃ , ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète | 46 |

Figure 8

Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le *PXR* à l'état basal et après exposition aux différents traitements (1,25(OH)₂D₃, ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète 50

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---|---|
| 1,25(OH) ₂ D ₃ | 1,25-dihydroxyvitamine D ₃ |
| 1,24,25(OH) ₂ D ₃ | 1,24,25-dihydroxyvitamine D ₃ |
| 24,25(OH) ₃ D ₃ | 24,25-dihydroxyvitamine D ₃ |
| 25OHD ₃ | 25-hydroxyvitamine D ₃ |
| ABCC3 | <i>ATP-binding cassette</i> sous-famille C |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ALC | Acide lithocholique |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| BACS | <i>bile acid-CoA synthetase</i> |
| BAR | Récepteur aux acides biliaires |
| BAT | <i>bile acid-CoA:aminoacid N-acetyltransferase</i> |
| BSEP | Pompe exportatrice de sels biliaires |
| CAR | Récepteur aux androstanes |
| CCPA | Conseil Canadien de Protection des Animaux |
| CHUM | Centre hospitalier de l'Université de Montréal |
| CIPA | Comite Institutionnel de Protection des Animaux |
| CYP | Cytochrome P450 |
| D ₂ | Vitamine D ₂ |
| D ₃ | Vitamine D ₃ |
| dCTP | 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate |
| FXR | Récepteur des acides biliaires (farnesoid X receptor) |
| GR | Récepteur aux glucocorticoïdes |
| Kb | Kilobases |
| K _D | Constante de dissociation |
| KDa | Kilodaltons |
| Mrp3 | <i>Multidrug resistance protein 3</i> |
| PAPSS2 | 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 |

| | |
|-------|--|
| PBREM | Élément de réponse au phénobarbital |
| PCN | Pregnenolone 16 α -carbonitrile |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PTH | Hormone parathyroïdienne ou parathormone |
| PXR | Récepteur aux pregnanes (pregnane X receptor) |
| RIA | <i>Radio Immuno Assay</i> |
| RXR | Récepteur aux rétinoïdes (retinoid X receptor) |
| SULT | Sulfotransférase cytosolique |
| VDR | Récepteur à la vitamine D |
| VDRE | Élément de réponse à la vitamine D |
| XREM | Élément de réponse aux xénobiotiques |

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu le Docteur Marielle Gascon-Barré de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir ainsi donné l'occasion d'y vivre une expérience à la fois très formatrice et enrichissante.

Je remercie tout particulièrement Christian Demers pour ses précieux conseils, sa patience et son soutien technique dans tous les aspects de ce projet.

Je souhaite également remercier Jean-Luc Petit pour son aide très appréciée lors de la manipulation des animaux.

Finalement, je remercie l'ensemble de mes collègues pour leur accueil, leur entrain et leur bonne humeur, qui ont fait de ce laboratoire un endroit des plus agréable où travailler.

I.- INTRODUCTION

1. ROLE ET ORGANISATION CELLULAIRE DU FOIE

Une des fonctions importantes du foie consiste à stocker et transformer les substrats endogènes et exogènes lui arrivant via la veine porte et à retourner leurs métabolites dans le sang et la bile par la veine cave. Le foie est également impliqué dans la biotransformation des xénobiotiques, des médicaments et des métabolites endogènes (1). Il joue un rôle primordial dans l'homéostasie du système endocrinien de la vitamine D₃ (D₃) (2), participant à l'extraction, la biotransformation, la conjugaison et l'excrétion biliaire de tous les dérivés de la D₃, y compris la forme active du système endocrinien de la vitamine, la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃) (3-9).

Le foie est un organe hétérogène composé de deux classes cellulaires majeures: les cellules parenchymateuses et non-parenchymateuses. Les cellules parenchymateuses comprennent les hépatocytes, qui sont de loin les plus nombreux dans le foie, constituant 78% du volume hépatique total (10). Unités fonctionnelles du foie, les hépatocytes remplissent un grand nombre de fonctions, incluant l'emmagasinage des hydrates de carbone, des protéines et des vitamines. Ils synthétisent également plusieurs composés comme le glucose, les acides gras et le cholestérol et jouent un rôle primordial dans la détoxification et le métabolisme des substances endogènes et exogènes (11). De plus, ils permettent la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, lesquels sont sécrétés dans la bile (12). La bile est un véhicule essentiel pour la sécrétion de nombreuses substances comme les lipides, les vitamines, de même que les médicaments et leurs métabolites (13). Les cellules non-parenchymateuses, occupant 6,3% du volume hépatique, sont de trois types: les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer et les cellules de Ito, également appelées cellules stellaires (10). Les cellules endothéliales forment une barrière semi-perméable entre le sang et la surface des hépatocytes, permettant ainsi la régulation de l'entrée des lipides dans le foie (14). Les cellules de Kupffer, qui ont quant à elles une forte capacité de phagocytose des particules étrangères, participent à l'élimination d'endotoxines et d'autres substances nocives. Elles modulent la réponse immunitaire par la libération de médiateurs et d'agents cytotoxiques (14, 15). Les cellules d'Ito, des cellules périsinusoïdales riches en graisses, emmagasinent quant à elles la vitamine A (15).

2. LA VITAMINE D

2.1. Généralités

La vitamine D englobe un groupe de composés sécostéroïdiens possédant une activité antirachitique. On distingue la vitamine D₂ et la vitamine D₃: la vitamine D₂, ou ergocalciférol, est la forme retrouvée dans les plantes, tandis que la vitamine D₃, ou cholecalciférol, est synthétisée par les vertébrés. Le système de la vitamine D₃ est considéré comme un système hormonal stéroïdien plutôt qu'un système vitaminique, car la vitamine D₃ est synthétisée, chez les mammifères, à partir du 7-déhydrocholestérol de la peau, le précurseur du cholestérol. Elle est ensuite hydroxylée dans le foie et le rein, où elle acquiert tout son potentiel hormonal. (16).

2.2. Rôles de la vitamine D

La vitamine D joue un rôle majeur dans l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Elle favorise également leur réabsorption du filtrat glomérulaire au niveau du rein (17). Elle est impliquée, de concert avec la parathormone (PTH), dans la mobilisation du calcium des os (18, 19). Elle joue également un rôle dans l'utilisation du calcium, la résorption ostéoclastique des os, la différenciation des promyélocytes, la suppression de la croissance cellulaire de la glande parathyroïde et dans la régulation de l'expression du gène de la PTH (16, 20, 21, 22). De plus, la 1,25(OH)₂D₃ a des propriétés anticancéreuses: elle possède une activité antiproliférative, pro-différentiatrice, pro-apoptotique et elle peut arrêter la croissance cellulaire via le blocage du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ (23, 24, 25-30). La 1,25(OH)₂D₃, par sa capacité d'induire l'expression de plusieurs gènes ayant des propriétés immunomodulatoires, empêche le développement de maladies auto-immunes et agit de façon synergique avec des agents anti-rejets des greffons (31).

2.3. Synthèse de la vitamine D

La vitamine D peut provenir de deux sources: l'alimentation (D_2 et D_3) et la synthèse endogène (D_3) grâce à l'action des rayons ultra-violet du soleil sur la peau. Les sources alimentaires de vitamine D étant relativement limitées (poissons, abats, œufs), les besoins en vitamine D sont généralement comblés par l'exposition solaire ou par la consommation d'aliments supplémentés en vitamine D, tel le lait (32).

La vitamine D_3 est dérivée, chez les mammifères, du 7-déhydrocholestérol, le précurseur du cholestérol, présent dans la peau. Les rayons ultraviolets provoquent le clivage du 7-déhydrocholestérol (33), formant la prévitamine D_3 , qui deviendra la vitamine D_3 après isomérisation thermique (34). Cependant, la vitamine D_3 est dépourvue d'activité biologique avant son activation. Elle doit subir deux réactions métaboliques successives afin d'acquérir tout son potentiel biologique hormonal. Ces réactions et les enzymes impliquées sont décrites dans les sections suivantes et sont illustrées à la figure 1.

2.3.1. La 25-hydroxylation

La première étape de l'activation transforme la vitamine D_3 en 25-hydroxyvitamine D_3 ($25OHD_3$). Elle a lieu suite à la capture de la D_3 par le foie, séquestration dont sont capables les hépatocytes et les cellules non-parenchymateuses (35, 36). Il s'agit d'une hydroxylation en position C-25, provoquée par l'action de la 25-hydroxylase mitochondriale, ou CYP27A1, membre de la superfamille des cytochromes P450 (37). La production hépatique de la $25OHD_3$ est peu régulée et dépend principalement de la concentration du substrat. La mesure de la $25OHD_3$ sérique reflète l'état nutritionnel en vitamine D lorsque la fonction hépatique et le cycle entérohépatique sont normaux (38).

Le CYP27A1 est surtout impliqué dans la synthèse des acides biliaires et possède, secondairement, une activité D_3 -25-hydroxylase (39). Il se retrouve dans les mitochondries des hépatocytes. Des ARN messagers du gène de cette enzyme ont été également trouvés dans les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules de Kupffer et les cellules de Ito du foie (35). Le CYP27A1 est également retrouvé dans d'autres tissus,

dont l'intestin, les reins, les poumons (35). Le gène du *CYP27A1* est régulé par plusieurs hormones (ex: l'insuline), des produits endogènes (ex: les acides biliaires), les facteurs nucléaires des hépatocytes et les xénobiotiques (40, 41, 42). L'équipe du docteur Gascon-Barré a déjà montré que les niveaux d'ARNm du *CYP27A1* hépatique chez le rat sont indépendants du statut nutritionnel en vitamine D₃, mais qu'ils sont régulés par la 1,25(OH)₂D₃ (figure 1) (35).

D'autres enzymes peuvent également hydroxyler la vitamine D₃ en position C-25. Chez le porc, l'enzyme microsomale CYP2D25 est à la fois capable d'hydroxyler la vitamine en C-25 et en C-1 α . Cependant, son homologue chez l'humain, le CYP2D6, n'a aucune activité 25-hydroxylase (43). Chez la souris et l'humain, le cytochrome microsomal CYP2R1, enzyme bien conservée au cours de l'évolution et présentant 89% d'homologie de séquence entre les deux espèces, semble également pouvoir hydroxyler la vitamine en position C-25 (44, 45). Il se retrouve en grande quantité dans le foie et les testicules (46). L'enzyme CYP2C11 chez le rat (ou CYP2C9 chez l'humain), ayant elle aussi une activité D₃-25-hydroxylase, est spécifique aux mâles chez le rat et le lapin, mais non chez l'humain (47).

2.3.2. La 1 α -hydroxylation

La seconde étape d'activation, effectuée par la 25OHD₃-1 α -hydroxylase ou CYP27B1, un cytochrome P450, transforme la 25OHD₃ en 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25(OH)₂D₃), la forme active du système endocrinien de la vitamine D. Le rein, dont la membrane interne des mitochondries renferme l'enzyme, est le site majeur de production de celle-ci (48). Les deux importants régulateurs de la 1 α -hydroxylase sont la PTH, qui en stimule la production rénale, et la 1,25(OH)₂D₃, qui a une action répressive (49). D'autres substances peuvent, cependant, influencer le métabolisme de la 25OHD₃: la calcitonine, la concentration de phosphore sérique et, possiblement, certaines hormones stéroïdiennes dont les glucocorticoïdes (50,51).

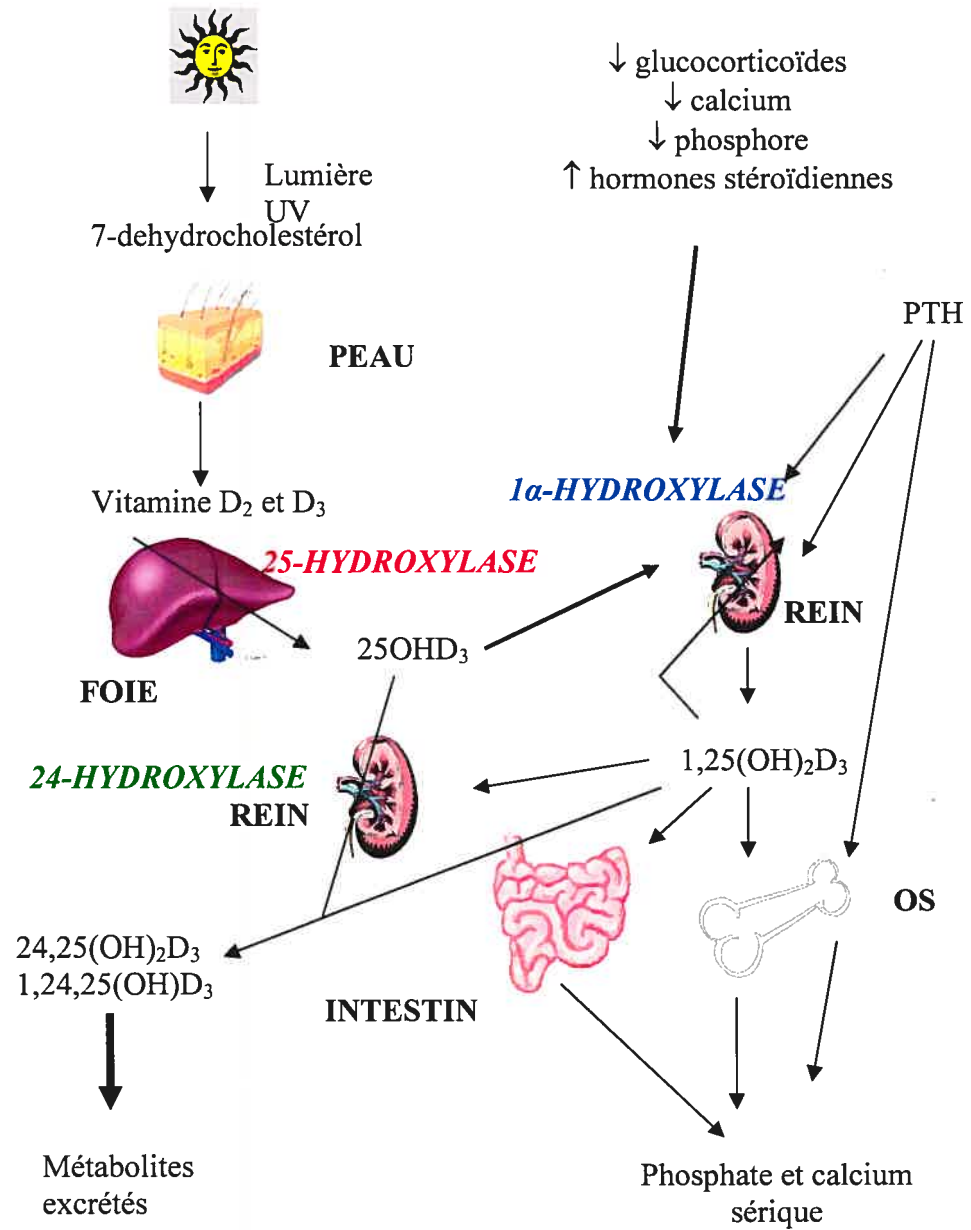


Figure 1. Fonctions métaboliques et homéostatiques du système endocrinien de la vitamine D. *Légende*: ↑ sur-régulation, ↓ sous-régulation. (Tiré de (avec modifications): Sutton A.L., MacDonald P.N. Vitamin D: More Than a "Bone-a-Fide" Hormone. *Mol. Endocrinol.* 17(5) : 777-91, 2003)

2.4. La 24-hydroxylation

La 24-hydroxylase, ou CYP24A1, est exprimée dans presque toutes les cellules, quoiqu'il semble que le site majeur de la 24-hydroxylation soit le rein (52). Cette enzyme participe à la régulation des concentrations ambiantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la dégradant par des réactions d'oxydation des chaînes latérales (53). Il est possible que l'hydroxylation de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en C-24 la rende inactive, mais le concept de l'inactivité de la $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ reste encore controversé. D'autre part, le CYP24A1 peut hydroxyler la 25OHD_3 pour former la 24,25-dihydroxyvitamine D_3 ($24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), généralement considérée sous son angle catabolique, jouant un rôle clé dans l'homéostasie de la vitamine D. Par ailleurs, des indices portent à croire que la $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pourrait avoir des actions biologiques, incluant la stimulation de la minéralisation osseuse, la suppression de la sécrétion de PTH et le maintien du développement embryonnaire (54 à 57). La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ active le CYP24A1, tandis que la PTH bloque son expression (53).

2.5. La carence en vitamine D

La présente étude vise notamment l'observation des possibles dérèglements de la capacité de biotransformation par le foie chez un modèle animal carencé en vitamine D. La carence en vitamine D est causée par un apport alimentaire insuffisant ou par un manque d'exposition au soleil (58). Cependant, outre un apport extérieur insuffisant, la carence en vitamine D peut parfois résulter d'une malabsorption, de certaines pathologies ou d'une altération du métabolisme de la vitamine (59).

La carence en vitamine D se traduit par des concentrations anormalement basses de 25-hydroxyvitamine D (25OHD) circulante (60). Elle se caractérise par une hypocalcémie et/ou le rachitisme chez l'enfant et l'ostéomalacie chez l'adulte. La rareté des sources alimentaires de vitamine D fait de l'exposition solaire le meilleur moyen de prévenir la carence (61). Ainsi, la fréquence des cas de carence en vitamine D est principalement influencée par la latitude, la saison, la pigmentation de la peau et les facteurs culturels ayant un impact sur le degré d'exposition solaire, tel l'habillement (62, 63). La

prévalence de la carence est plus élevée dans les tranches plus âgées de la population, car l'épaisseur et l'élasticité de la peau diminuent avec l'âge, abaissant ainsi la capacité de synthèse cutanée de vitamine D (64). De plus, l'absorption intestinale et l'hydroxylation dans le foie de la vitamine D s'amenuisent au cours du vieillissement (65, 66). La forte consommation de médicaments est également un facteur de risque important (67).

3. LE RÉCEPTEUR DE LA VITAMINE D

3.1. Généralités

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ agit en se liant avec haute affinité ($K_D = 10^{-10}$) au récepteur spécifique à la vitamine D (VDR) (68). Ce récepteur, d'une taille de 50 kDa et contenant 427 acides aminés, est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens qui régule l'expression de gènes cibles en réponse à la liaison de l'hormone (69). Le gène codant pour le VDR est situé sur le chromosome 12 chez l'humain. Hautement conservé d'une espèce à l'autre, il présente, entre la souris et l'humain, une homologie de séquence de 89% dans le domaine de liaison au ligand et de 100% dans le domaine de liaison à l'ADN. (69).

3.2. Localisation

Le VDR est présent en quantité variable dans de nombreux tissus, notamment dans les cellules du tubule rénal distal, les entérocytes de l'intestin grêle, les cellules de la paroi osseuse et les ostéoblastes. C'est dans ces types cellulaires que la vitamine D joue son rôle dans le métabolisme du calcium. Le VDR est également retrouvé dans la glande parathyroïde, les cellules des îlots du pancréas, les cellules de la moelle osseuse (promyélocytes), les lymphocytes et certaines cellules neuronales (70).

Le foie a longtemps été reconnu comme un organe n'exprimant pas le VDR. Cependant, on sait aujourd'hui que plusieurs de ses types cellulaires, les cellules sinusoïdales,

biliaires, épithéliales et faiblement les hépatocytes, expriment le VDR, tel qu'illustré à la figure 2 (71). La présence du VDR dans le foie permet à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de réguler son propre métabolisme via l'inhibition de la 25-hydroxylase (72, 73). De plus, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ semble contribuer au processus de régénération hépatique via son contrôle de l'activité de l'ADN polymérase α de même que certaines protéines kinases impliquées (74-77).

