

Université de Montréal

Expression de la protéine Gas6 chez le rat Sprague-Dawley : effet de l'apport  
alimentaire de vitamine K à différents âges

par

Marie-Eve Lavoie

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en Nutrition

Août 2005

© Marie-Eve Lavoie, 2005



QU

145

U58

2006

V. 001

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Expression de la protéine Gas6 chez le rat Sprague-Dawley : effet de l'apport  
alimentaire de vitamine K à différents âges

présenté par

Marie-Eve Lavoie

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guylaine Bouchard

Président-rapporteur

Dr Guylaine Ferland

Directeur de recherche

Dr Victor Gavino

Membre du jury

## SOMMAIRE

D'abord connue pour son rôle dans la coagulation sanguine, la vitamine K participe à une réaction de  $\gamma$ -carboxylation, essentielle à l'activation biologique d'une famille de protéines, dont la protéine Gas6. Récemment découverte, cette dernière est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Toutefois, peu de travaux ont étudié cette protéine au cours du vieillissement de même que l'influence de la vitamine K sur son action. Considérant cela, cette étude avait pour but de déterminer l'effet modulateur de la vitamine K sur la carboxylation de la protéine Gas6 à différentes périodes de la vie. La protéine Gas6 a été étudiée chez des rates âgées de 6 et 22 mois ayant reçu un apport alimentaire variable de phylloquinone. L'analyse par immunobuvardage a montré que les formes carboxylée et totale de la protéine sont présentes dans tous les tissus étudiés. Les résultats obtenus ont également montré une corrélation positive entre les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 et les concentrations de vitamine K tissulaire, et plus particulièrement de MK-4. En revanche, l'âge n'influence pas les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine en fonction des concentrations tissulaires de vitamine K. En conclusion, les apports alimentaires en vitamine K modulent l'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6.

Mots-clés : vitamine K, Gas6, MK-4, diète, phylloquinone, carboxylation, vieillissement

## SUMMARY

Historically known for its role in blood coagulation, vitamin K also participates in the vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation reaction which is essential for the biological activation of a family of proteins, which include Gas6. Gas6 has been implicated in the regulation of the cell cycle. However, the expression of Gas6 protein during aging and the influence of vitamin K on its action have been poorly investigated. The aim of this study was to determine the modulatory effect of vitamin K on the carboxylation of Gas6 protein at different stages of life. Six and 22 months old female Sprague-Dawley rats were fed diets containing variable levels of phylloquinone. Western blotting analysis showed that both the non-carboxylated and the carboxylated forms of Gas6 protein are expressed in all tested tissues. The expression levels of the carboxylated form of Gas6 positively correlated with the tissue concentrations of vitamin K, particularly with MK-4. However, the expression levels of the carboxylated form of the protein as a function of tissue concentrations of vitamin K are not affected by age. In conclusion, vitamin K intake modulates the expression of the carboxylated form of Gas6 protein.

Key words : Vitamin K, Gas6, MK-4, diet, phylloquinone, carboxylation, aging

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	iii
SUMMARY .....	iv
LISTE DES TABLEAUX .....	ix
LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xii
REMERCIEMENTS .....	xiv
I. INTRODUCTION .....	1
II. REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE.....	3
1. LA VITAMINE K .....	3
1.1 FORMES MOLÉCULAIRES.....	3
1.2 SOURCES ALIMENTAIRES .....	5
1.3 MÉTABOLISME.....	6
1.3.1 Absorption .....	6
1.3.2 Transport plasmatique .....	7
1.3.3 Distribution tissulaire.....	8
1.3.4 Facteurs affectant la concentration tissulaire de la vitamine K .....	9
1.3.5 Excrétion de la vitamine .....	10
1.4 RECOMMANDATIONS NUTRITIONNELLES .....	10
1.5 CARENCE DE VITAMINE K.....	11
1.6 RÔLE DE LA VITAMINE .....	12
1.7 PROTÉINES DÉPENDANTES DE LA VITAMINE K .....	14