3.3. Structure

Le gène du VDR comprend deux sites initiateurs potentiels de la région codante, l'un situé 3 codons en amont de l'autre. Il existe un important polymorphisme chez l'humain, consistant au changement d'une paire de base (ATG à ACG) sur le premier des deux sites, produisant un VDR légèrement plus court (424 acides aminés) (78, 79). Cette forme se retrouve dans des proportions de 37% et 48% de la population pour les formes homozygote et hétérozygote respectivement. Les implications de cette différence sur les propriétés biochimiques ou la fonction du récepteur demeurent cependant méconnues (78, 79).

Le VDR est composé de cinq principales régions. À l'extrémité N-terminale se trouve un domaine de transactivation (A/B), une séquence non-conservée. Juxtaposé à celui-ci, on retrouve le domaine de liaison à l'ADN (C), région très conservée. Celui-ci consiste en deux modules constitués de doigts de zinc où les atomes de zinc sont coordonnés par quatre résidus cystéine (80). Chacun de ces modules a une fonction différente: le module amino-terminal lie l'ADN dans le sillon majeur du site de liaison à l'ADN tandis que le module carboxy-terminal constitue l'interface de dimérisation avec les partenaires protéiques (80). Plus loin, à l'extrémité C-terminale, se trouve le domaine de liaison au ligand, une région modérément conservée remplissant diverses fonctions: dimérisation, liaison au ligand, transactivation et répression (80). Ce domaine exerce une régulation absolue du domaine de liaison à l'ADN. Certaines des hélices α du domaine de liaison au ligand offrent une surface de liaison au RXR, le récepteur aux

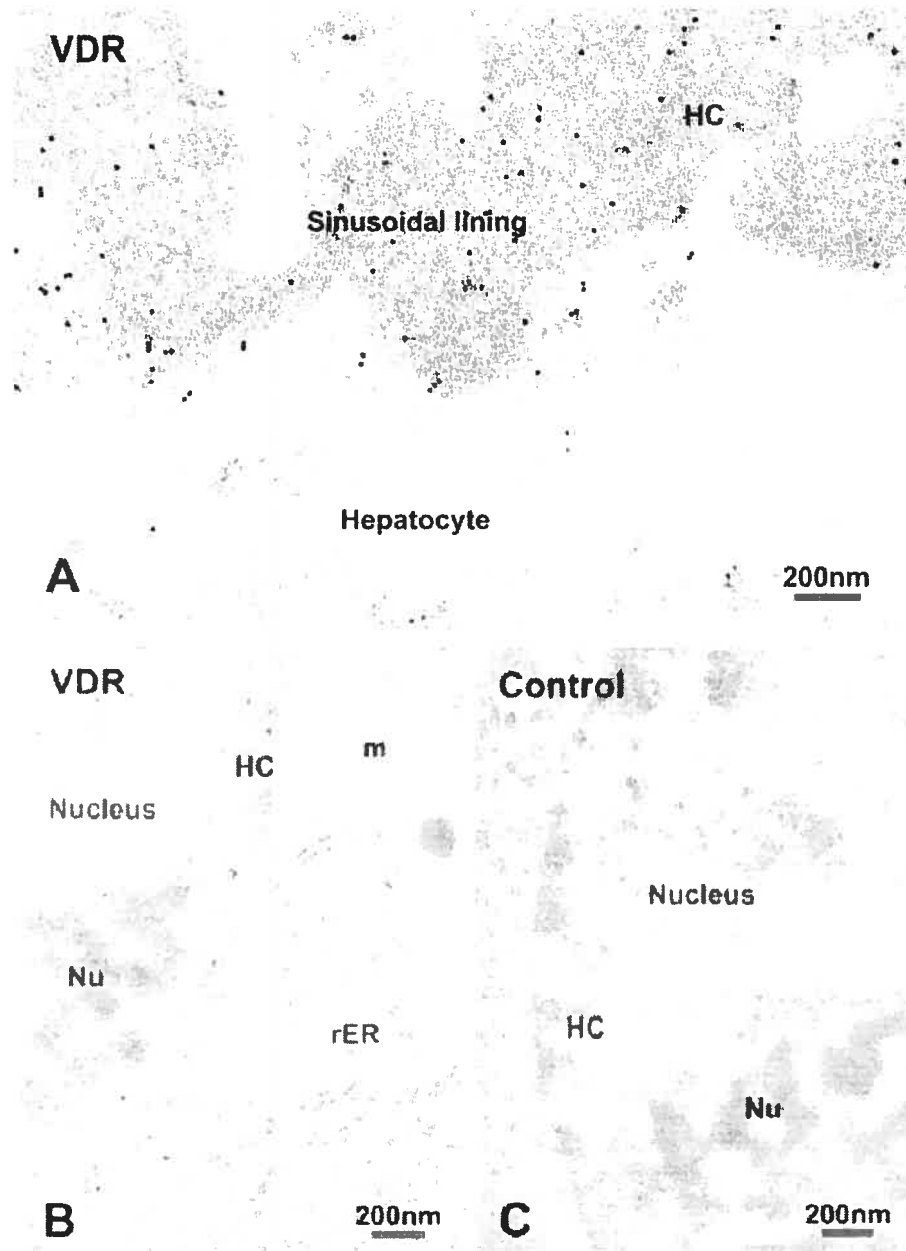


Figure 2: Localisation du VDR dans le foie chez le rat. L'hétérochromatine (HC) des cellules sinusoidales (A) est uniformément et plus intensément marquée avec un anticorps anti-VDR que l'hépatocyte (A et B), suggérant une expression plus forte dans les cellules sinusoidales. En C), les incubations contrôles avec un IgG et la protéine A/ «gold» montrent très peu ou aucune particule d'or dans l'hétérochromatine de l'hépatocyte, confirmant la nature spécifique de la liaison. Reproduit de Gascon-Barré et coll., *Hepatology*, 2003, volume 37, No. 5, p.1039-1040 (71) avec la permission de l'American Association for the study of Liver diseases.

rétinoïdes, partenaire du VDR intervenant lors de la liaison à l'ADN. D'autres servent de site d'amarrage aux comodulateurs transcriptionnels (coactivateurs p160 SRC-1, SRC-2 et SRC-3, DRIP205) permettant la liaison de plus gros complexes coactivateurs (p160 histone acétyltransférase et complexe D-médiateur) (81, 82). Finalement, une région charnière comprend les acides aminés siégeant entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine contenant le site de liaison au ligand. Cette région, malgré qu'elle soit peu conservée, est essentielle à une liaison intacte de l'hormone (83).

3.4. Signalisation par le VDR

L'hormone $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ doit préalablement se dissocier des protéines transporteuses (vitamin D binding protein (DBP) ou autres telle l'albumine) qui la lient dans le sérum pour entrer dans la cellule. Elle interagit ensuite avec le VDR : les étapes principales impliquées dans le contrôle de l'expression génique médiée par le VDR sont représentées à la figure 3. L'activation du VDR passe par un changement conformationnel du domaine de liaison au ligand dépendant de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, créant un domaine fonctionnel AF-2. Cela permet le recrutement de complexes de coactivateurs comme SRC/CBP/p300 histone acétyltransférase ou le complexe médiateur DRIP205, qui facilitent les changements de structure de la chromatine et l'entrée de l'ARN polymérase II. La fonctionnalité du récepteur requiert cependant son hétérodimérisation avec l'une des trois formes du RXR. Certaines études suggèrent également l'existence d'homodimères du VDR ou sa capacité à former des hétérodimères avec d'autres récepteurs, tels les récepteurs à l'acide rétinoïque et à l'hormone thyroïdienne, mais la question est controversée (84). L'activation de la transcription a lieu sur un élément de réponse à la vitamine D (VDRE), souvent constitué d'un hexanucléotide répété avec, au milieu, une séquence de trois (DR3) ou six nucléotides (ER6) (85). Les VDREs sont retrouvés sur plusieurs gènes, dont la 24-hydroxylase (*CYP24*), l'ostéocalcine et l'ostéopontine (80).

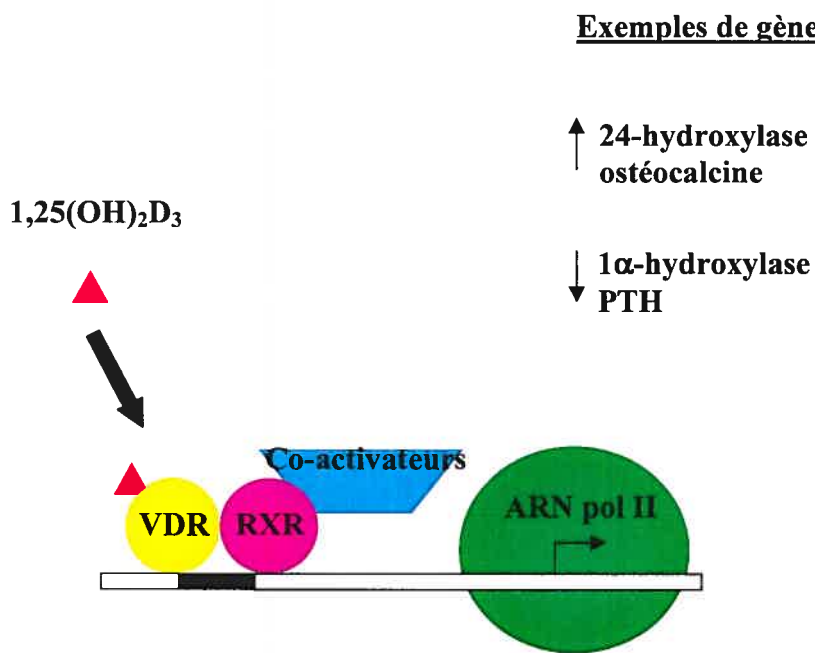


Figure 3. Modèle schématique de l'action de la 1,25(OH)₂D₃ contrôlée par son récepteur nucléaire, le VDR (récepteur à la vitamine D). Une liste de gènes connus cibles de la 1,25(OH)₂D₃ peuvent être sur-régulés (↑) ou sous-régulés (↓) au niveau transcriptionnel. (Tiré de : Brown AJ et coll. *Am. J. Physiol.* **277**(86) : F157-F175, 1999 ; Akutsu N. et coll. *Mol Endocrinol.* **15**(7): 1127-39, 2001).

3.5. Mutations délétères du VDR

Malloy et coll. (87, 88) ont identifié chez l'homme des mutations délétères du VDR causant le rachitisme hypocalcémique résistant à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, une maladie monogénique autosomale récessive rare caractérisée par une résistance partielle ou complète à l'hormone (87,88). Chez la souris, la création d'animaux transgéniques pour le VDR ($\text{VDR}^{-/}$) a permis de constater que l'inactivation du VDR provoque chez elles des symptômes similaires au rachitisme hypocalcémique résistant à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ chez l'humain. Ces animaux manifestent des symptômes caractéristiques dont les principaux sont un faible poids, une hypocalcémie et une hypophosphatémie, une hyperparathyroïdie, une absorption intestinale du calcium fortement altérée et un niveau élevé de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (89,90, 91).

4. DÉTOXICATION DES ACIDES BILIAIRES

4.1. Généralités

L'acide lithocholique (ALC), un acide biliaire toxique et cancérigène, est associé au cancer du colon. Il en est de même pour les diètes riches en matières grasses, ces dernières stimulant la sécrétion biliaires et étant par conséquent associées à de hauts niveaux d'ALC (92). À l'inverse, il existe une corrélation négative entre la vitamine D et le cancer du colon, suggérant le rôle protecteur de la vitamine D.

Makishima et coll. (68) ont démontré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ n'est pas le seul ligand du VDR. En effet, l'ALC et son dérivé, l'acide 3-ketolithocholique, peuvent également le lier, suggérant une possible implication de ce récepteur dans la protection contre l'effet cancérigène de l'ALC.

4.2. Les acides biliaires

Les acides biliaires, synthétisés par le foie, sont sécrétés dans l'intestin grêle où ils remplissent diverses fonctions, comme la solubilisation et l'absorption des lipides, du

cholestérol et des vitamines liposolubles (93, 94). Environ 95% des acides biliaires sont récupérés par le foie via la circulation entérohépatique, puis sont réexcrétés. Les 5% perdus sont remplacés par la conversion de cholestérol en acides biliaires (95). Ce processus constitue un moyen important permettant à l'organisme d'excréter l'excès de cholestérol (96, 97).

4.3. Synthèse des acides biliaires

La formation des acides biliaires primaires a lieu dans le foie, où le cholestérol est hydroxylé par la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) (93, 94). Une voie secondaire (ou voie "acide"), est également responsable de la formation des acides biliaires. Elle utilise la CYP27A1 et donne lieu à la transformation des acides biliaires primaires, l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique (98, 99). Avant d'être relâchés dans l'intestin, ces derniers sont conjugués aux acides aminés (taurine ou glycine). Une fois dans le colon, les bactéries présentes déconjuguent et déshydroxylent en position 7 α l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique pour former des acides biliaires secondaires moins polaires et plus toxiques, l'acide déoxycholique et ALC respectivement (93, 94).

4.4. Toxicité des acides biliaires secondaires

Étant plus hydrophobes que les acides biliaires primaires, les dérivés secondaires se concentrent plus aisément à l'intérieur des cellules, où leurs propriétés, qui sont similaires à celles des détergents, menacent ainsi l'intégrité cellulaire. Les acides biliaires secondaires sont des carcinogènes potentiels, car tout porte à croire qu'ils peuvent endommager l'ADN par des réactions d'addition, des bris de brins ou l'inhibition des enzymes réparatrices (100). Les hauts niveaux d'ALC sont associés au développement de la cholestase, une pathologie diminuant ou entravant la sécrétion de la bile. Les travaux de Yu et coll. (101) suggèrent que l'implication de l'ALC dans le blocage du cholédoque résulterait d'une forte répression, via le récepteur des acides biliaires FXR (*farnesoid X receptor*, aussi connu sous le nom de *bile acid receptor*,

BAR), de l'expression de la pompe exportatrice de sels biliaires BSEP. Cela résulterait en une diminution de l'excrétion des acides biliaires, lesquels se concentreraient dans le foie et causeraient une obstruction du canal et des dommages au foie (101). La corrélation entre l'apparition de la cholestase et la présence de taux élevés d'ALC dans le foie et le sérum a d'ailleurs déjà été observée. (102).

4.5. Régulation des acides biliaires

4.5.1 Rôle du PXR

Plusieurs récepteurs nucléaires interviennent dans la régulation des acides biliaires, notamment le récepteur aux pregnanes (*pregnane X receptor*, PXR). Ce récepteur protège l'organisme contre l'accumulation de xénobiotiques et d'endobiotiques (103). Fortement exprimé dans le foie, il est également modérément présent dans l'intestin (104). Il peut se lier à une grande variété de composés, incluant de nombreux médicaments et produits naturels, de même que les stéroïdes (105). Le PXR empêche l'accumulation de ces produits en activant l'expression génique des enzymes capables de les métaboliser : les sulfotransférases et les cytochromes P450, en particulier la sous-famille des CYP3A (103, 105). La sulfation ou l'hydroxylation des acides biliaires secondaires facilite leur détoxification et leur élimination de l'organisme (103). Staudinger et coll (103). ont mis en évidence le rôle du PXR comme médiateur de l'ALC dans le foie, protégeant ainsi contre l'hépatotoxicité de celui-ci.

4.5.2 Autres récepteurs

En réponse aux acides biliaires, à l'exception de l'ALC, le FXR induit l'expression de la BSEP (106). Il transactive également plusieurs gènes codant pour des enzymes modifiant les acides biliaires, tels UGT2B4, BACS (*bile acid-CoA synthetase*) et BAT (*bile acid-CoA:aminoacid N-acetyltransferase*) (107, 108). Le CAR exerce quant à lui un rôle protecteur contre l'ALC en induisant fortement le gène de la sulfotransférase

cytosolique *SULT* et de l'enzyme *PAPSS2*, qui sont impliquées dans la sulfation de la phase II de détoxification des acides biliaires (109).

4.6. Le VDR comme médiateur des acides biliaires toxiques

Plusieurs équipes ont démontré que la vitamine D pouvait inhiber la croissance cellulaire et induire la différenciation et l'apoptose dans les cellules malignes (25-30). Cependant, les mécanismes responsables de cet effet protecteur sont inconnus. Des études ont montré que, chez des souris dont le gène du *PXR* a été inactivé, il y avait induction de l'expression des *CYP3A* par l'ALC (110). C'est dans cette voie indépendante du *PXR* que pourrait intervenir le *VDR*. Des publications précédentes ont en effet suggéré que les *CYP3A* étaient des gènes cibles du *VDR* (111, 112). Plusieurs gènes codant pour ces cytochromes chez l'humain possèdent des VDREs. De plus, une très grande similarité a été observée dans les séquences d'acides aminés du *PXR* et du *VDR*, particulièrement dans les domaines de liaison à l'ADN et du ligand (113, 114). Makishima et coll (68) ont, en effet, montré que non seulement le *VDR* était activé par l'ALC et ses métabolites, mais qu'il était aussi plus sensible que le *PXR*.

5. LES CYTOCHROMES P450

5.1. Généralités

Les cytochromes P450 appartiennent à une superfamille d'enzymes formées d'un noyau hème. Ils sont principalement exprimés dans le foie (115,116). Ils sont impliqués dans la biotransformation oxydative de composés lipophiles, comme les acides gras, les stéroïdes, les rétinoïdes et les acides biliaires, de même que certains xénobiotiques, comme les médicaments ou les polluants environnementaux, donnant ainsi lieu à l'activation ou à l'inactivation de ces composés (115,116). Ceux-ci sont convertis en composés plus hydrophiles, facilitant la conjugaison et l'excrétion. Ce rôle majeur dans la détoxification fait des cytochromes P450 un élément clé de la cytoprotection, c'est-à-dire de la défense de la cellule contre les composés nocifs endogènes ou exogènes. Outre

le métabolisme des médicaments, les cytochromes P450 jouent également un rôle dans la biosynthèse du cholestérol et des acides biliaires, le métabolisme de la vitamine D et le catabolisme des stéroïdes (115).

5.2. Le CYP3A11

La sous-famille des CYP3A représente les cytochromes P450 les plus abondants dans le foie humain adulte. Ils comptent pour environ 30% du contenu total des cytochromes P450 hépatiques. Les CYP3A sont également présents en plus faibles quantités dans le cerveau, l'intestin, les reins, les poumons et les leucocytes (117-122). Leur niveau d'expression est cependant très variable et dépend de plusieurs facteurs comme le sexe, certains facteurs génétiques, et l'induction ou la répression par certains agents thérapeutiques ou xénobiotiques (123). Leur expression est régulée par de nombreux produits, notamment le pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN), la dexaméthasone, le clotrimazole et le phénobarbital (122, 124-127).

Le plus important membre de la famille des CYP3A, le CYP3A4 humain ou son homologue chez la souris, le CYP3A11, est un cytochrome P450 bien conservé qui métabolise environ 50% des médicaments (115,128). Il a également de nombreux substrats endogènes, incluant les hormones sexuelles et les acides biliaires. Le gène du CYP3A4, situé sur le chromosome 7, est activé par plusieurs composés, dont le phénobarbital, la dexaméthasone, les glucocorticoïdes synthétiques, de même que par la vitamine D (115, 129, 130). L'induction de la famille des CYP3A implique les récepteurs nucléaires VDR, PXR, RXR α et le récepteur aux androstanes (CAR) (115). Le PXR agit sous forme d'hétérodimère PXR-RXR en liant les éléments de réponse du CYP3A4, notamment DR₃ et ER₆ (131). Similairement, le CAR hétérodimérise également avec le RXR pour lier le ER₆. De plus, bien que le mécanisme d'action reste à élucider, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) semble également jouer un rôle dans l'activation transcriptionnelle du gène du CYP3A4 et ce, possiblement via une action indirecte interférant avec les voies de signalisation du PXR et du CAR (130). Il a été montré antérieurement que le VDR est capable de lier et transactiver différents motifs reconnus par le PXR et le CAR sur les promoteurs des gènes de plusieurs cytochromes

P450, dont le CYP3A4. Ces observations suggèrent que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aurait la capacité d'induire le CYP3A4 via le VDR (132). Une étude a d'ailleurs démontré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pouvait induire le CYP3A4 dans les cellules HepG2 (133).

5.3. Le CYP2B10

On a longtemps cru que le CYP2B6 humain (ou CYP2B10 chez la souris) ne jouait qu'un rôle mineur dans le métabolisme des médicaments. Or, on sait aujourd'hui que cette enzyme hautement polymorphique est responsable de la biotransformation de près de 25% des médicaments, malgré que celle-ci ne constitue que de 2 à 10% du contenu hépatique total en cytochromes P450. Le gène du CYP2B6, situé sur le chromosome 19, est principalement exprimé dans le foie, mais également en faibles quantités dans l'intestin, le rein, les poumons, la peau et le cerveau (134-136). Des différences interindividuelles significatives ont cependant été observées dans son expression (116, 137).

Le CYP2B6 est fortement inductible par un grand nombre de composés structurellement différents comme la rifampicine, la cyclophosphamide, le clotrimazole, la phénytoïne, la carbamazépine et le phénobarbital (138, 139, 140). La régulation de l'induction de l'expression génique des CYP2B se fait principalement au niveau transcriptionnel. L'ensemble des connaissances actuelles suggère que l'induction des CYP2B par ses inducteurs passe par l'activation du CAR ou du PXR. Des études ont montré que le PXR pouvait lier le module activateur du gène du CYP2B6 et que plusieurs ligands connus du PXR pouvaient induire l'expression du CYP2B6 dans l'hépatocyte humain (138,141). En réponse aux composés semblables au phénobarbital, l'activation transcriptionnelle du CYP2B6 est principalement régulée par le CAR (116). Celle-ci se fait via l'élément de réponse au phénobarbital PBREM (phenobarbital-responsive enhancer module), situé approximativement à 2kb en amont du site d'initiation de la transcription du gène du CYP2B (116). Cependant, plus récemment, un nouvel élément de réponse, le XREM (xenobiotic-responsive enhancer module), a été identifié à 8,5kb en amont de la région codante du CYP2B6 (116). Celui-ci peut être activé par le PXR et le CAR et permet d'obtenir, de concert avec le PBREM, une induction optimale du CYP2B6 en réponse

aux inducteurs (116). De plus, certaines études suggèrent l'implication du GR dans la régulation du CYP2B6 par le PXR et le CAR (142, 143, 144). Le GR activé pourrait notamment agir comme un cofacteur facilitant la liaison du PXR et du CAR aux éléments de réponse du CYP2B6 (143). Les mécanismes détaillés de l'implication du GR dans la régulation du CYP2B6 n'ont cependant pas été élucidés.

5.4 Induction des cytochromes P450 par le pregnenolone 16 α -carbonitrile

Le PCN est un dérivé de stéroïde synthétique et un anti-glucocorticoïde (123). C'est un puissant inducteur des cytochromes P450. Sa forte capacité à contrer l'effet de certains produits toxiques en fait l'un des produits chimiques les plus catatoxiques (145). Agissant via le PXR, il induit la famille des CYP3A, produisant un effet protecteur contre les produits détoxiqués par les CYP3A. L'induction est perceptible dans les niveaux d'ARNm et de protéine (118, 127, 146). Il a également été démontré que le PCN augmente le renouvellement du cholestérol, réduit l'activité de la 7 α -hydroxylase et réduit l'excrétion des acides biliaires. (147).

6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

6.1. Hypothèse de recherche

Nos travaux reposent sur l'hypothèse selon laquelle le système de la vitamine D est un élément clé de l'activité de détoxification et de cytoprotection du foie. Nous postulons donc qu'une perturbation du système de la vitamine D, causée par un apport nutritionnel insuffisant en vitamine D ou par l'inactivation du VDR, affectera négativement la capacité de biotransformation du foie en altérant l'expression des gènes codant pour les enzymes CYP3A11 et CYP2B10. Cette altération pourrait résulter en un accroissement de la sensibilité de l'organisme aux effets nocifs de certains endobiotiques, dont l'ALC, qui serait la conséquence directe de la déficience du système de la vitamine D, et non d'une variation de l'expression du gène codant pour un autre récepteur nucléaire impliqué tel le PXR. Nous émettons aussi l'hypothèse qu'une perturbation du système

de la vitamine D aura peu d'influence sur son propre métabolisme, particulièrement sur l'expression gène codant pour l'enzyme CYP27A1.

6.2. Objectifs

Le but de notre étude est d'analyser l'influence de la carence en vitamine D ou de l'inactivation du VDR (génotype VDR^{-/-}), en conditions basales et en réponse à divers inducteurs enzymatiques, sur l'expression génique hépatique 1) de cytochromes P450 impliqués dans la détoxification et la cytoprotection, les *CYP3A11* et *CYP2B10*, 2) d'un cytochrome P450 impliqué dans le métabolisme de la vitamine D₃, le *CYP27A1* et 3) d'un récepteur nucléaire jouant un rôle majeur dans la biotransformation des endobiotiques et des xénobiotiques, le *PXR*. L'effet d'un acide biliaire toxique (ALC), d'un inducteur enzymatique (PCN) et de l'hormone 1,25(OH)₂D₃ sur le processus de détoxification seront évalués.

II.- MATÉRIEL ET MÉTHODES

7. Modèles animaux utilisés et traitements

7.1 Présentation générale

L'ensemble des protocoles expérimentaux fut réalisé en utilisant des souris VDR^{+/+} (C57BL/6, Charles River, Saint-Constant, Qc) et VDR^{-/-} dérivées de la souche C57BL/6. La colonie de souris VDR^{-/-} nous a été gracieusement fournie par le docteur Marie Demay du Massachusetts General Hospital (Boston, MA) (89).

Tous nos protocoles ont été approuvés par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) du CHUM et respectent les standards d'éthique pour l'expérimentation animale du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

7.2 Inactivation fonctionnelle du VDR

La souris VDR^{-/-} que nous avons utilisée provient de l'équipe du docteur Demay et exprime un VDR portant une délétion génique menant à la perte de sa fonctionnalité (89). Ce modèle animal a donc été utilisé afin d'étudier l'impact de la fonctionnalité du récepteur sur l'expression des cytochromes hépatiques et par inférence sur la capacité potentielle de détoxification du foie.

7.3 Description des diètes

Les animaux VDR^{+/+} et VDR^{-/-} (mâles seulement) ont reçu soit une diète normale, soit une diète carencée en vitamine D, tel que décrit dans les sections suivantes.

7.3.1 Diète normale

Les animaux VDR^{+/+} et VDR^{-/-} soumis, dès leur sevrage, à une diète normale ont reçu une diète *Teklad Global 18 % protein rodent diet* (Harlan, Indianapolis, IN). Les animaux VDR^{+/+} avaient à leur disposition de l'eau provenant du robinet, alors que les souris VDR^{-/-} ont reçu de l'eau contenant 1,5% (p/v) de gluconate de calcium. L'ajout de

calcium dans l'alimentation des souris $VDR^{-/-}$ est nécessaire à la normalisation de leurs concentrations sanguines en minéraux ioniques (148).

7.3.2 Diète carencée en vitamine D

Afin d'évaluer l'importance du système de la vitamine D dans les mécanismes de détoxication, une carence en vitamine D a été induite chez les deux groupes de souris suivant un protocole bien établi dans notre laboratoire (149). La carence a été induite selon le protocole suivant: une femelle allaitante carencée en vitamine D et sa portée ont été nourries avec une diète déficiente en vitamine D (150), qui contenait 0,9% (p/p) de calcium élémentaire pour les souris $VDR^{-/-}$ et 0,5% pour les $VDR^{+/+}$. Cette différence est due au fait que les souris $VDR^{-/-}$ carencées ont besoin d'un apport en calcium supérieur pour survivre. La diète a été préparée dans notre laboratoire. Les souris $VDR^{+/+}$ ont reçu de l'eau déminéralisée et les animaux $VDR^{-/-}$ de l'eau distillée contenant 1,5% (p/v) de gluconate de calcium. Tous les animaux carencés ont été gardés dans une pièce à atmosphère contrôlée et avec un cycle d'éclairage constant (12h de clarté, 12h de noirceur) dépourvu de rayons ultra-violets, présents dans l'éclairage normal, pour empêcher la synthèse cutanée de vitamine D_3 . Les souriceaux furent sevrés à l'âge de 28 jours et furent maintenus dans les mêmes conditions jusqu'au traitement, soit à l'âge de 8 semaines. Cette attente est nécessaire au développement d'une carence.

La figure 4 illustre les modèles animaux utilisés.

7.4 Conditions générales de traitement

Seules les souris mâles furent traitées. Les traitements, effectués à l'âge de 8 semaines, étaient précédés de la prise de poids de l'animal et de la mesure du calcium ionisé sanguin à l'aide de l'analyseur Rapidlab 348 (Bayer, Toronto, ON). Tous les gavages, les injections, les prises de sang et les sacrifices ont été réalisés sous anesthésie au forane[®] (Isoflurane, Baxter Corporation, Toronto, ON). Les animaux ont été sacrifiés par exsanguination, suite à laquelle les échantillons de foie ont été prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C . Des échantillons de

sang ont été recueillis pour la mesure du calcium ionisé, de même que des concentrations sériques de 25OH_3 et $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ à l'aide des trousses d'Immunodiagnostic Systems par immunoextraction (Baldon, UK). La $25(\text{OH})\text{D}_3$ a été analysée par essai radio-immunologique (RIA) à l'aide d'un anticorps polyclonal de mouton marqué à l'iode 125 reconnaissant la $25(\text{OH})\text{D}_3$. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a quant à elle été analysée par essai immuno-enzymatique compétitif avec un anticorps monoclonal reconnaissant la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Les coefficients de variation inter-essais sont de 16% et 15% pour la $25(\text{OH})\text{D}_3$ et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ respectivement (résultats obtenus en laboratoire et non publiés). Les coefficients intra-essais n'ont pas été calculés dans notre laboratoire, mais le laboratoire de biochimie clinique de l'Hôpital St-Luc (Montréal, Qc) en charge de ces dosages rejette les résultats de tous les échantillons où les duplicata ont des concentrations divergentes de plus de 10%.

7.5 Traitements

Dans le but d'étudier l'influence d'un acide biliaire toxique dans l'élaboration des mécanismes de détoxication, des traitements à l'acide lithocholique (ALC) ont été effectués. L'effet d'un puissant inducteur des cytochromes P450, le pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN), a également été évalué. L'influence d'une dose aiguë de l'hormone $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a été étudiée afin de comprendre son rôle dans le métabolisme des endobiotiques et des xénobiotiques.

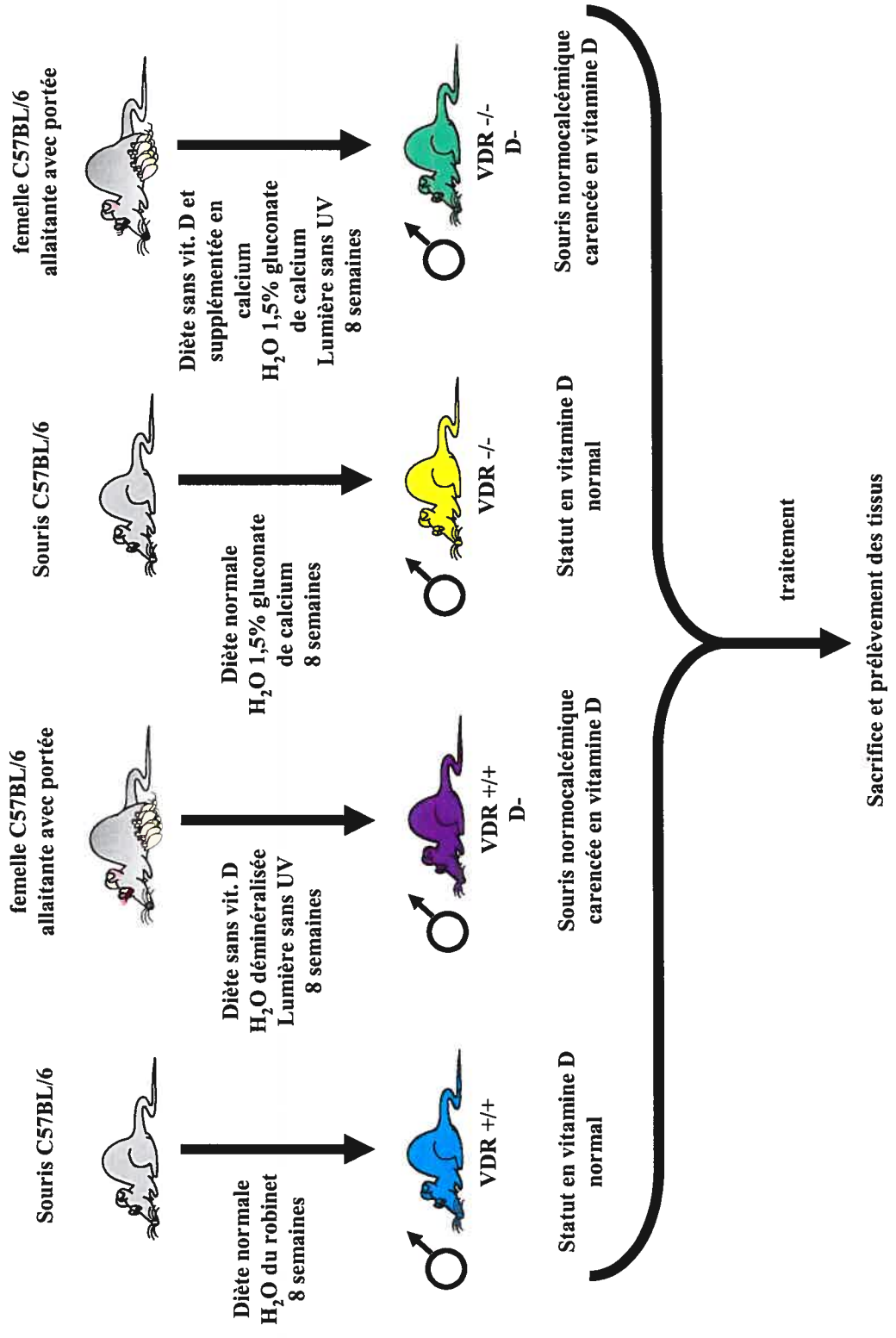
Les animaux ont reçu les traitements suivants :

- Véhicule: 200 μL de propylène glycol par jour, par gavage durant 3 jours
- ALC: 4mg dans 200 μL de véhicule par jour, par gavage durant 3 jours (103, 110)
- PCN: 7,5mg (dans du propylène glycol) par jour, par gavage durant 3 jours (103, 110)
- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: injection intraveineuse (veine jugulaire) d'une dose aiguë de 28pmol six heures avant le sacrifice. Celle-ci a été effectuée en combinaison avec un traitement au véhicule tel que décrit précédemment. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a été administrée en solution dans un véhicule d'injection contenant 65% (v/v) de propylène glycol, 20% (v/v) de solution physiologique à 0,9% de NaCl et 15%

(v/v) d'éthanol 95% tel que décrit précédemment (149). La dose et la durée du traitement ont été déterminés à partir de travaux déjà réalisés dans le laboratoire et correspondent aux paramètres permettant d'atteindre rapidement les concentrations physiologiques circulante de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mesurées chez l'animal normal. Le délai de 6 heures est suffisant à l'activation des gènes qui codent pour des protéines qui sont sous la dépendance directes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, comme le CYP27B1 et le CYP24 (151, 152).

Les animaux recevant l'un ou l'autre de ces traitements furent sacrifiés au quatrième jour.

Figure 4: Description des modèles animaux. *Légende* : ♂ mâle



8. Méthodes: Analyse de l'expression génique

8.1 Matériel

La trousse "RNeasy Mini" provient de Qiagen (Mississauga, ON). La trousse "First-Strand cDNA Synthesis" provient de GI Healthcare (Baie d'Urfé, QC). Les amorces et l'enzyme Taq ADN polymérase proviennent de Sigma (Mississauga, ON). Les amorces ont été élaborées à l'aide du logiciel "Primer 3" (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). L'appareil PCR Touchdown Thermal Cycling system provient de Hybaid (Teddington, UK). Le vecteur pCR II-TOPO provient de Invitrogen (Mississauga, ON). L'ADNc de l'ARN ribosomal 18S provient de American Type Culture Collection (#77242), Manassas, VA. Les produits chimiques utilisés sont conformes aux normes de l'American Chemical Society.

8.2 Analyse de l'expression génique

8.2.1 Extraction des ARN

Les ARN totaux des échantillons de foies ont été extraits en présence d'isothiocyanate de guanidine et de chlorure de lithium selon la méthode de Chirgwin et coll. (153) décrite précédemment par Lemay et coll. (151). Les échantillons ont subi une digestion avec la protéinase K afin de digérer les contaminants protéiques, ont été extraits avec un mélange de phénol-chloroforme-alcool isoamylique puis ont été précipités avec de l'acétate de sodium et de l'éthanol. La concentration en ARN des échantillons a été dosée par spectrophométrie à 260 nm.

8.2.2 Électrophorèse et transfert de Northern

Quinze microgrammes d'ARN totaux ont été dénaturés, séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et transférés sur une membrane de nylon suivant le protocole décrit par Lemay et coll. (151).

8.2.3 Synthèse des sondes

La séquence des amorces requises est exposée au tableau I. Elles proviennent de Tamasi et coll. (154) pour le *CYP3A11*, Mootha et coll. (155) pour le *CYP27A1*, Saito et coll. (156) pour le *CYP2B10* et Lehmann et coll. (157) pour le *PXR*. Les programmes PCR utilisés et la taille des fragments générés sont indiqués dans le tableau II. Les fragments obtenus pour ces gènes ont été clonés dans le vecteur pCR II-TOPO, amplifiés et leur séquence a été vérifiée. L'ARN ribosomal 18S, un fragment excisé du vecteur pBluescript SK⁺, a été utilisé comme contrôle interne. Il permet une normalisation en éliminant l'impact, sur les résultats, des variations des quantités d'ARN déposées sur les gels.

Les sondes ont été synthétisées avec du [α -³²P]dCTP par l'enzyme ADN Polymérase Klenow (GI Healthcare, Baie d'Urfé, QC)(152) par la méthode des hexamères aléatoires décrite précédemment (151).

8.2.4 Hybridation avec les sondes

Les niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre des gènes codant pour le *CYP3A11* et le *CYP27A1* ont été analysés par hybridation avec une sonde radiomarquée correspondante selon un protocole de buvardage de type Northern décrit précédemment (152). Dans le cas des gènes codant pour le *CYP2B10* et le *PXR*, l'hybridation a été réalisée dans un tampon phosphate suivant la méthode décrite par Provencher et coll. (158).

Toutes les membranes ont été exposées sur des films Kodak à -80°C avec des écrans amplificateurs CRONEX pour une période de 1 à 7 jours. Les films ont été analysés par photodensitométrie à l'aide du logiciel Collage V 4.0 (Fotodyne Inc., New Berlin, WI).