1.7.1 Protéines impliquées dans l'hémostase .....	15
1.7.2 Protéines impliquées dans le métabolisme osseux .....	15
1.7.3 Protéine impliquée dans l'homéostasie calcique .....	17
1.7.4 Protéine impliquée dans la régulation cellulaire .....	18
1.7.5 Autres protéines dépendantes de la vitamine K .....	19
2. LA PROTÉINE GAS6.....	19
2.1 STRUCTURE MOLÉCULAIRE.....	20
2.2 FORME ÉPISSÉE DE LA PROTÉINE GAS6 .....	21
2.3 DISTRIBUTION TISSULAIRE.....	22
2.4 FACTEUR AFFECTANT LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE LA PROTÉINE GAS6 .....	24
2.5 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE GAS6 .....	25
2.5.1 Régulation du cycle cellulaire .....	26
2.5.1.1 Récepteurs tyrosine kinases.....	27
2.5.1.2 Voies de signalisation cellulaire .....	28
2.5.1.3 Prolifération cellulaire .....	29
2.5.1.4 Différenciation cellulaire.....	30
2.5.1.5 Survie cellulaire.....	31
2.5.2 Fonctions cellulaires .....	33
2.5.2.1 Fonction plaquettaire .....	33
2.5.2.2 Fonction osseuse.....	34
2.5.2.3 Vision .....	35
3. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIF .....	37

3.1 PROBLÉMATIQUE.....	37
3.2 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE .....	38
3.3 OBJECTIF DE L'ÉTUDE.....	38
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	39
1. ANIMAUX ET DIÈTES .....	39
2. ANALYSES DE LA VITAMINE K.....	40
3. EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 PAR IMMUNOBUVARDAGE.....	42
4. ANALYSES STATISTIQUES .....	48
IV. RÉSULTATS .....	50
1. CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE PHYLLOQUINONE (K <sub>1</sub> ), DE MÉNAQUINONE-4 (MK-4) ET DE VITAMINE K TOTALE.....	50
2. EXPRESSION TISSULAIRE DES FORMES TOTALE ET CARBOXYLÉE DE LA PROTÉINE GAS6 .....	55
3. RELATION ENTRE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 CARBOXYLÉE ET LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE VITAMINE K .....	62
4. RELATION ENTRE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 TOTALE ET LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE LA VITAMINE K .....	69
V. DISCUSSION.....	73
1. CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE VITAMINE K .....	73
2. EXPRESSION TISSULAIRE DES FORMES CARBOXYLÉE ET TOTALE DE LA PROTÉINE GAS6 .....	75
3. RELATION ENTRE LES TAUX D'EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 CARBOXYLÉE ET LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE VITAMINE K .....	78

VI. CONCLUSION.....	82
VII. RÉFÉRENCES .....	83

**LISTE DES TABLEAUX**

- Tableau I      Composition des diètes (g/kg de diète).
- Tableau II     Corrélations, en échelle semi-logarithmique, entre les taux moyens d'expression de la protéine Gas6 carboxylée et les concentrations tissulaires de vitamine K totale, de ménaquinone-4 et de phylloquinone chez des rates âgées de 6 mois et 22 mois.

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 Structures chimiques de la phylloquinone, des ménaquinones et de la ménadione.
- Figure 2 Cycle de la vitamine K.
- Figure 3 Structure moléculaire de la protéine Gas6.
- Figure 4 Voies de signalisation cellulaire impliquées dans les activités biologiques de la protéine Gas6.
- Figure 5 Expression de la protéine Gas6 dans le poumon telle que détectée par l'anticorps anti-Gla.
- Figure 6 Expression de la protéine Gas6 telle que détectée par l'anticorps anti-Gla dans le coeur de rates âgées de 6 et 22 mois.
- Figure 7 Concentrations tissulaires de la vitamine K totale (phylloquinone + ménaquinone-4), de la ménaquinone-4 et de la phylloquinone dans les organes de rates âgées de 6 et 22 mois.
- Figure 8 Expression tissulaire de la forme totale, la forme carboxylée et du degré de carboxylation de la protéine Gas6 dans les organes de rates âgées de 6 mois.
- Figure 9 Expression tissulaire de la forme totale, la forme carboxylée et du degré de carboxylation de la protéine Gas6 dans les organes de rates âgées de 22 mois.