Tableau I. Description des séquences d'amorces.

| Gènes | Séquences | Positions |
|----------------|--|------------------------|
| <i>CYP3A11</i> | 5'-CTTGCTGTCACAGACCCAGA-3' 5'-TCCACGTTCACTCCAAATGA-3' | 337-318 635-654 |
| <i>CYP27A1</i> | 5'-GAGAGTGAATCAGGGGACCA-3' 5'-AGGAAGTGCAGGTAGCCAGA-3' | 666-647 1005-986 |
| <i>CYP2B10</i> | 5'-GCCATACACAGAGGCAGTCA-3' 5'-AAGCGGATCTGGTATGTTGG-3' | 1041-1060 1466-1445 |
| <i>PXR</i> | 5'-CAAATCTGCCGTGTATGTGG-3' 5'-CGGAAATTCTTGAAATGGGA-3' | 417-437 321-301 |

Tableau II. Description des cycles de PCR des gènes amplifiés et taille des fragments obtenus.

| Gènes | Cycles de PCR | Tailles de l'amplicon |
|----------------|---|-----------------------|
| <i>CYP3A11</i> | 95°C (3min), 1 cycle ; 95°C (30 sec), 59°C (1min), 72°C (1min30), 35 cycles ; 72°C (10min), 52°C (2min) 1 cycle | 337 pb |
| <i>CYP27A1</i> | 95°C (3min), 1 cycle ; 95°C (30 sec), 62°C (45 sec), 72°C (1min 30), 30 cycles ; 72°C (10min), 52°C (2min) 1 cycle | 359 pb |
| <i>CYP2B10</i> | 95°C (3min), 1 cycle ; 95°C (30 sec), 59°C (1min), 72°C (1min), 30 cycles ; 72°C (10min), 52°C (2min) 1 cycle | 425 pb |
| <i>PXR</i> | 95°C (3min), 1 cycle ; 95°C (30 sec), 59°C (45 sec), 72°C (1min 30), 35 cycles ; 72°C (10min), 52°C (2min) 1 cycle | 136 pb |

9. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes et d'erreur-types à la moyenne (E.T.). L'analyse des résultats fut réalisée en deux étapes afin d'évaluer l'importance globale 1) du génotype ($VDR^{+/+}$ et $VDR^{-/-}$) et 2) de la diète (normale ou carencée en vitamine D) sur les niveaux d'ARNm des gènes codant pour le PXR et trois CYPs étudiés à l'état basal et après traitement. Les effets de la diète, du génotype et des différents traitements ont été évalués par l'analyse de variance (ANOVA). Par la suite, les variations inter-groupes ont été évaluées par le test « t » de Student, qui a permis de décomposer les résultats présentant des différences significatives de l'ANOVA. Les différences entre les groupes dont la probabilité d'erreur était inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) furent considérées statistiquement significatives. Les comparaisons entre les groupes ont permis d'évaluer individuellement:

- a) L'importance du génotype: Les animaux $VDR^{+/+}$ soumis à une diète normale ont été comparés aux $VDR^{-/-}$ soumis à la même diète et les animaux $VDR^{+/+}$ soumis à une diète carencée ont été comparés aux $VDR^{-/-}$ soumis à la même diète;
- b) L'influence de la diète Ca-D-: Les animaux $VDR^{+/+}$ ayant reçu une diète normale furent comparés à ceux de même génotype ayant reçu une diète carencée en vitamine D et en calcium. De même, les animaux $VDR^{-/-}$ soumis à une diète normale ont été comparés aux animaux $VDR^{-/-}$ soumis à une diète carencée;
- c) L'effet des différents traitements sur les niveaux d'ARNm en comparaison avec ceux observés à l'état basal (groupe de référence) pour chacun des groupes.

III- RESULTATS

10. Concentrations sériques de calcium et des métabolites de la vitamine D

Le tableau III présente les concentrations sériques de calcium, de 25(OH)D et de 1,25(OH)₂D₃ chez les animaux à l'état basal. Les résultats indiquent que le génotype influence significativement la calcémie. En effet, nous observons une calcémie plus basse chez les animaux VDR^{-/-} que les animaux VDR^{+/+}. Par ailleurs, le génotype, ainsi que la diète, modifient significativement les concentrations circulantes de 25(OH)D ainsi que les concentrations sériques de 1,25(OH)₂D₃. En effet, les concentrations de 25(OH)D des animaux VDR^{+/+} soumis à une diète normale ainsi que carencée sont nettement plus élevées que celles observées chez les animaux VDR^{-/-}. Nous observons des concentrations extrêmement élevées de 1,25(OH)₂D₃ chez les VDR^{-/-} nourris à la diète normale, comparativement à celles observées chez les VDR^{+/+}. Ce même effet du génotype est également présent chez les animaux carencés, bien qu'il soit moins accentué, car les animaux VDR^{-/-} carencés présentent des concentrations de 1,25(OH)₂D₃ significativement inférieures à celles des VDR^{-/-} nourris à la diète normale.

11. Les niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre

Les figures 5 à 8 illustrent les niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre des gènes codant pour les trois cytochromes P450 étudiés, soit le *CYP3A11* (fig. 5); le *CYP2B10* (fig. 6); le *CYP27A11* (fig. 7), et pour le PXR (fig. 8) chez les animaux à l'état basal et après avoir reçu les différents traitements (1,25(OH)₂D₃, ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux. Elles mettent en évidence l'effet du génotype, de la diète et des traitements. Les différences significatives dues au génotype sont indiquées par une accolade entre les animaux VDR^{+/+} et VDR^{-/-}, alors que les différences significatives dues à la diète sont indiquées par des astérisques entre les diètes normale et carencée d'un même génotype. Les différences significatives dues aux traitements sont indiquées aux tableaux IV à VII où elles sont illustrées par une hausse (↑) ou une baisse (↓) indiquant les différences en comparaison avec les valeurs obtenues à l'état basal pour les animaux de même génotype et de même diète.

Tableau III. Concentrations sériques de calcium ionisé, de 25(OH)D₃ et de 1,25(OH)₂D₃.

| Paramètres sériques | | Ca ²⁺ mmol/L | 25(OH)D ₃ mmol/L | 1,25(OH) ₂ D ₃ pmol/L |
|---------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|
| Diète Normale | VDR ^{+/+} | 1,15 ± 0,01 | 170,41 ± 14,86 | 75,38 ± 23,23 |
| | VDR ^{-/-} | 0,95 ^a ± 0,02 | 13,37 ^a ± 0,50 | 6794,75^c ± 1821,25 |
| Diète Ca-D- | VDR ^{+/+} | 1,16 ± 0,02 | 24,82 ^a ± 3,22 | 31,95 ± 3,76 |
| | VDR ^{-/-} | 0,96 ^b ± 0,02 | 13,11 ± 0,83 | 54,33 ^{d,e} ± 8,07 |

a : p<0,0001 comparativement à l'animal VDR^{+/+} diète normale;

b : p<0,0001 comparativement à l'animal VDR^{+/+} diète Ca-D-;

c : p<0,01 comparativement à l'animal VDR^{+/+} diète normale;

d : p<0,01 comparativement à l'animal VDR^{+/+} diète Ca-D-;

e : p < 0,01 comparativement à l'animal VDR^{-/-} diète normale.

Calcémie : ANOVA effet du génotype : p < 0,0001; effet de la diète : N.S.

25(OH)D : ANOVA effet du génotype : p < 0,005; effet de la diète p < 0,0001.

1,25(OH)₂D₃ ANOVA effet du génotype : p < 0,005; effet de la diète p < 0,005.

11.1 CYP3A11

A. Effet de la diète

-Animaux VDR^{+/+}

À l'état basal (fig. 5A1et 5B1) nous observons une baisse importante des niveaux d'ARNm du gène codant pour le CYP3A11 chez les animaux soumis à la diète Ca-D- comparativement aux animaux ayant reçus la diète normale (p<0.0005). Par ailleurs, chez ces animaux, aucune différence associée à la diète n'est observée suite aux différents traitements.

Figure 5. Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le *CYP3A11* à l'état basal et après exposition aux différents traitements (1,25(OH)₂D₃, ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète. Les significations entre les groupes sont indiquées sur la figure selon la méthode décrite dans la section «Analyses statistiques» du chapitre précédent. L'effet du génotype, de la diète et du traitement sont :

À l'état basal: ANOVA : $p < 0,0001$; effet de la diète : $p < 0,005$.

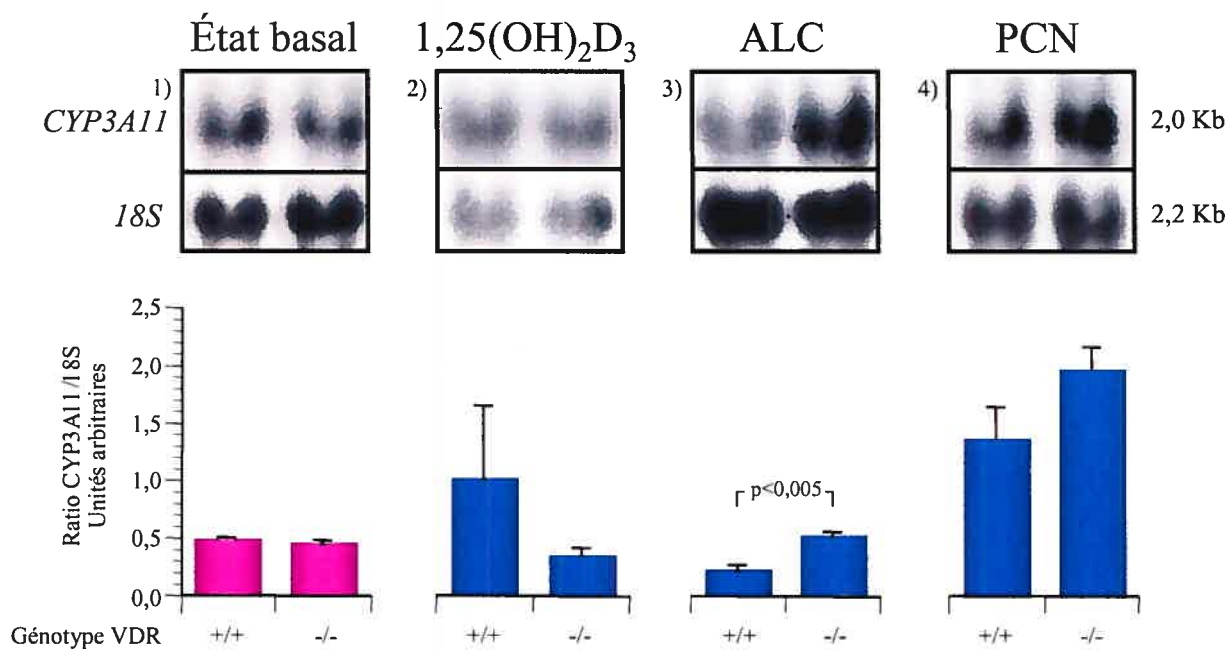
1,25(OH)₂D₃ : ANOVA : N.S.

ALC: ANOVA : $p < 0,005$, effet du génotype : $p < 0,005$.

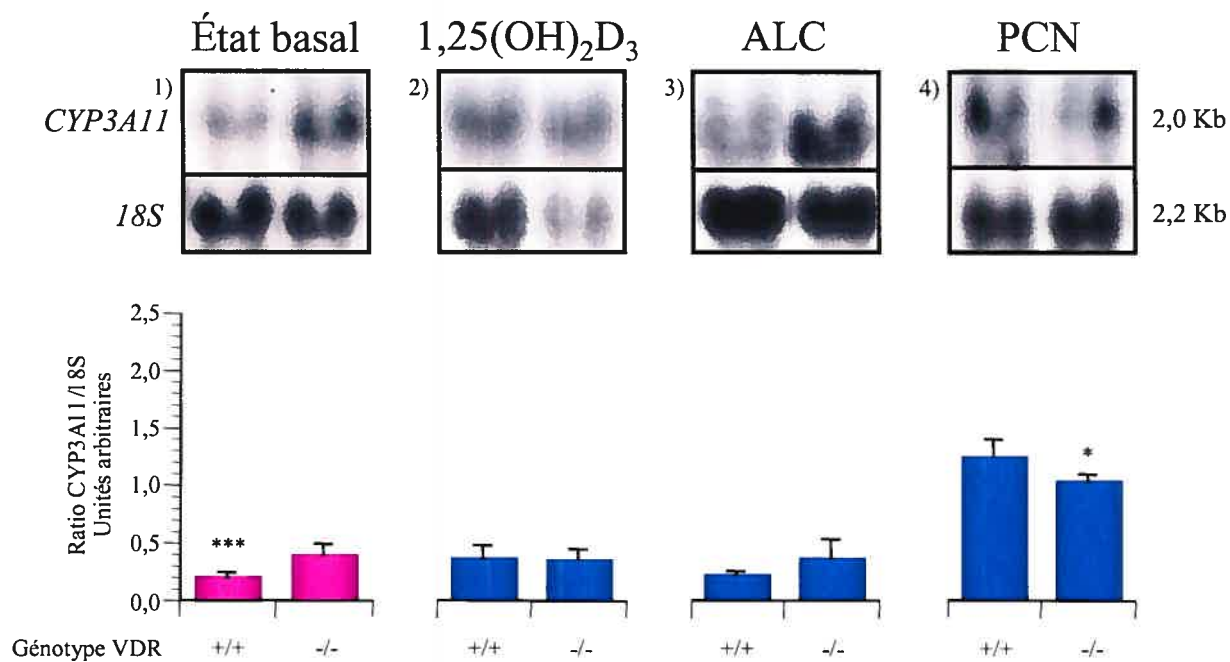
PCN: ANOVA : N.S.

Les différences dues à la diète chez les animaux d'un même génotype sont illustrées par le symbole "*" (* $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$). Les nombres d'animaux à l'état basal sont les suivants: VDR^{+/+} diète normale (n=13); VDR^{+/+} diète Ca-D- (n=5); VDR^{-/-} diète normale (n=7); VDR^{-/-} diète Ca-D- (n=4). Les nombres d'animaux après traitement sont les suivants: VDR^{+/+} diète normale (n=5); VDR^{+/+} diète Ca-D- (n=5); VDR^{-/-} diète normale (n=5); VDR^{-/-} diète Ca-D- (n=2).

A) Diète Normale



B) Diète Ca-D-



-Animaux VDR^{-/-}

Chez les animaux VDR^{-/-}, aucune différence attribuable à la diète n'est observée à l'état basal suite à l'administration de 1,25(OH)₂D₃ ou d'ALC. Par contre, comparativement à la diète normale, la diète carencée induit une baisse significative dans l'effet inducteur du PCN (voir section C ci bas) tel qu'indiqué par des niveaux de CYP3A11 plus élevés pour la diète normale comparativement à ceux observés pour la diète carencée (p<0,05).

B. Effet du génotype

Le génotype n'influence pas les niveaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP3A11* à l'exception d'une baisse importante des niveaux d'ARNm chez les animaux VDR^{+/+} ayant reçu la diète normale et un traitement à l'ALC. Cette baisse se traduit donc par une différence significative dans les niveaux d'ARNm codant pour ce gène entre les deux génotypes lors d'une exposition à l'ALC (p<0.005).

C. Effet des traitements

Comme l'illustrent la figure 5 et le tableau IV, l'ALC provoque une baisse dans les niveaux d'ARNm codant pour le *CYP3A11* chez les animaux VDR^{+/+} soumis à une diète normale alors qu'il n'a aucun effet en présence d'une diète carencée. Par contre, le PCN est un puissant inducteur du *CYP3A11* et ce, de façon indépendante du génotype et de la diète.

Tableau IV. Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le *CYP3A11*.

| Traitements | | 1,25(OH) ₂ D ₃ | ALC | PCN |
|---------------|--------------------|--------------------------------------|--------------|---------------|
| Diète Normale | VDR ^{+/+} | - | **** ↓60% | *** ↑178% |
| | VDR ^{-/-} | - | - | **** ↑333% |
| Diète Ca-D- | VDR ^{+/+} | - | - | *** ↑514% |
| | VDR ^{-/-} | - | - | * ↑157% |

Seuls les pourcentages d'augmentation ou de diminution significatifs ont été indiqués et ceux-ci sont accompagnés du symbole "*" selon le degré de signification statistique (*p <0,05; ***p<0,001 ; ****p<0,0001).

11.2 CYP2B10

A. Effet de la diète

-Animaux VDR^{+/+}

Un important effet de la diète est observé chez les animaux VDR^{+/+} où, à l'état basal, nous observons que les animaux nourris à la diète carencée montrent des niveaux d'ARNm du *CYP2B10* près de 22 fois plus bas que les animaux recevant la diète normale. Cet effet de la diète perdure après traitement à la 1,25(OH)₂D₃ ou à l'ALC. Aucun effet de la diète n'est observé après exposition au PCN.

-Animaux VDR^{-/-}

Aucune différence significative due à la diète n'est observée chez les animaux VDR^{-/-} dans les niveaux du *CYP2B10* à l'état d'équilibre ou suite à l'exposition au PCN. Chez ce groupe, le traitement à la 1,25(OH)₂D₃ provoque, tout comme chez les animaux VDR^{+/+}, une différence significative dans les niveaux d'ARNm codant pour le *CYP2B10* (p<0,05) due à la diète se caractérisant par de plus faibles niveaux d'ARNm chez les animaux carencés. Par contre, l'exposition à l'ALC induit un effet de la diète contraire à celui observé chez les animaux VDR^{+/+} se traduisant par des niveaux d'ARNm codants pour le *CYP2B10* plus importants chez les animaux carencés (p<0,005).

B. Effet du génotype

A l'état basal, le génotype VDR^{-/-} diminue significativement les niveaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP2B10* chez les animaux nourris à la diète normale, alors qu'il augmente en présence d'une diète carencée. Cette observation est de plus confirmée par l'interaction significative entre la diète et le génotype révélée par l'ANOVA (p<0.005). Ce phénomène est également observé après le traitement à la 1,25(OH)₂D₃ et à l'ALC où des niveaux accrus d'ARNm sont observés chez les animaux VDR^{-/-} carencés, alors que la diète normale n'entraîne aucun effet. Par ailleurs, l'effet du PCN est indépendant du génotype.

C. Effet du traitement

Aucun effet des traitements n'est observé chez les animaux VDR^{+/+} soumis à une diète normale, alors que chez les animaux VDR^{-/-}, la 1,25(OH)₂D₃ a un effet inducteur significatif (p<0,0001). Par contre, chez les animaux VDR^{+/+}, la diète carencée augmente significativement les niveaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP2B10* suite à des traitements à la 1,25(OH)₂D₃ (p<0,001), l'ALC (p<0,01) et le PCN (p<0,0001). Cet effet est aboli chez les animaux VDR^{-/-}.

Figure 6. Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le *CYP2B10* à l'état basal et après exposition aux différents traitements ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète. Les significations entre les groupes sont indiquées sur la figure selon la méthode décrite dans la section «Analyses statistiques» du chapitre précédent. L'effet du génotype, de la diète et du traitement sont :

À l'état basal: ANOVA : $p < 0,01$; interaction diète-génotype : $p < 0,005$.

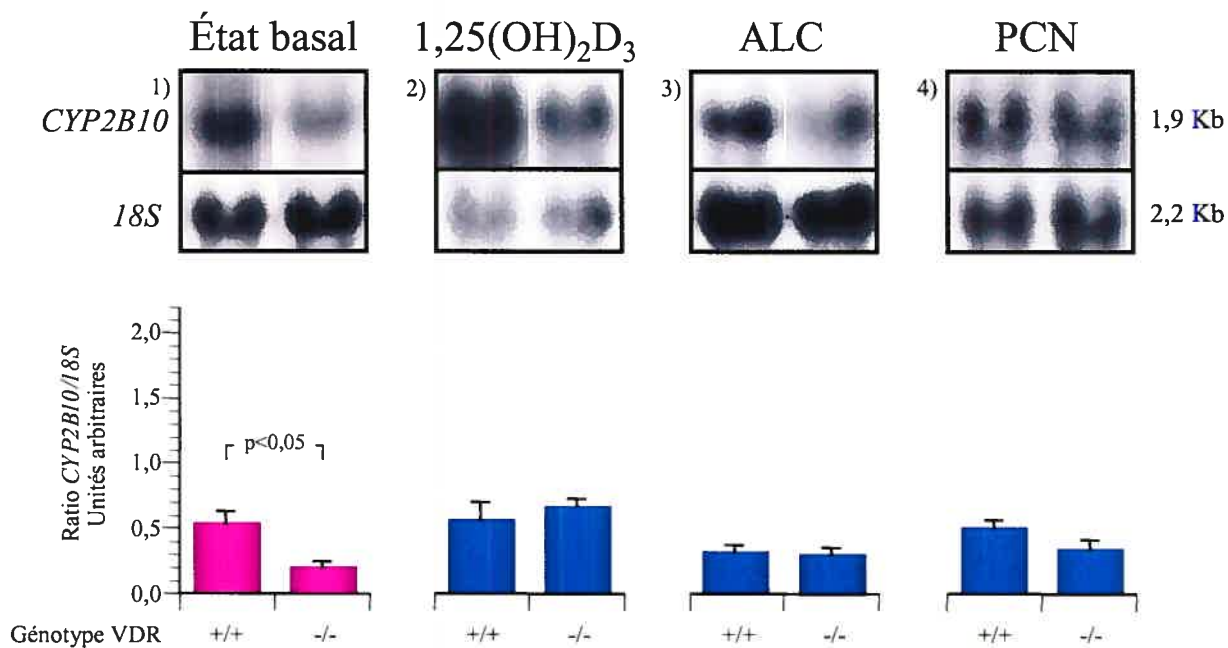
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: ANOVA : $p < 0,005$; effet de la diète : $p < 0,005$.

ALC: ANOVA : $p < 0,0001$; effet de la diète : $p < 0,005$; effet du génotype : $p < 0,005$; interaction diète-génotype : $p < 0,0001$.

PCN: ANOVA : $p < 0,05$; effet de la diète : $p < 0,05$.

Les différences dues à la diète chez les animaux d'un même génotype sont illustrées par le symbole "*" (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$). Les nombres d'animaux à l'état basal sont les suivants: $\text{VDR}^{+/+}$ diète normale ($n=13$); $\text{VDR}^{+/+}$ diète Ca-D- ($n=5$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète normale ($n=7$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète Ca-D- ($n=4$). Les nombres d'animaux après traitement sont les suivants: $\text{VDR}^{+/+}$ diète normale ($n=5$); $\text{VDR}^{+/+}$ diète Ca-D- ($n=5$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète normale ($n=5$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète Ca-D- ($n=2$).

A) Diète Normale



B) Diète Ca-D-

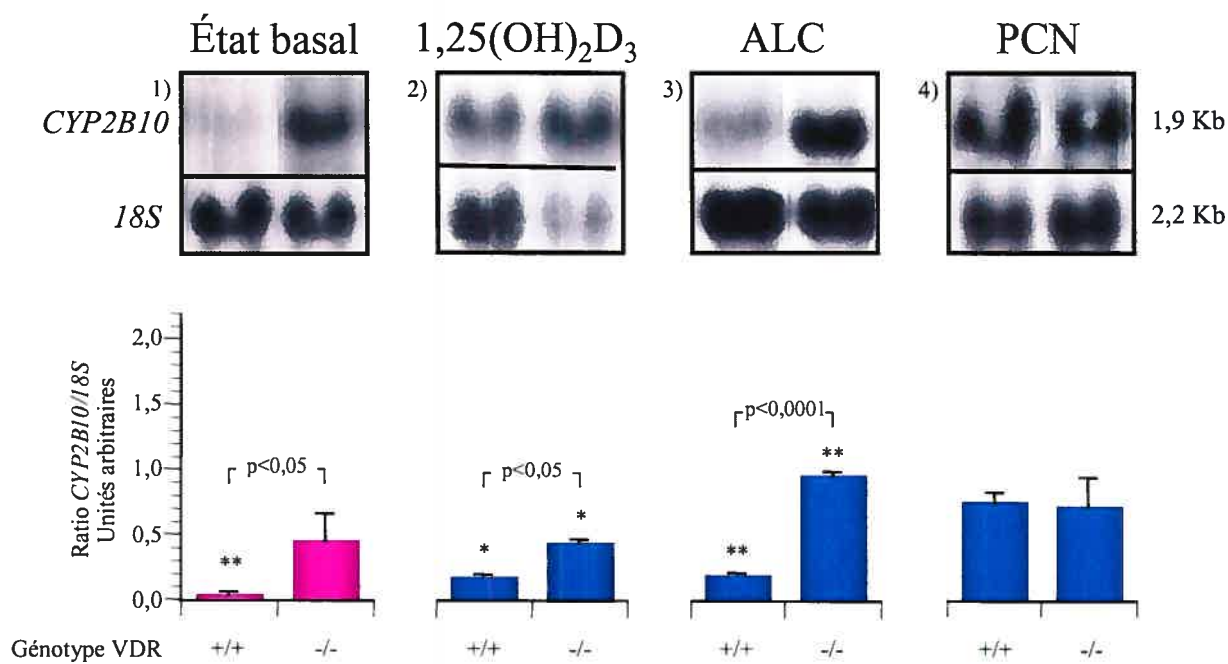


Tableau V. Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le *CYP2B10*.

| Traitements | | 1,25(OH) ₂ D ₃ | ALC | PCN |
|---------------|--------------------|--------------------------------------|-------------|----------------|
| Diète Normale | VDR ^{+/+} | - | - | - |
| | VDR ^{-/-} | **** ↑245% | - | - |
| Diète Ca-D- | VDR ^{+/+} | *** ↑567% | ** ↑638% | **** ↑2975% |
| | VDR ^{-/-} | - | - | - |

Seuls les pourcentages d'augmentation ou de diminution significatifs ont été indiqués et ceux-ci sont accompagnés du symbole "*" selon le degré de signification statistique (**p < 0,01; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001).

11.3 CYP27A1

A. Effet de la diète

-Animaux VDR^{+/+}

Aucun effet de la carence en vitamine D n'a été observé chez les animaux VDR^{+/+} à l'état basal ainsi que suite à l'un ou l'autre des traitements administrés.

-Animaux VDR^{-/-}

Alors qu'aucun effet de la carence n'a été observé chez l'animal VDR^{-/-} à l'état basal, une importante augmentation dans les niveaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP27A1* a été observée suite à l'administration de 1,25(OH)₂D₃

($p < 0,005$), d'ALC ($p < 0,005$) et de PCN ($p < 0,005$) chez l'animal carencé comparativement à celui ayant reçu la diète normale.

B. Effet du génotype

Aucun effet du génotype n'a été observé dans le cas de la diète normale. Par contre, un effet inducteur significatif du génotype $VDR^{-/-}$ a été observé suite à la carence en vitamine D chez les animaux soumis à un traitement à la $1,25(OH)_2D_3$ et à l'ALC, alors que l'exposition au PCN a entraîné une diminution (quoique statistiquement non significative) des niveaux d'ARNm codant pour le *CYP27A1* chez ce même groupe.

C. Effet des traitements

Comme l'illustrent la figure 7 et le tableau VI, les niveaux d'ARNm du *CYP27A1* sont peu affectés par les différents traitements. En effet, les analyses indiquent que seule la $1,25(OH)_2D_3$ abaisse les niveaux d'ARNm codant pour le *CYP27A1* et ce, uniquement chez l'animal $VDR^{+/+}$ soumis à la diète carencée.

11.4 PXR

A. Effet de la diète

-Animaux $VDR^{+/+}$

À l'état basal, la diète n'exerce aucun effet sur les niveaux d'ARNm du *PXR* chez les animaux $VDR^{+/+}$. Toutefois, l'exposition à la $1,25(OH)_2D_3$ ($p < 0,05$), l'ALC ($p < 0,005$) et le PCN ($p < 0,0005$) induit une différence importante dans les niveaux d'ARN codant pour le *PXR* qui résulte en des niveaux d'ARNm supérieurs chez les animaux carencés. Cette augmentation n'est pas observée chez les animaux recevant la diète normale.

Figure 7. Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le *CYP27A1* à l'état basal et après exposition aux différents traitements ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète. Les significations entre les groupes sont indiquées sur la figure selon la méthode décrite dans la section «Analyses statistiques» du chapitre précédent. L'effet du génotype, de la diète et du traitement sont :

À l'état basal: ANOVA : N.S.

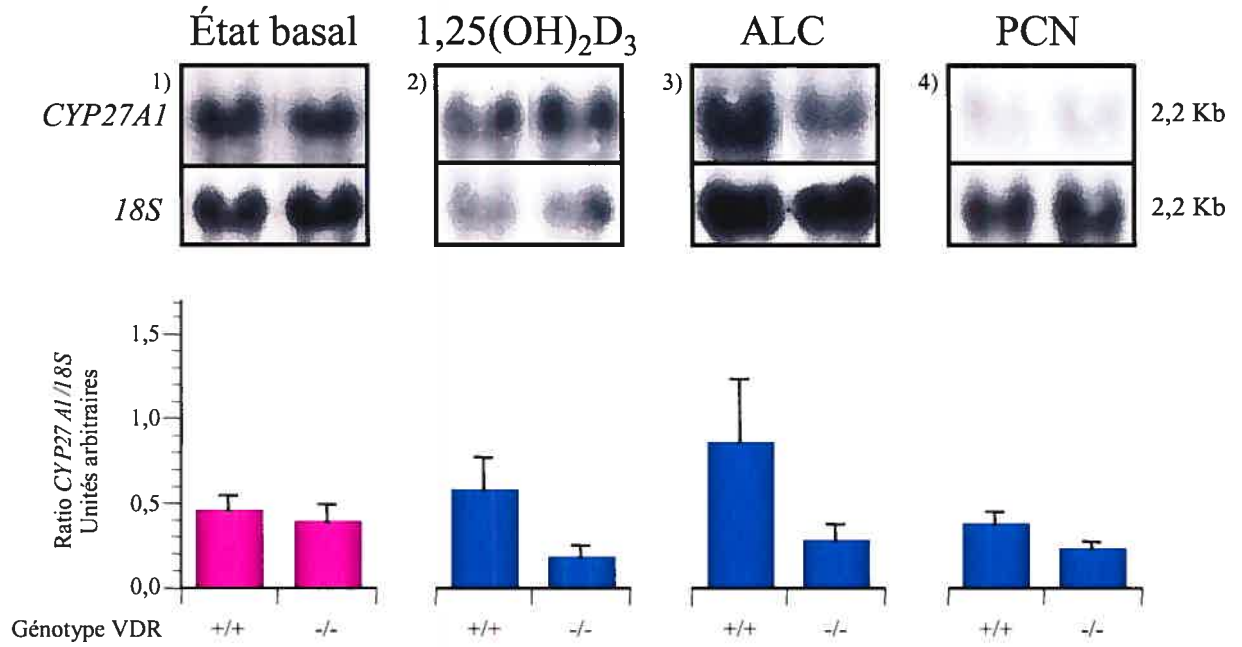
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: ANOVA : $p < 0,01$, effet de la diète ou du génotype : N. S.

ALC: ANOVA : N.S.

PCN: ANOVA : N.S.

Les différences dues à la diète chez les animaux d'un même génotype sont illustrées par le symbole "*" (** $p < 0,005$). Les nombres d'animaux à l'état basal sont les suivants: $\text{VDR}^{+/+}$ diète normale (n=13); $\text{VDR}^{+/+}$ diète Ca-D- (n=5); $\text{VDR}^{-/-}$ diète normale (n=7); $\text{VDR}^{-/-}$ diète Ca-D- (n=4). Les nombres d'animaux après traitement sont les suivants: $\text{VDR}^{+/+}$ diète normale (n=5); $\text{VDR}^{+/+}$ diète Ca-D- (n=5); $\text{VDR}^{-/-}$ diète normale (n=5); $\text{VDR}^{-/-}$ diète Ca-D- (n=2).

A) Diète Normale



B) Diète Ca-D-

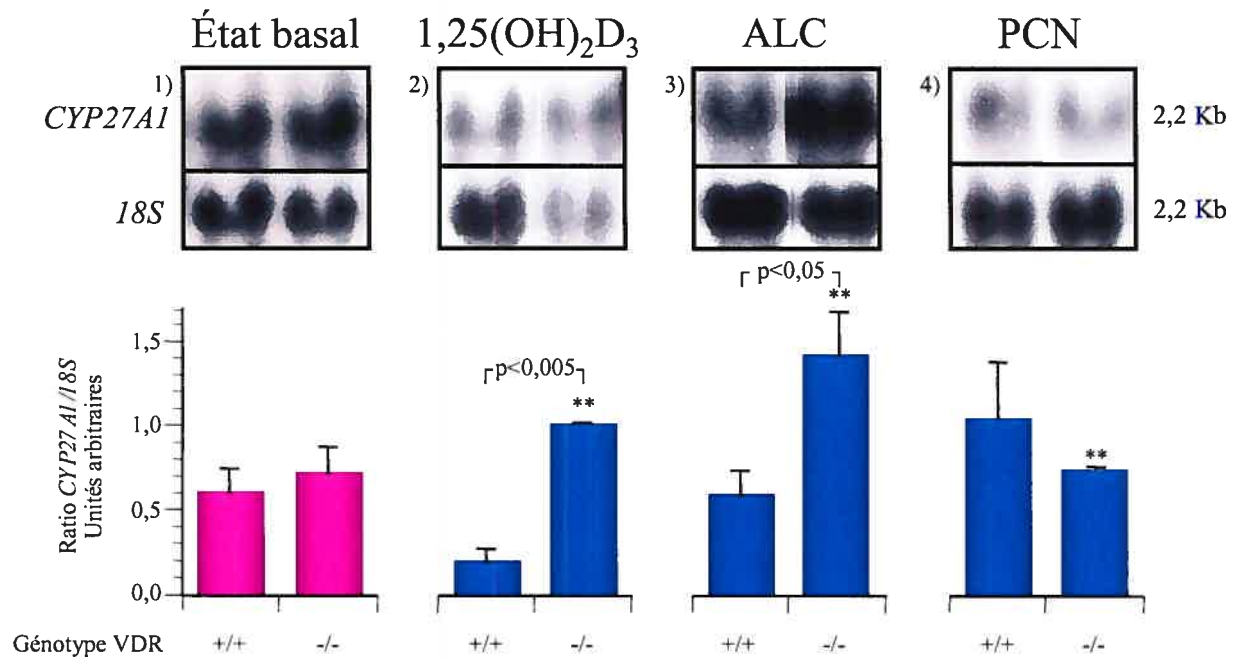


Tableau VI. Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le *CYP27A1*.

| Traitements | | 1,25(OH) ₂ D ₃ | ALC | PCN |
|---------------|--------------------|--------------------------------------|-----|-----|
| Diète Normale | VDR ^{+/+} | - | - | - |
| | VDR ^{-/-} | - | - | - |
| Diète Ca-D- | VDR ^{+/+} | * ↓69% | - | - |
| | VDR ^{-/-} | - | - | - |

Seuls les pourcentages d'augmentation ou de diminution significatifs ont été indiqués et ceux-ci sont accompagnés du symbole "*" selon le degré de signification statistique (*p < 0,05).

-Animaux VDR^{-/-}

Aucun effet de la carence en vitamine D n'a été observé chez l'animal VDR^{-/-}.

B. Effet du génotype

À l'état basal, aucun effet du génotype n'a été observé chez les animaux soumis à une diète normale. Par contre, la diète carencée en vitamine D induit un effet du génotype résultant en des niveaux d'ARNm codant pour le PXR plus bas chez les animaux VDR^{-/-} (p < 0,05). Chez les animaux nourris à la diète normale, l'exposition à l'ALC entraîne une différence significative entre les groupes VDR^{+/+} et VDR^{-/-}, ces derniers montrant des niveaux d'ARNm codant pour le PXR significativement plus élevés. Chez les animaux carencés, une baisse significative liée au génotype VDR^{-/-} a été observée suite à l'exposition à la

1,25(OH)₂D₃ (p <0,001) et à l'ALC (p <0,05), alors que le a PCN induit une différence semblable mais qui n'a pas atteint un niveau statistiquement significatif.

C. Effet des traitements

Comme l'illustrent la figure 8 et le tableau VII, les niveaux d'ARNm du gène codant pour le *PXR* sont peu affectés par les traitements. En effet, seul le PCN augmente ces niveaux d'ARNm et ce, uniquement chez l'animal VDR^{-/-} soumis à la diète carencée.

Tableau VII. Effet des traitements comparativement à l'état basal sur les niveaux d'ARNm codant pour le *PXR*.

| Traitements | | 1,25(OH) ₂ D ₃ | ALC | PCN |
|---------------|--------------------|--------------------------------------|-----|-----------|
| Diète Normale | VDR ^{+/+} | - | - | - |
| | VDR ^{-/-} | - | - | - |
| Diète Ca-D- | VDR ^{+/+} | - | - | - |
| | VDR ^{-/-} | - | - | * ↑49% |

Seuls les pourcentages d'augmentation ou de diminution significatifs ont été indiqués et ceux-ci sont accompagnés du symbole "*" selon le degré de signification statistique (*p <0,05).

Figure 8. Niveaux d'ARNm à l'état d'équilibre du gène codant pour le *PXR* à l'état basal et après exposition aux différents traitements ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ALC et PCN) chez les quatre groupes d'animaux selon le génotype et selon la diète. Les significations entre les groupes sont indiquées sur la figure selon la méthode décrite dans la section «Analyses statistiques» du chapitre précédent. L'effet du génotype, de la diète et du traitement sont :

À l'état basal: ANOVA : N.S.

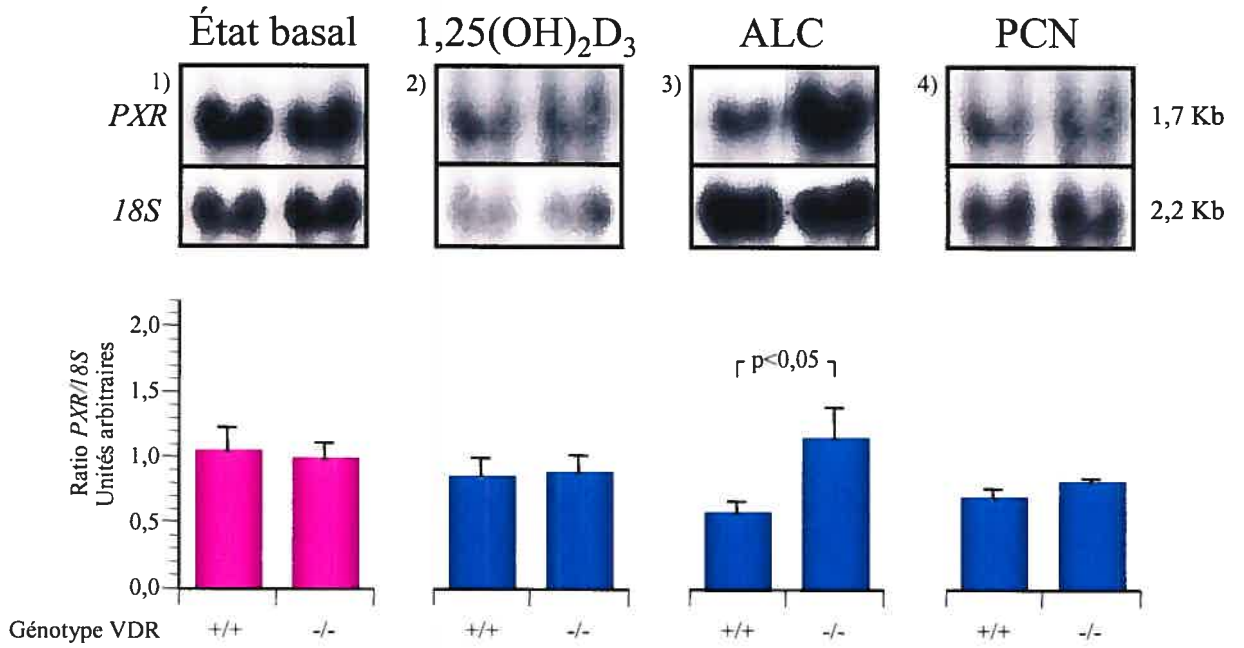
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: ANOVA : $p < 0,01$; effet de la diète : $p < 0,01$; effet du génotype : $p < 0,05$; interaction diète-génotype : $p < 0,005$.