- Figure 10      Corrélations, en échelle semi-logarithmique, entre l'expression de la protéine Gas6 carboxylée et les concentrations tissulaires de vitamine K totale (A), de ménaquinone-4 (B) et de phylloquinone (C) chez des rates de 6 mois et 22 mois.
- Figure 11      Corrélations, en échelle semi-logarithmique, entre l'expression de la protéine Gas6 totale et les concentrations tissulaires de vitamine K totale (A), de ménaquinone-4 (B) et de phylloquinone (C) chez des rates de 6 mois et 22 mois.
- Figure 12      Expressions de la protéine Gas6 et de la bande de 50 kDa telles que révélées par l'anticorps anti-Gas6 dans le foie de rates âgées de 6 et 22 mois.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Adéquate
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
ARNm	ARN messenger
Axl <sup>-/-</sup>	Récepteur Axl éliminé
Ca <sup>2+</sup>	Ions calcium
Cellules RPE	Cellules épithéliales des pigments de la rétine de l'œil
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
E	Enrichie
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique (« <u>e</u> thyl <u>e</u> n <u>e</u> d <u>a</u> m <u>i</u> n <u>e</u> <u>t</u> etra <u>a</u> c <u>e</u> t <u>i</u> c <u>a</u> c <u>i</u> d »)
EGF	Facteur de croissance épidermique
F	Faible
Gas6 <sup>-/-</sup>	Gène gas6 désactivé
Gas6SV	Forme épissée de la protéine Gas6
Gla	Acide $\gamma$ -carboxyglutamique
Glu	Acide glutamique
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
JNK	<i>c-Jun terminal kinase</i>
K <sub>1</sub>	Vitamine K <sub>1</sub> ou Phylloquinone
K <sub>2</sub>	Vitamine K <sub>2</sub> ou ménaquinones

K <sub>3</sub>	Vitamine K <sub>3</sub> ou ménadione
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub>	Hydroquinone
K <sub>1</sub> H <sub>2</sub>	Dihydrophyloquinone
LDL	Lipoprotéines de faible densité
MEK/ERK	<i>Mitogen extracellular kinase / extracellular receptor kinase</i>
Mer-/-	Récepteur Mer éliminé
MK-n	Ménaquinones
MK-4	Ménaquinone-4
MGP	<i>Matrix Gla Protein</i>
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
Neurones GnRH	Neurones gonadotrope
O <sub>2</sub>	Oxygène
PBS-T	Solution composée de PBS et de Tween 20
PIVKA	<i>Protein Induced by Vitamin K Absence or antagonism</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PRGP	<i>Proline-rich Gla protein</i>
SDS	Sodium dodécylsulfate
SHBG	<i>Sex Hormone-Binding Globulin</i>
TMG	<i>Transmembrane Gla protein</i>
Tyro-3-/-	Récepteur Tyro-3 éliminé
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche Dre Guylaine Ferland, pour m'avoir permis de découvrir le milieu fascinant de la recherche et pour m'avoir guidée dans mon projet.

Mes remerciements vont également à Raffaella Vicaretti, l'assistante de recherche du laboratoire, pour son aide technique inestimable et pour son soutien. Je tiens aussi à remercier Nezar Hammoud, stagiaire d'été, qui a grandement contribué aux analyses de la vitamine K.

Je tiens à remercier le Réseau Québécois de Recherche sur le Vieillissement et la faculté des études supérieures pour leur soutien financier.

Je désire remercier mon père, Jean-Claude, pour son soutien, ses conseils et plus particulièrement pour son aide précieuse lors de la rédaction du présent mémoire. Je voudrais également souligner tout le soutien reçu de ma famille et de mes amis ainsi que leurs encouragements.

Enfin, un merci spécial à Jean-François, pour ton soutien, ta compréhension et ton amour. Merci!

## I. INTRODUCTION

La vitamine K, une des quatre vitamines liposolubles, agit comme cofacteur dans la transformation post-traductionnelle des résidus d'acide glutamique (Glu) en résidus d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla) contenus dans plusieurs protéines (33), une modification requise à leur activité biologique. D'abord connue pour son rôle dans l'hémostase (2), on sait maintenant que la vitamine K est impliquée dans divers autres systèmes biologiques dont la régulation du cycle cellulaire (41). D'autre part, l'importance de l'apport alimentaire en phylloquinone en regard du maintien de l'état nutritionnel en vitamine K a été démontrée chez l'humain et la plupart des espèces animales (1,9).