ALC: ANOVA : $p < 0,005$; effet de la diète : $p < 0,05$; interaction diète-génotype : $p < 0,005$.

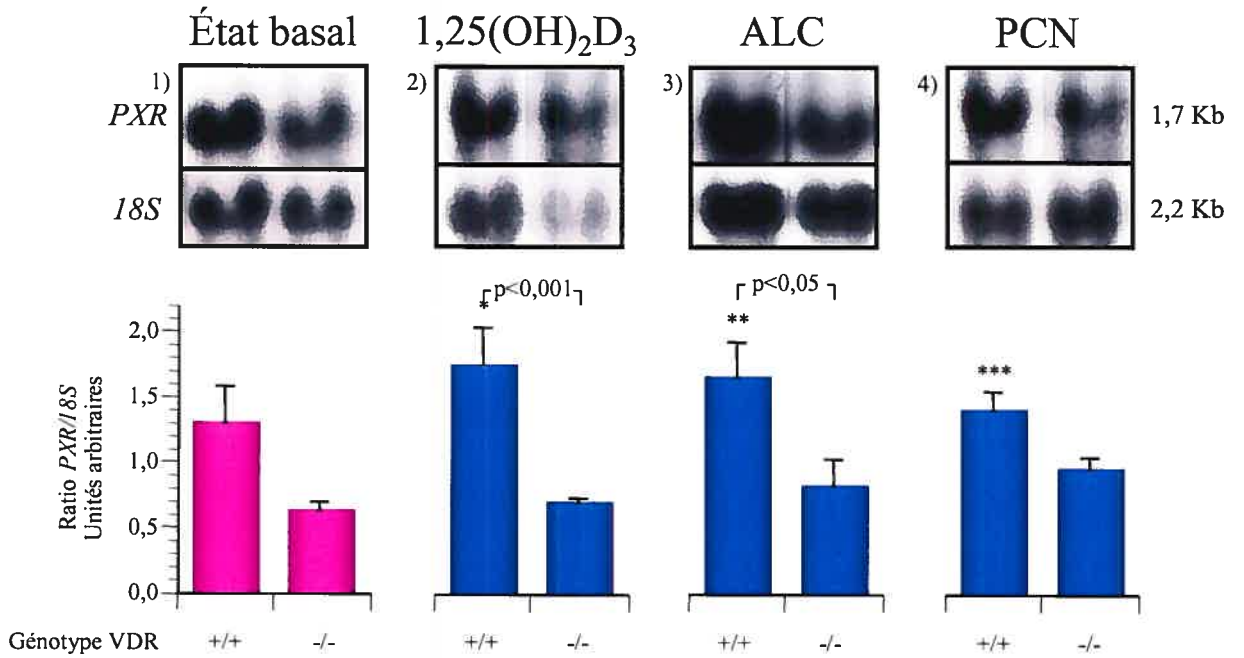
PCN : ANOVA : $p < 0,005$; effet de la diète : $p < 0,005$; interaction diète-génotype : $p < 0,05$

Les différences dues à la diète chez les animaux d'un même génotype sont illustrées par le symbole "*" (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$). Les nombres d'animaux à l'état basal sont les suivants: $\text{VDR}^{+/+}$ diète normale ($n=13$); $\text{VDR}^{+/+}$ diète Ca-D- ($n=5$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète normale ($n=7$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète Ca-D- ($n=4$). Les nombres d'animaux après traitement sont les suivants: $\text{VDR}^{+/+}$ diète normale ($n=5$); $\text{VDR}^{+/+}$ diète Ca-D- ($n=5$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète normale ($n=5$); $\text{VDR}^{-/-}$ diète Ca-D- ($n=2$).

A) Diète Normale



B) Diète Ca-D-



IV.- DISCUSSION ET CONCLUSION

12. DISCUSSION

Cette étude avait pour but d'évaluer les différences dans la réponse de quatre gènes (les cytochromes P450 *3A11*, *2B10*, *27A1* et le PXR) à trois composés (la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, l'ALC et le PCN) pouvant modifier leur expression génique. De plus, elle a été réalisée chez des souris présentant un génotype $\text{VDR}^{+/+}$ ou $\text{VDR}^{-/-}$ ainsi qu'en présence d'un statut nutritionnel normal ou carencé en vitamine D. Le calcium ionisé, la $25(\text{OH})\text{D}_3$ et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sériques, qui sont des marqueurs de l'état nutritionnel ou endocrinien en vitamine D, se sont montrés sensibles à la carence en vitamine D, alors que la $25(\text{OH})\text{D}_3$ et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se sont également montrées sensibles au génotype. Ces résultats confirment l'atteinte de la carence en vitamine D chez les animaux et illustrent l'effet du génotype $\text{VDR}^{-/-}$ sur les métabolites circulants de la vitamine D.

Les résultats de l'étude réalisée indiquent que la réponse des cytochromes P450 et donc la capacité de détoxification et de cytoprotection du foie peuvent être influencées par l'intégrité du système de la vitamine D. Nos résultats montrent que, tant la carence en vitamine D que la fonctionnalité du VDR sur les niveaux d'ARNm des gènes codant pour les CYPs évalués et le PXR sont influencées par ces deux conditions. Nous pouvons de ce fait postuler que la fonction de cytoprotection du foie pourrait être affectée lorsque des altérations sont observées dans la transcription de ces gènes.

Nos travaux ont mis en évidence des variations entre les différents groupes d'animaux dans les niveaux basaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP2B10*. En effet, bien qu'une baisse significative, comparativement au groupe témoin, ait été observée chez les animaux $\text{VDR}^{-/-}$ nourris avec une diète normale, c'est chez les animaux $\text{VDR}^{+/+}$ carencés en vitamine D que la différence la plus frappante a été observée. Cette forte baisse du niveau basal semble en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature, en particulier par Drocourt et coll. (132), qui ont montré que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induit, bien que faiblement, le *CYP2B6* dans des lignées primaires d'hépatocytes humains. La carence en vitamine D semble donc abolir cette induction basale du *CYP2B10*, un homologue murin du *CYP2B6*. Une telle baisse, quoique moins importante, a été observée dans les

niveaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP3A11* chez les animaux $VDR^{+/+}$ carencés en vitamine D.

Les données obtenues suite aux traitements des animaux avec des composés métabolisés par les cytochromes P450 ont ensuite permis d'évaluer l'intensité de la réponse en fonction du statut nutritionnel ou de la fonctionnalité du VDR. Elles ont permis de déterminer dans quelle mesure un dérèglement du système de la vitamine D pouvait affecter la réponse de l'organisme envers des composés potentiellement toxiques.

L'un des composés évalué, le PCN, est un inducteur bien connu des gènes de la famille de cytochromes P450 *CYP3A*. Ses effets ont notamment été documentés dans le foie et l'intestin des rongeurs, de même que dans les hépatocytes en culture (104, 159). L'induction PXR-dépendante des *CYP3A*, voie notamment induite par le PCN, peut protéger contre la toxicité de certains xénobiotiques en accélérant leur métabolisme (131). Nos résultats confirment le potentiel inducteur du PCN sur les niveaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP3A11*. En effet, nous avons noté une forte induction chez les quatre groupes d'animaux. Nos travaux illustrent que le PCN demeure un fort inducteur du *CYP3A11* et que ni la carence ni le génotype ne perturbent cette induction, illustrant ainsi que ce composé garde tout son effet protecteur contre des effets d'agents cytotoxiques.

La capacité du PCN à induire le *CYP2B10* a également déjà été rapportée par Jarukamjorn et coll. (160). Nos travaux montrent une très forte induction chez les souris $VDR^{+/+}$ en état de carence seulement. Contrairement aux résultats obtenus par Jarukamjorn et coll., nous n'avons pas observé cette induction chez les animaux $VDR^{+/+}$ nourris à la diète normale. Ceux-ci avaient effectué l'expérience dans des conditions semblables aux nôtres, à l'exception de la dose utilisée (0,1 mg/g/jour) qui était plus faible que la nôtre (7,5 mg/jour, correspondant à 0,3 mg/g/jour en moyenne). Le PCN, de plus, était administré par voie sous-cutanée plutôt que par gavage. La divergence des résultats pourrait s'expliquer par la différence des voies d'administration, qui peuvent influencer les concentrations sanguines et tissulaires du produit.

Par ailleurs, Drocourt et coll. (132) rapportent que l'activation du CYP2B6 par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se fait par l'intermédiaire de la liaison du VDR (sous forme d'hétérodimère avec le RXR) à deux motifs DR4 (*PXR/CAR responsive elements*) présents dans le promoteur du gène codant pour le CYP2B6. Cette activation induit probablement un certain niveau basal de CYP2B6 dans l'hépatocyte. Or, il avait auparavant été montré que le CYP2B6 est induit par la liaison du PXR et du CAR via ces mêmes éléments de réponse DR4 et, de surcroît, que ces deux motifs sont nécessaires pour une réponse maximale à certains produits comme le phénobarbital (138, 161). Il est ainsi possible que l'activation du CYP2B10 par l'ALC et le PCN se fasse, via le PXR, par liaison sur ces éléments de réponse DR4 et avec une affinité différente de celle du VDR pour ces motifs. En outre, il est probable que les mécanismes mis en jeu lors de l'activation de la transcription par le VDR et par le PXR/CAR soient différents, notamment en ce qui concerne le recrutement des coactivateurs, qui pourraient être différents, expliquant ainsi les différences dans les niveaux d'induction produits par les différents récepteurs. L'importante induction que nous semblons observer chez les animaux $\text{VDR}^{+/+}$ carencés suite au traitement à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, l'ALC et le PCN pourrait donc s'expliquer par le fait qu'en état de carence en vitamine D, la quantité de VDR activé par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se trouve grandement diminuée, réduisant ainsi la compétition entre le VDR et le PXR pour la liaison des éléments DR4. Il y aurait donc une libération des deux sites DR4, laissant libre place à une réponse optimale via le PXR. De plus, comme l'activation par le VDR et le PXR est dépendante de leur hétérodimérisation avec le RXR, la compétition pour le RXR se trouve sans doute réduite en cas de carence en vitamine D.

En outre, Pascussi et coll. (162) ont montré que des agonistes du PXR comme le PCN étaient capables d'induire, via ce récepteur, l'expression de la 24-hydroxylase, l'enzyme majeure du catabolisme de la vitamine D. Cette induction est rendue possible par la capacité du PXR de lier et transactiver les deux VDRE proximaux du promoteur du CYP24 et pourrait accentuer l'effet de la carence sur la potentialisation de la réponse suite aux traitements à l'ALC et au PCN.

L'ALC, autre composé évalué, est un acide biliaire secondaire hautement toxique dont l'intérêt majeur réside dans sa possible capacité d'interaction avec le VDR. En effet, Makishima et coll. (68) ont publié en 2002 une importante étude étendant le rôle du VDR à celui d'un récepteur orphelin. Cette équipe a montré que l'ALC et ses métabolites étaient des ligands du VDR dans l'intestin et que cette association, indépendante de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou du PXR, menait à l'induction des CYP3A (68). Cependant, la liaison de l'ALC ou de ses métabolites au VDR et une éventuelle induction des CYP3A n'a jamais été montrée dans le foie. Nos résultats portant sur les niveaux observés d'ARNm du gène codant pour le *CYP3A11* suite au traitement à l'ALC n'ont montré aucune induction du gène et ce, indépendamment du groupe d'animaux. Nous avons même observé une légère baisse d'expression chez les animaux normaux. Il semble que la sensibilité des cellules hépatiques à l'ALC soit moindre que celle observée dans les cellules intestinales. Cette différence de sensibilité à l'ALC entre les hépatocytes et les entérocytes pourrait provenir de différences dans le transport membranaire de l'ALC et dans sa demi-vie selon le type cellulaire. Il est également possible que la voie préférentielle de transduction du signal varie en fonction de l'abondance relative du VDR dans chaque type cellulaire. En effet, l'intestin est un des organes renfermant la plus grande quantité de VDR, contrairement au foie, dont l'abondance varie selon le type cellulaire (163). Il est connu que dans le foie de rat mâle, la densité du VDR est 1300 fois inférieure à celle retrouvée dans l'intestin (163). Il semble donc, du moins à la dose évaluée, que ce soit le PXR plutôt que le VDR qui soit majoritairement impliqué dans les mécanismes hépatiques de détoxification des acides biliaires via la voie des CYP3A. Étant donné la faible quantité de VDR dans le foie, la compétition pour les ligands entre VDR et le PXR est probablement à l'avantage de ce dernier. Pour l'instant, nos résultats ne semblent pas confirmer l'hypothèse selon laquelle le VDR hépatique jouerait un rôle de médiateur des acides biliaires et serait ainsi impliqué dans la cytoprotection contre la toxicité de l'ALC via l'induction du CYP3A11.

Parallèlement, une étude récente de McCarthy et coll. (164) portant sur la régulation de l'expression de la protéine Mrp3 (multidrug resistance-associated protein) semble

confirmer ces résultats (164). Mrp3, également connue sous le nom de Abcc3, est un transporteur multispécifique d'anions capable de transporter plusieurs acides biliaires conjugués et non-conjugués. Cette protéine semble jouer un rôle de détoxification des acides biliaires et son expression est augmentée dans des conditions pathologiques telle que la cholestase intrahépatique (164). Les résultats de McCarthy et coll. (164) montrent que le promoteur de Mrp3 est activé par la vitamine D₃ et les acides biliaires secondaires de façon VDR-dépendante dans le colon chez la souris. Cependant, cette induction de Mrp3 par l'ALC et la 1,25(OH)₂D₃ ne fut pas observée par cette équipe dans le foie (164). Ces résultats semblent, comme les nôtres, exclure le rôle du VDR dans la réponse hépatique aux acides biliaires.

Par ailleurs, en plus de l'ALC, la 1,25(OH)₂D₃ a également été identifiée comme inducteur du CYP3A11. Plusieurs équipes ont en effet observé cet effet inducteur chez des lignées cellulaires de carcinome du colon (Caco-2) et d'intestin humain (LS180) (165, 166). Cette induction a également été rapportée avec des cellules HepG2, une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain, et chez des hépatocytes humains normaux (132, 167). Drocourt et coll. (132) ont montré que le VDR était capable de lier et de transactiver différents motifs reconnus par le PXR et CAR sur le promoteur de plusieurs gènes de CYPs dont le CYP3A4, suggérant ainsi que la 1,25(OH)₂D₃ peut induire le CYP3A4 via le VDR. Ils ont, en outre, noté une légère induction du CYP2B6 par la 1,25(OH)₂D₃ tel que mentionné plus haut. Dans ces conditions, il apparaît normal de ne pas voir d'effet de la 1,25(OH)₂D₃ sur l'induction du *CYP3A11* hépatique chez nos souris VDR^{-/-}, puisqu'un récepteur fonctionnel est obligatoire pour obtenir une réponse adéquate de la cellule exposée à la 1,25(OH)₂D₃. Cependant, l'observation illustrant que les animaux VDR^{+/+} n'ont pas répondu au traitement est quelque peu surprenant, puisqu'ils possèdent un VDR fonctionnel. Il est possible qu'une dose plus élevée de 1,25(OH)₂D₃ ou un délai plus long avant le sacrifice auraient été nécessaires pour observer une induction. À cet égard, Drocourt et coll. (132) avaient obtenu leurs résultats après une incubation en présence de 1,25(OH)₂D₃ de 24 heures, soit quatre fois la durée du traitement que nous avons effectué. Du côté des animaux carencés, une autre explication possible réside dans le fait que, chez l'humain, la 1,25(OH)₂D₃ augmente la

quantité de VDR en bloquant la voie de dégradation du récepteur médiée par l'ubiquitine/protéasome (168). Si tel est le cas chez la souris, il est légitime de croire que la condition prolongée de carence en vitamine D de ces animaux nuit à la fonction de blocage de la voie de dégradation du récepteur. Par conséquent, la diminution de la quantité de VDR pourrait être à l'origine d'une certaine résistance au traitement aigu de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La comparaison, par des analyses immunohistochimiques ou des immunobuvardage de type western, de la quantité de VDR hépatique présente chez les animaux soumis à une diète normale et les animaux carencés permettrait d'apporter une réponse à cette hypothèse.

L'hypothèse de la durée insuffisante du traitement pourrait expliquer que nous n'avons observé aucune induction du CYP2B10 chez les animaux $\text{VDR}^{+/+}$ nourris à la diète normale. Par contre, les animaux $\text{VDR}^{+/+}$ carencés ont fortement répondu au traitement, ce qui laisse croire que le gène codant pour le CYP2B10 est plus sensible aux effets inducteurs de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que le CYP3A11 chez ces animaux. D'autre part, il est surprenant de constater que les animaux $\text{VDR}^{-/-}$ soumis à la diète normale ont répondu à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ malgré le fait qu'ils possèdent un récepteur VDR non fonctionnel. Ce résultat suggère qu'il est possible que cette hormone puisse être un ligand pour un autre récepteur comme le CAR, un récepteur orphelin qui est fortement exprimé dans le foie et souvent impliqué dans l'activation transcriptionnelle du *CYP2B6* et du *CYP3A4* (115). Ce rôle de récepteur alternatif n'est probablement pas attribuable au PXR qui, malgré sa grande homologie de séquence avec le VDR concernant le domaine de liaison à l'ADN (63%), ne présente que 37% d'homologie dans le domaine de liaison au ligand (115). De plus, son rôle de médiateur des effets de la vitamine D_3 semble exclu car 1) chez l'humain, le PXR n'est pas activé par la vitamine D et ses dérivés hydroxylés et 2) son expression n'est pas augmentée par ces composés (115,132). L'existence d'un autre récepteur capable de lier la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pourrait expliquer pourquoi les animaux $\text{VDR}^{-/-}$ n'ont pas montré une sensibilité aux traitements comparable à celle des animaux carencés contrairement à ce que l'on pourrait avancer selon le modèle de compétition entre VDR et PXR/CAR que nous proposons. En effet, la liaison de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ à un autre récepteur pourrait impliquer une compétition avec le PXR pour les sites de liaison

qui soit VDR-indépendante. Ce résultat suggère qu'il pourrait être pertinent, dans des perspectives futures, d'envisager l'existence d'actions VDR-indépendantes de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et, par conséquent, d'un autre récepteur capable de lier l'hormone, notamment par l'utilisation de tests de liaison et d'affinité avec les candidats potentiels.

De façon complémentaire à l'étude du *CYP3A11* et du *CYP2B10*, nous avons évalué les niveaux d'ARNm du gène codant pour le PXR. Ceux-ci se sont révélés quasi indépendants du traitement utilisé, avec pour seule réponse une faible diminution d'expression chez les $\text{VDR}^{-/-}$ nourris à la diète normale. Cela permet de croire que les inductions observées pour le *CYP3A11* et le *CYP2B10* causées par les inducteurs agissant via le PXR, comme le PCN, ne sont pas attribuables à une augmentation de la quantité de ce récepteur suite au traitement, mais seulement à son activation. Le patron des niveaux d'ARNm pour l'ensemble des groupes d'animaux est demeuré relativement constant, malgré de légères fluctuations qui ont influencé la signification statistique des différences inter-groupes. Malgré que les différences ne soient pas toujours significatives, il semble que les animaux $\text{VDR}^{+/+}$ carencés ont tendance à présenter un niveau d'expression plus élevé du PXR, ce qui pourrait expliquer en partie l'hypersensibilité de ce groupe au PCN observée dans le cas de l'expression génique du *CYP3A11* et du *CYP2B10*.

Finalement, l'étude des niveaux d'ARNm du gène codant pour le *CYP27A1* avait pour but d'évaluer si la diète carencée, l'inactivation du VDR ou le traitement à l'un ou l'autre des inducteurs affectait le métabolisme de la vitamine D chez la souris. Nos résultats semblent montrer que ce dernier dépend peu du statut nutritionnel en vitamine D ou de la fonctionnalité du récepteur, tel que confirmé par l'absence d'effet significatif observé à l'état basal. Les traitements sont quant à eux restés sans effet, à l'exception de la baisse des niveaux d'ARNm provoquée par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ chez les $\text{VDR}^{+/+}$ carencés. Le métabolisme de la vitamine D, du moins à l'étape de la 25-hydroxylation, ne semble donc presque pas affecté par les inducteurs enzymatiques évalués.

13. CONCLUSION

Cette étude avait pour but d'analyser l'importance du système endocrinien de la vitamine D en étudiant l'effet du statut nutritionnel en D ou de l'inactivation du VDR sur l'expression génique hépatique de deux cytochromes P450 majeurs impliqués dans la détoxification et la cytoprotection, sur le métabolisme de la vitamine D₃, et sur l'expression d'un récepteur nucléaire jouant un rôle majeur dans la biotransformation. Nos résultats montrent que l'influence de la diète carencée en vitamine D et en calcium se reflète fortement sur l'expression des cytochromes hépatiques impliqués dans la détoxification et la cytoprotection. Bien qu'un effet du génotype ait été souvent présent chez les animaux nourris à la diète normale, les animaux VDR^{-/-} se sont montrés moins sensibles aux traitements que les animaux VDR^{+/+} carencés. D'une façon générale, nos résultats semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle le système de la vitamine D est un élément clé de la fonction de détoxification et de cytoprotection du foie dont la dysfonction est susceptible d'accroître la sensibilité de l'organisme aux effets nocifs de certains xénobiotiques ou endobiotiques. Toutefois, l'élément clé du système de la vitamine D dans ce processus serait plutôt le statut hormonal en D que la présence fonctionnelle du récepteur à la vitamine D. En effet, la carence semble accroître la vulnérabilité aux agents toxiques et provoque des dérèglements dans l'expression des enzymes impliquées dans la biotransformation, laissant entrevoir des problèmes liés au métabolisme des médicaments. Nous avons proposé que l'explication de ce phénomène pourrait résider dans une compétition du VDR et du PXR pour la liaison aux éléments de réponse des gènes cibles et, possiblement, pour l'hétérodimérisation avec le RXR. À l'opposé, la non-fonctionnalité du récepteur à la vitamine D semble avoir un impact mineur sur ces mécanismes. De même, nos résultats ne supportent pas le rôle de médiateur des acides biliaires du VDR hépatique. L'ensemble de ces résultats permet de mieux comprendre l'importance du système endocrinien de la vitamine D sur les fonctions de détoxification et de cytoprotection du foie. Notre contribution à l'analyse des perturbations métaboliques engendrées par la carence en vitamine D permettra peut-être une meilleure compréhension de ses conséquences chez les personnes atteintes.

Les fortes inductions observées dans l'expression génique du *CYP3A11* et du *CYP2B10* de même que le faible niveau d'expression basale du *CYP2B10* chez les animaux VDR^{+/+} carencés en vitamine D peuvent être considérées comme des indicateurs d'une hypersensibilité aux effets nocifs des produits évalués. Étendus à l'humain, ces résultats permettent de croire que les patients souffrant d'hypovitaminose D auront une capacité de biotransformation altérée. À l'état basal, on peut entrevoir une diminution de l'efficacité de biotransformation causée par une expression anormalement basse de *CYP2B10*. En cas de prise de plusieurs médicaments, les fortes inductions des CYPs que nous avons observées permettent d'appréhender d'importantes interactions entre les médicaments, notamment lorsque des substances inductrices sont administrées avec des médicaments normalement métabolisés par ces CYPs. En effet, les interactions associées à la prise simultanée de plusieurs médicaments et associées aux enzymes P450 sont parmi les plus importants facteurs à l'origine des graves effets secondaires chez l'homme (169). Parallèlement, l'interférence entre le PXR et le VDR illustre un des effets indésirables des xénobiotiques qui, en augmentant le métabolisme ou le catabolisme d'un composé endobiotique, comme la 1,25(OH)₂D₃, peuvent perturber le système endocrinien.

À l'opposé, les patients présentant un rachitisme résistant à la 1,25(OH)₂D₃, attribué à des mutations du gène du VDR causant son inactivation, seraient probablement moins affectés dans leurs capacités de biotransformation. De plus, nos résultats ne laissent pas entrevoir de conséquences négatives majeures de cet état sur la détoxification des acides biliaires par le foie. Cependant, comme il a été démontré que ce mécanisme de détoxification VDR-dépendant était fonctionnel dans l'intestin et dans le colon, ces patients seront probablement malgré tout enclins à souffrir de problèmes liés à l'accumulation d'acides biliaires secondaires toxiques, allant de la cholestase hépatique au cancer du colon.

V.- RÉFÉRENCES

- 1) **Piñeiro-Carrero V.M., Piñeiro E.O.**, Liver. *Pediatrics*. 113(4 Suppl):1097-1106 (2004).
- 2) **Olson E.B. Jr., Knutson J.C., Bhattacharyya M.H., DeLuca H.F.**, The effect of hepatectomy on the synthesis of 25-hydroxyvitamin D₃. *J. Clin. Invest.* **57**: 1213-1220 (1976).
- 3) **Clements, M.R., L. Johnson, and D.R. Fraser.** A new mechanisms for induced vitamin D deficiency in calcium deprivation. *Nature* **325**: 62-65 (1987).
- 4) **Gascon-Barré, M.** Biliary excretion of 25-hydroxy-[³H]vitamin D₃ in the Gunn rat. *Clin.Sci.* **68**: 687-692 (1985).
- 5) **Gascon-Barré, M. and M. Gamache.** Contribution of the biliary pathway to the homeostasis of vitamin D₃ and of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* **129**: 2335-2344 (1991).
- 6) **Gascon-Barré, M. and P.M. Huet.** Role of the liver in the homeostasis of calciferol metabolism in the dog. *Endocrinology* **110**: 563-570, (1982).
- 7) **Kumar, R., S. Nagubandi, V.R. Mattox, and J. M. Londowski.** Enterohepatic physiology of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J.Clin.Invest.* **65**: 277-284 (1980).
- 8) **LeVan, L.W., H.K. Schnoes, and H.F. DeLuca.** Isolation and identification of 25-hydroxyvitamin D₂ 25-glucuronide: a biliary metabolite of vitamin D in the chick. *Biochemistry* **20**: 222-226 (1981).
- 9) **Gascon-Barré, M., S. Vallières, and P. M. Huet.** Uptake of the hormone 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by the dog liver. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **64**: 699-702 (1986).
- 10) **Blouin A., Bolender R.P. Et Weibel E.R.** Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol.* **72**(2):441-55 (1977).
- 11) **Jones A.L.**, Anatomy of the normal liver. In: *Hepatology: A textbook of liver disease.*, Zakim D., et Boyer T.D. (eds), W. B. Saunders Company, Philadelphia: 3-31 (1982).
- 12) **Hofmann A.F.** Bile acids. In: *The liver Biology and pathology* 2e édition. Arias I.M, Popper H, Shafritz D.A, Schachter D, Jakoby W.B, Raven Press, New York, USA, 553-572 (1988).

- 13) **Arias I.M, Popper H, Shafritz D.A, Schachter D, Jakoby W.B.** The liver Biology and pathology 2e édition. Raven Press, New York, USA, 551 (1988).
- 14) **Bouwens L., De Bleser P., Vanderkerken K., Geerts B., Wisse E.,** Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* **46**(1-3):155-6 (1992)
- 15) **A. Archambault, R. Beaudry, P. Paré, A.B.R. Thomson et E.A. Shaffer.** Principes fondamentaux de gastro-entérologie : États pathologiques et démarches thérapeutiques (3^e Edition). Association canadienne de gastro-entérologie, Edmonton (1997).
- 16) **DeLuca H.F.** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* **80**(6 Suppl):1689S-96S (2004).
- 17) **DeLuca H.F.** New concepts of vitamin D functions. *Ann N Y Acad Sci.* **669**:59-68 (1992).
- 18) **Garabedian M, Holick M.F, DeLuca H.F, Boyle I.T.** Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by the parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**:1673-6 (1972).
- 19) **Garabedian M, Tanaka Y, Holick M.F, DeLuca H.F.** Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in thyroparathyroidectomized rats. *Endocrinology* **94**:1022-7 (1974).
- 20) **Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T.** Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* **88**:259-66 (2002).
- 21) **Jones G, Strugnell S.A, DeLuca H.F.** Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* **78**:1193-231 (1998).
- 22) **Darwish H.M, DeLuca H.F.** Identification of a transcription factor that binds to the promoter region of the human parathyroid hormone gene. *Arch Biochem Biophys* **365**:123-30 (1999).
- 23) **Sebag M, Henderson J, Rhim J, Kremer R.** Relative resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in a keratinocyte model of tumor progression. *J. Biol. Chem.* **267**:12162-12167 (1992)
- 24) **Itin P.H, Pittelkow M, Kumar R.** Effects of vitamin D metabolites on proliferation and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes grown in serum-free or defined culture medium. *Endocrinology* **135**:1793-1798 (1994)

- 25) **Colston K.W., Chander S.K., Mackay A.G. et al.** Effects of synthetic vitamin D analogues on breast cancer cell proliferation in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **44**(4): 693-702 (1992).
- 26) **McGuire T.F., Trump D.L. and Johnson C.S.** Vitamin D₃-induced apoptosis of murine squamous cell carcinoma cells: selective induction of caspase-dependent MEK cleavage and up-regulation of MEKK-1. *J. Biol. Chem.* **276**(28): 26365-73. (2001).
- 27) **Frappart L, Falette N, Lefebvre M.F. et al.** In vitro study of effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the morphology of human breast cancer cell line B.T. 20. *Differentiation* **40**(1): 63-9 (1989).
- 28) **Shabahang M, Buras R.R, Davoodi F et al.** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. *Cancer Res.* **53**(16): 3712-8. (1993).
- 29) **Wang Q.W, Jones J.B and Studzinski G.P.** Cyclin-dependent kinase Inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in HL60 cells. *Cancer Res.* **56**(2): 264-7 (1996).
- 30) **Liu M, Lee M.H, Cohen M. et al.** Transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Devel.* **10**(2): 142-153 (1996).
- 31) **Adorini L, Penna G, Giarratana N, Uskokovic M.** Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *J Cell Biochem.* **88**(2): 227-33 (2003).
- 32) **Ovesen L., Brot C., Jakobsen J., Food** contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with? *Ann Nutr Metab.* **47**(3-4):107-13.(2003).
- 33) **MacLaughlin J.A, Anderson R.R, Holick M.F.** Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. *Science.* **216**(4549): 1001-3 (1982).
- 34) **Hanewald, K.H., Rappoldt M.P., and Roborgh J.R.** The antirachitic activity of previtamin D₃. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas Belg.* **80** : 1063-1069, (1961).

- 35) **Theodoropoulos C., Demers C., Petit J.L., Gascon-Barre M.** High sensitivity of rat hepatic vitamin D₃-25 hydroxylase CYP27A1 to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ administration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**(1) : E138-147, (2003).
- 36) **Gascon-Barre M, Elbaz H, Therrien-Ferland D.** Sequestration and microsomal C-25 hydroxylation of [3H]-vitamin D₃ by the rat liver. *Metabolism* **34**(3): 244-50 (1985).
- 37) **Bjorkhem, I, and Holmberg I.** Assay and properties of a mitochondrial 25-hydroxylase active on vitamin D₃. *J Biol Chem* **253**: 842-849 (1978).
- 38) **Holick M.F.** The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *J. Invest. Dermat.* **77**(1) : 51-58, (1981).
- 39) **Bjorkhem I.** Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver. In: *Sterols and Bile Acids*, edited by Danielsson H, and Sjovall J. Elsevier Science, 231-278 (1985).
- 40) **Araya Z, Tang W, Wikvall K.** Hormonal regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene CYP27A1. *Biochem J.* **372**(Pt 2):529-34 (2003).
- 41) **Twisk, J, De Wit E.C.M, and Princen H.M.G** Suppression of sterol 27-hydroxylase mRNA and transcriptional activity by bile acids in cultured rat hepatocytes. *Biochem J* **305**: 505-511, (1995).
- 42) **Vlahcevic, Z.R, Jairath S.K, Heuman D.M, Stravitz R.T, Hylemon P.B, Avadhani N.G, and Pandak W.M.** Transcriptional regulation of hepatic sterol 27-hydroxylase by bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **270**: G646-G652 (1996).
- 43) **Hosseinpour F, Wikvall K.** Porcine microsomal vitamin D₃ 25-hydroxylase (CYP27A1). Catalytic properties, tissue distribution, and comparison with human CYP27A1. *J Biol Chem* **275**: 34650-34655 (2000).
- 44) **Cheng J.B, Motola D.L, Mangelsdorf D.J, Russell D.W.** De-orphanization of cytochrome P450 27A1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem* **278**(39):38084-93 (2003).
- 45) **Nelson D.R.** Comparison of P450s from human and fugu : 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys* **409**: 18-24 (2003).

- 46) **Cheng J.B, Motola D.L, Mangelsdorf D.J, Russell D.W.** De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem* 278(39): 38084-93 (2003).
- 47) **Rahmaniyan M, Patrick K, Bell N.H.** Characterization of recombinant CYP2C11: a vitamin D 25-hydroxylase and 24-hydroxylase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288 (4): E753-60 (2005).
- 48) **Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart P.M.** 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol.* 25(2):141-8 (2000).
- 49) **Portale A.A, Miller W.L.** Human 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase: cloning, mutations, and gene expression. *Pediatr Nephrol.* 14(7): 620-5 (2000).
- 50) **Omdahl J.L, Morris H.A, May B.K.** Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr.* 22:139-66 (2002).
- 51) **Chesney R.W, Hamstra A.J, Mazess R.B, DeLuca H.F, O'Reagan S.** Reduction of serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in children receiving glucocorticoids. *Lancet* 2: 1123-1125 (1978).
- 52) **Horst R.L, Littledike E.T, Gray R.W, Napoli J.L.** Impaired 24,25-dihydroxyvitamin D production in anephric human and pig. *J Clin Invest.* 67(1):274-80 (1981).
- 53) **Armbrecht H.J, Wongsurawat N, Zenser T.V, Davis B.B.** Effect of PTH and 1,25(OH)₂D₃ on renal 25(OH)D₃ metabolism, adenylate cyclase, and protein kinase. *Am J Physiol.* 246(1 Pt 1): E102-7 (1984).
- 54) **Bordier P, Rasmussen H, Marie P, Miravet L, Gueris J, Ryckwaert A.** Vitamin D metabolites and bone mineralization in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 46(2):284-94 (1978).
- 55) **Ornoy A, Goodwin D, Noff D, Edelstein S.** 24, 25-dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation. *Nature.* 276(5687): 517-9 (1978).
- 56) **Canterbury J.M, Lerman S, Claflin A.J, Henry H, Norman A, Reiss E.** Inhibition of parathyroid hormone secretion by 25-hydroxycholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol in the dog. *J Clin Invest.* 61(5):1375-83 (1978).

- 57) **Henry H.L., Norman A.W.** Vitamin D: two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability. *Science*. **201**(4358): 835-7 (1978).
- 58) **Holick M.F** Vitamin D requirements for humans of all ages: new increased requirements for women and men 50 years and older. *Osteoporos Int* **8**(Suppl 2):S24–S29 (1998).
- 59) **Meunier P.J., Chapuy MC.**, Vitamine D insufficiency in adults and the Elderly. In: *Vitamin D* 2e édition. Feldman D., Pike J.W., Glorieux F.H. (eds), Elsevier Academic Press, USA, 1085-1100 (2005).
- 60) **Peacock M, Selby P.L, Francis R.M, Brown W.B, Hordon L.** Vitamin D deficiency, insufficiency, sufficiency and intoxication. What do they mean? In: *Sixth Workshop on Vitamin D*. Norman A, Schaefer K, Grigolett M.G, Herrath D.V. (eds), De Gruyter, Berlin and New York, 569-570 (1985).
- 61) **Webb A.R, Pilbeam C, Hanafin N, Holick M.F** An evaluation of the relative contributions of exposure to sunlight and of diet to the circulating concentrations of 25-hydroxyvitamin D in an elderly nursing home population in Boston. *Am J Clin Nutr* **51**:1075–1081 (1990).
- 62) **Matsuoka LY, Wortsman J, Dannenberg M.J, Hollis B.W, Lu Z, Holick M.F** Clothing prevents ultraviolet-B radiation-dependent photosynthesis of vitamin D₃. *J Clin Endocrinol Metab* **75**:1099–1103 (1992).
- 63) **Dawson-Hughes B.** Racial/ethnic considerations in making recommendations for vitamin D for adult and elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* **80**(6 Suppl): 1763S-6S (2004).
- 64) **Need A.G, Morris H.A, Horowitz M, Nordin C.** Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Clin Nutr.* **58**(6):882-5 (1993).
- 65) **Harris S.S, Dawson-Hughes B, Perrone G.A.** Plasma 25-hydroxyvitamin D responses of younger and older men to three weeks of supplementation with 1800 IU/day of vitamin D. *J Am Coll Nutr.* **18**(5):470-4 (1999).

- 66) **Pattanaungkul S, Riggs B.L, Yergey A.L, Vieira N.E, O'Fallon W.M, Khosla S.** Relationship of intestinal calcium absorption to 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] levels in young versus elderly women: evidence for age-related intestinal resistance to 1,25(OH)₂D action. *J Clin Endocrinol Metab.* **85**(11):4023-7 (2000).
- 67) **Brodie M.J, Boobis A.R, Hillyard C.J, Abeyasekera G, Stevenson J.C, MacIntyre I, Park B.K.** Effect of rifampicin and isoniazid on vitamin D metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* **32**(4): 525-30 (1982).
- 68) **Makishima M, Lu T.T, Xie W, Whitfield G.K, Domoto H, Evans R.M, Haussler MR, Mangelsdorf D.J.** Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* **296**(5571):1313-6 (2002)
- 69) **Kamei Y, Kawada T, Fukuwatari T, Ono T, Kato S, Sugimoto E.** Cloning and sequencing of the gene encoding the mouse vitamin D receptor. *Gene.* **152**(2):281-2 (1995).
- 70) **Pike J.W., Shevde N.K.,** The vitamin D receptor. In: *Vitamin D* 2e édition. Feldman D., Pike J.W., Glorieux F.H. (eds), Elsevier Academic Press, USA, 167-191 (2005).
- 71) **Gascon-Barré M., Demers C., Mirshahi A., Néron S., Zalzal S., Nanci A.** The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells. *Hepatology.* **37**(5): 1034-42 (2003).
- 72) **Baran D.T, Milne M.L.** 1,25 dihydroxyvitamin D-induced inhibition of 3H-25 hydroxyvitamin D production by the rachitic rat liver in vitro. *Calcif Tissue Int.* **35**(4-5):461-4 (1983).
- 73) **Bell N.H, Shaw S, Turner RT.** Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D in man. *J Clin Invest.* **74**(4):1540-4 (1984).
- 74) **Ethier C, Kestekian R, Beaulieu C, Dube C, Havrankova J, Gascon-Barre M.** Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology.* **126**(6):2947-59 (1990).

- 75) **Goupil D, Ethier C, Zarnegar R, Gascon-Barre M.** Hepatic expression of regeneration marker genes following partial hepatectomy in the rat. Influence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in hypocalcemia. *J Hepatol.* **26**(3):659-68 (1997).
- 76) **Rixon R.H, Isaacs R.J, Whitfield J.F.** Control of DNA polymerase-alpha activity in regenerating rat liver by calcium and 1 alpha,25(OH)₂D₃. *J Cell Physiol.* **139**(2):354-60 (1989).
- 77) **Sikorska M, Whitefield J.F, Rixon R.H.** The effects of thyroparathyroidectomy and 1,25 dihydroxyvitamin D₃ on changes in the activities of some cytoplasmic and nuclear protein kinases during liver regeneration. *J Cell Physiol.* **115**(3):297-304 (1983).
- 78) **Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Klaholz B, Moras D.** The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* **5**:13-179 (2000).
- 79) **Watkins R.E, Wisely G.B, Moore L.B, Collins J.L, Lambert M.H, Williams S.P, Willson T.M, Kliewer S.A, Redinbo M.R.** The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science* **292**:2329-2333 (2001).
- 80) **Issa L.L, Leong G.M, Eisman J.A.** Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res.* **47**(12):451-75 (1998).
- 81) **Maeda Y, Rachez C, Hawel L 3rd, Byus C.V, Freedman LP, Sladek F.M.** Polyamines modulate the interaction between nuclear receptors and vitamin D receptor-interacting protein 205. *Mol Endocrinol.* **16**(7):1502-10 (2002).
- 82) **Vaisanen S, Perakyla M, Karkkainen J.I, Steinmeyer A, Carlberg C.** Critical role of helix 12 of the vitamin D(3) receptor for the partial agonism of carboxylic ester antagonists. *J Mol Biol.* **315**(2):229-38 (2002).
- 83) **Shaffer P.L, McDonnell D.P, Gewirth D.T.** Characterization of transcriptional activation and DNA-binding functions in the hinge region of the vitamin D receptor. *Biochemistry.* **44**(7):2678-85 (2005).
- 84) **Christakos S, Raval-Pandya M, Wernyj R.P, Yang W.** Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J.* **316** (Pt 2):361-71 (1996). Erratum in: *Biochem J* **318** (Pt 3):1079 (1996).

- 85) **Thompson P.D, Jurutka P.W, Whitfield G.K, Myskowski S.M, Eichhorst K.R, Dominguez C.E, Haussler C.A, Haussler M.R.** Liganded VDR induces CYP3A4 in small intestinal and colon cancer cells via DR3 and ER6 vitamin D responsive elements. *Biochem Biophys Res Commun.* **299(5):730-8** (2002).
- 86) **Davies M, Heys S.E, Selby P.L, Berry J.L, Mawer E.B.** Increased catabolism of 25-hydroxyvitamin D in patients with partial gastrectomy and elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels. Implications for metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab.* **82(1): 209-12** (1997).
- 87) **Malloy P.J, Pike J.W, Feldman D.** The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr Rev.* **20(2): 156-88** (1999).
- 88) **Malloy P.J, Xu R, Peng L, Peleg S, Al-Ashwal A, Feldman D.** Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D Resistant Rickets due to a Mutation Causing Multiple Defects in Vitamin D Receptor Function. *Endocrinology* **145 (11) 5106-5114** (2004).
- 89) **Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, Demay MB.** 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 (18) 9831-5,** (1997).
- 90) **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, Kato S.** Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* **16(4):391-6** (1996).
- 91) **Van Cromphaut S.J, Dewerchin M, Hoenderop J.G, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels R.J, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G.** Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98(23):13324-9** (2001).
- 92) **Blakeborough M.H, Owen RW, Bilton R.F.** Free radical generating mechanisms in the colon: their role in the induction and promotion of colorectal cancer? *Free Radic Res Commun.* **6(6):359-67** (1989).

- 93) **Hofmann A.F.** The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med.* **159**(22):2647-58 (1999).
- 94) **Hofmann A.F.** Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci.* **14**:24-29 (1999).
- 95) **Russell D.W.** The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* **72**: 137-74 (2003).
- 96) **Hofmann A.F.** The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med.* **159**(22): 2647-58 (1999).
- 97) **Carey MaD, WC.** Enterohepatic circulation. In: *The liver: Biology and Pathobiology*, 3e édition. Arias I.M. B.J, Fausto N, Jakoby W.B, Schachter D.A, Sharfritz D.A. (eds), Raven Press, New York, 719-768 (1994).
- 98) **Pandak W.M, Ren S, Marques D, Hall E, Redford K, Mallonee D, Bohdan P, Heuman D, Gil G, Hylemon P.** Transport of cholesterol into mitochondria is rate-limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes. *J Biol Chem.* **277**(50):48158-64 (2002).
- 99) **Chiang J.Y.** Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci.* **3**:d176-93 (1998).
- 100) **Ogawa A, Murate T, Suzuki M, Nimura Y, Yoshida S.** Lithocholic acid, a putative tumor promoter, inhibits mammalian DNA polymerase beta. *Jpn J Cancer Res.* **89**(11): 1154-9 (1998).
- 101) **Yu J, Lo J.L, Huang L, Zhao A, Metzger E, Adams A, Meinke P.T, Wright SD, Cui J.** Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J Biol Chem.* **277**(35):31441-7 (2002).
- 102) **Fischer S, Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Koebe HG.** Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. *Clin Chim Acta.* **251**(2):173-86 (1996).
- 103) **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, Kliewer S.A.** The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**(6): 3369-74 (2001).

- 104) **Kliewer S.A, Moore J.T, Wade L, Staudinger J.L, Watson M.A, Jones S.A, McKee D.D, Oliver B.B, Willson T.M, Zetterström R.H, Perlmann T, Lehmann J.M.** An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* **92**: 73–82 (1998).
- 105) **Kliewer S.A, Goodwin B, Willson T.M.** The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev.* **23**(5): 687-702 (2002).
- 106) **Plass J.R, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber K.N, Jansen P.L, Muller M.** Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology.* **35**(3):589-96 (2002).
- 107) **Barbier O, Torra I.P, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Duran-Sandoval D, Kuipers F, Kosykh V, Fruchart .JC, Staels B.** FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* **124**(7): 1926-40 (2003).
- 108) **Pircher P.C, Kitto J.L, Petrowski M.L, Tangirala R.K, Bischoff E.D, Schulman I.G, Westin S.K.** Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J. Biol. Chem.* **278**(30): 27703-11 (2003).
- 109) **Saini S.P, Sonoda J, Xu L, Toma D, Uppal H, Mu Y, Ren S, Moore D.D, Evans R.M, Xie W.** A novel constitutive androstane receptor-mediated and CYP3A-independent pathway of bile acid detoxification. *Mol Pharmacol.* **65**(2):292-300 (2004).
- 110) **Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, Waxman DJ, Evans RM.** An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**(6):3375-80 (2001).
- 111) **Thummel K.E, Brimer C, Yasuda K, Thottassery J, Senn T, Lin Y, Ishizuka H, Kharasch E, Schuetz J, Schuetz E.** Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃. *Mol Pharmacol.* **60**(6):1399-406 (2001).

- 112) **Schmiedlin-Ren P, Thummel K.E, Fisher J.M, Paine M.F, Watkins P.B.** Induction of CYP3A4 by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is human cell line-specific and is unlikely to involve pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos.* **29**(11):1446-53 (2001).
- 113) **Rochel N, Wurtz J.M, Mitscher A, Klaholz B, Moras D.** The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell.* **5**: 173-179 (2000).
- 114) **Watkins R.E, Wisely G.B, Moore L.B, Collins J.L, Lambert M.H, Williams S.P, Willson T.M, Kliewer S.A, Redindo M.R.** The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science* **292**: 2329-2333 (2001).
- 115) **Pascussi J.M., Gerbal-Chaloin S., Drocourt L., Maurel P., Vilarem M.J.** The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta.* **1619**(3):243-53 (2003).
- 116) **Wang H., Faucette S., Sueyoshi T., Moore R., Ferguson S., Negishi M., LeCluyse E.L.,** A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. *J Biol Chem.* **278**(16):14146-52 (2003).
- 117) **Schuetz E.G, Schuetz J.D, Grogan W.M, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Raucy J, Guzelian P, Gionela K, Watlington C.O.** Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys.* **294**(1):206-14 (1992).
- 118) **Debri K, Boobis A.R, Davies D.S, Edwards R.J.** Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol.* **50**(12):2047-56 (1995).
- 119) **Wang H, Kawashima H, Strobel H.W.** cDNA cloning of a novel CYP3A from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **221**(1):157-62 (1996).
- 120) **Mahnke A, Roos P.H, Hanstein W.G, Chabot G.G.** In vivo induction of cytochrome P450 CYP3A expression in rat leukocytes using various inducers. *Biochem Pharmacol.* **51**(11):1579-82 (1996).

- 121) **Bhagwat S.V, Mullick J, Raza H, Avadhani N.G.** Constitutive and inducible cytochromes P450 in rat lung mitochondria: xenobiotic induction, relative abundance, and catalytic properties. *Toxicol Appl Pharmacol.* **156(3):**231-40 (1999).
- 122) **Warrington J.S, Greenblatt D.J, von Moltke L.L.** Age-related differences in CYP3A expression and activity in the rat liver, intestine, and kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* **309(2):**720-9 (2004).
- 123) **Jan Y.H, Mishin V, Busch C.M, Thomas P.E.** Generation of specific antibodies and their use to characterize sex differences in four rat P450 3A enzymes following vehicle and pregnenolone 16 α -carbonitrile treatment. *Arch Biochem Biophys.* **446(2):**101-10 (2006).
- 124) **Nagata K, Murayama N, Miyata M, Shimada M, Urahashi A, Yamazoe Y, Kato R.** Isolation and characterization of a new rat P450 (CYP3A18) cDNA encoding P450(6) β -2 catalyzing testosterone 6 β - and 16 α -hydroxylations. *Pharmacogenetics.* **6(1):**103-11 (1996).
- 125) **Mahnke A, Strotkamp D, Roos P.H, Hanstein W.G, Chabot G.G, Nef P.** Expression and inducibility of cytochrome P450 3A9 (CYP3A9) and other members of the CYP3A subfamily in rat liver. *Arch Biochem Biophys.* **337(1):**62-8 (1997).
- 126) **Wang H, Strobel H.W.** Regulation of CYP3A9 gene expression by estrogen and catalytic studies using cytochrome P450 3A9 expressed in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* **344(2):**365-72 (1997).
- 127) **Cooper K.O, Reik L.M, Jayyosi Z, Bandiera S, Kelley M, Ryan D.E, Daniel R, McCluskey S.A, Levin W, Thomas P.E.** Regulation of two members of the steroid-inducible cytochrome P450 subfamily (3A) in rats. *Arch Biochem Biophys.* **301(2):**345-54 (1993).
- 128) **Bertz R.J. and Granneman G.R.** Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin. Pharmacokinet.* **32(3):** 210–258 (1997).

- 129) **Gibson G.G, Plant N.J, Swales K.E, Ayrton A, El-Sankary W.** Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica*. **32**(3):165-206 (2002).
- 130) **Nelson D.R, Kamataki T, Waxman D.J, Guengerich F.P, Estabrook R.W, Feyereisen R, Gonzalez F.J, Coon M.J, Gunsalus I.C, Gotoh O, et al.** The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*. **12**(1):1-51 (1993).
- 131) **Honkakoski P, Negishi M.** Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*. **347**(Pt 2): 321-37 (2000).
- 132) **Drocourt L., Ourlin J.C., Pascussi J.M., Maurel P., 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):25125-32 (2002).
- 133) **Elizondo G., Medina-Diaz I.M.,** Induction of CYP3A4 by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in HepG2 cells. *Life Sci*. **73**(2):141-9 (2003).
- 134) **Gervot L, Rochat B, Gautier J.C, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V, Martin H, Beaune P, de Waziers I.** Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics*. **9**(3):295-306 (1999).
- 135) **Miksys S, Lerman C, Shields P.G, Mash D.C, Tyndale R.F.** Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology*. **45**(1):122-32 (2003).
- 136) **Yengi L.G, Xiang Q, Pan J, Scatina J, Kao J, Ball S.E, Fruncillo R, Ferron G, Roland Wolf C.** Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal Biochem*. **316**(1):103-10 (2003).
- 137) **Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock M.L, Fackenthal JD, Rogan P.K, Ring B, Wrighton S.A, Schuetz E.G.** Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol Exp Ther*. **307**(3):906-22 (2003).

- 138) **Goodwin, B., Moore, L. B., Stoltz, C. M., McKee, D. D., and Kliewer, S. A.** Regulation of the Human *CYP2B6* Gene by the Nuclear Pregnane X Receptor. *Mol. Pharmacol.* **60**: 427-431 (2001).
- 139) **Pascussi J.M, Gerbal-Chaloin S, Fabre J.M, Maurel P, Vilarem M.J.** Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol.* **58**(6):1441-50 (2000).
- 140) **LeCluyse EL.** Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci.* **13**(4):343-68 (2001).
- 141) **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 Dev.* **14**: 3014-3023 (2000).
- 142) **Wang H., Negishi M.,** Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors. *Curr Drug Metab.* **4**(6):515-25 (2003).
- 143) **Wang H, Faucette S.R, Gilbert D, Jolley S.L, Sueyoshi T, Negishi M, LeCluyse E.L.** Glucocorticoid receptor enhancement of pregnane X receptor-mediated CYP2B6 regulation in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* **31**(5):620-30 (2003).
- 144) **Schuetz E.G, Schmid W, Schutz G, Brimer C, Yasuda K, Kamataki T, Bornheim L, Myles K and Cole T.J.** The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver. *Drug Metab Dispos* **28**: 268-278 (2000).
- 145) **Tache Y, Tache J, Mecs I, Du Ruisseau P, Selye H.** Regulation of resistance to various toxicants by PCN (pregnenolone-16alpha-carbonitrile) and thyroxine. *J Med.* **7**(6):471-9 (1976).
- 146) **Gonzalez F.J, Nebert D.W, Hardwick J.P, Kasper C.B.** Complete cDNA and protein sequence of a pregnenolone 16 alpha-carbonitrile-induced cytochrome P-450. A representative of a new gene family. *J Biol Chem.* **260**(12):7435-41 (1985).

- 147) **Staudinger J., Liu Y., Madan A., Habeebu S., and Klaassen C.D.,** Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor. *Drug Metab. Dispos.* **29**(11):1467-72 (2001).
- 148) **Li YC, Amling M, Pirro A.E, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, 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):4391-6 (1998).
- 149) **Ethier C., Kestekian R., Beaulieu C., Dube C., Havrankova J., Gascon-Barre M.** Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. *Endocrinology.* **126** (6) : 2947-59, 1990.
- 150) **Guroff G, DeLuca H.F, Steenbock H.** Citrate and action of vitamin D on calcium and phosphorus metabolism. *Am J Physiol* **204**: 833-6 (1963).
- 151) **Lemay J., Demers C., Hendy GN., Delvin E.E., Gascon-Barre M..** Expression of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene in rat intestine: response to calcium, vitamin D₃ and calcitriol administration in vivo. *J Bone Miner Res.* **10**(8): 1148-57 (1995).
- 152) **Demers C., Lemay J., Hendy GN., Gascon-Barre M.,** Comparative in vivo expression of the calcitriol-24-hydroxylase gene in kidney and intestine. *J Mol Endocrinol..* **18**(1): 37-48 (1997).
- 153) **Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J.** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* **18**(24) : 5294-5299 (1979).
- 154) **Tamasi,V., Fulop,A.K., Hegyi,K., Monostory,K. and Falus,A.** Upregulation of CYP2e1 and CYP3a activities in histamine-deficient histidine decarboxylase gene targeted mice. *Cell Biol. Int.* **27** (12), 1011-1015 (2003).
- 155) **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).

- 156) Saito, S., Iida, A., Sekine, A., Kawauchi, S., Higuchi, S., Ogawa, C. and Nakamura, Y. Catalog of 680 variations among eight cytochromes P450 (CYP) genes, nine esterase genes, and two other genes in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* **48** (5), 249-270 (2003).
- 157) Lehmann, J.M., McKee, D.D., Watson, M.A., Willson, 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** (5), 1016-1023 (1998).
- 158) Provencher SJ, Demers C, Bastien MC, Villeneuve JP, Gascon-Barre M., Effect of cyclosporine A on cytochrome P-450-mediated drug metabolism in the partially hepatectomized rat. *Drug Metab Dispos.* **27**(4): 449-55 (1999).
- 159) Lehmann J.M, McKee D.D, Watson M.A, Willson T.M, Moore J.T, 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).
- 160) Jarukamjorn K, Sakuma T, Yamamoto M, Ohara A, Nemoto N. Sex-associated expression of mouse hepatic and renal CYP2B enzymes by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol.* **62**(2):161-9 (2001).
- 161) Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem.* **274**(10):6043-6 (1999).
- 162) Pascussi J.M, Robert A, Nguyen M, Walrant-Debray O, Garabedian M, Martin P, Pineau T, Saric J, Navarro F, Maurel P, Vilarem M.J. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest.* **115**(1): 177-86 (2005).
- 163) Sandgren M.E, Bronnegard M, DeLuca H.F. Tissue distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the male rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 611-616 (1991).
- 164) McCarthy T.C, Li X, Sinal C.J. Vitamin D receptor-dependent regulation of colon multidrug resistance-associated protein 3 gene expression by bile acids. *Biol. Chem.* **280**(24): 23232-42 (2005).

- 165) **Schmiedlin-Ren P, Thummel K.E, Fisher J.M, Paine M.F, Lown K.S, Watkins P.B.** Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Pharmacol.* **51**(5): 741-54 (1997).
- 166) **Thummel K.E, Brimer C, Yasuda K, Thottassery J, Senn T, Lin Y, Ishizuka H, Kharasch E, Schuetz J, Schuetz E.** Transcriptional control of intestinal cytochrome P-4503A by 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3. *Mol Pharmacol.* **60**(6): 1399-406 (2001).
- 167) **Elizondo G, Medina-Diaz I.M.** Induction of CYP3A4 by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in HepG2 cells. *Life Sci.* **73**(2): 141-9 (2003).
- 168) **Li X.Y, Boudjelal M, Xiao J.H, Peng Z.H, Asuru A, Kang S, Fisher G.J, Voorhees J.J.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases nuclear vitamin D3 receptors by blocking ubiquitin/proteasome-mediated degradation in human skin. *Mol Endocrinol.* **13**(10): 1686-94 (1999).
- 169) **Guengerich F.P.** Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv Pharmacol.* **43**: 7-35 (1997).