En 1993, une nouvelle protéine dépendante de la vitamine K a été découverte, la protéine Gas6. Cette dernière est exprimée dans un grand nombre de tissus dont le cœur, le poumon, le rein et la rate (66,67,75,77) ainsi que dans diverses régions du cerveau (78). Bien que peu nombreux, les travaux réalisés à ce jour chez le rat indiquent une diminution de l'expression de la protéine dans le cerveau au cours du vieillissement (83). Au plan physiologique, la protéine Gas6 participe à la régulation du cycle cellulaire. Plus précisément, elle est impliquée dans les processus de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire (61-63). Un nombre limité de travaux suggèrent aussi son implication dans la fonction plaquettaire (92-94), dans la fonction osseuse (95,96) et dans la vision (97-99). De même que pour toutes les protéines dépendantes de la vitamine K, la protéine Gas6 doit être carboxylée pour

exercer son action (62,100-102). Elle se lie à des récepteurs tyrosine kinases spécifiques (84-87), lesquels activent différentes voies de signalisation cellulaire (88-91).

Bien que les données relatives à la protéine Gas6 soient intéressantes et prometteuses, plusieurs aspects importants en regard de son métabolisme restent à être élucidés. D'une part, cette protéine a été peu étudiée au cours du vieillissement. En effet, l'influence de l'âge sur l'expression de cette dernière a été étudiée uniquement dans le cerveau chez le rat (78). Des travaux indiquent un maintien des taux d'ARN messager de Gas6 dans le cerveau tout au long de la vie. Par contre, les niveaux d'expression de la protéine elle-même diminuent au cours du vieillissement (83). En raison du nombre limité d'études réalisées à ce jour, cet effet de l'âge sur l'expression de la protéine Gas6 reste donc incertain. De même, la signification physiologique de cet effet reste à être déterminée.

D'autre part, et en dépit du fait que Gas6 dépende de la vitamine K pour son activité biologique, aucune étude ne s'est encore penchée sur l'effet modulateur de la vitamine K sur l'action de la protéine. À la lumière de cela, le présent travail avait pour but de déterminer l'effet modulateur de la vitamine K sur la carboxylation de la protéine Gas6 à différentes périodes de la vie. Pour ce faire, nous avons étudié l'expression de la protéine Gas6 dans les organes chez des rats âgés de 6 et 22 mois ayant reçus une diète faible, adéquate ou élevée en phylloquinone tout au long de leur vie.

## II. REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

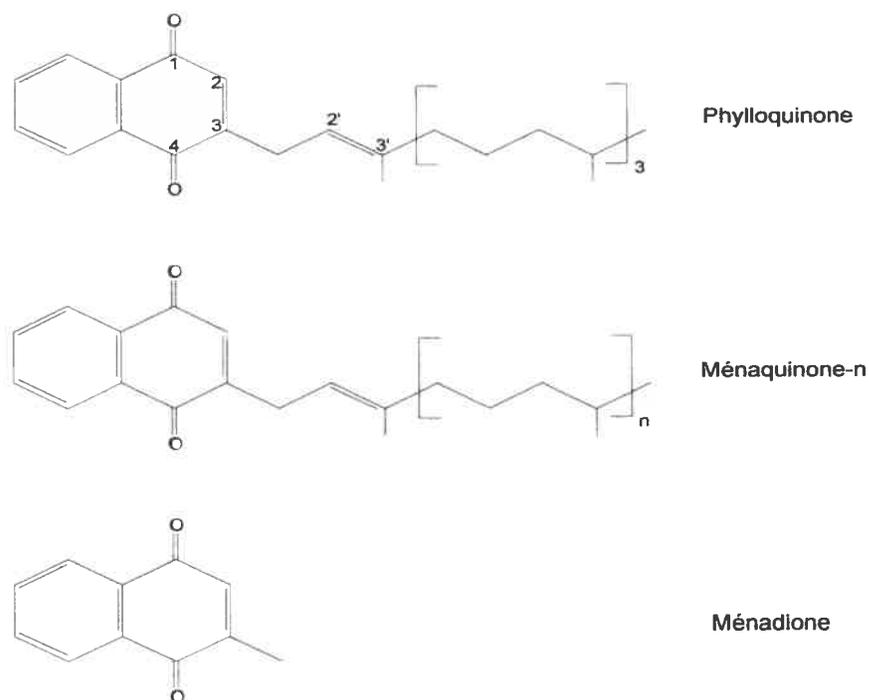
### 1. LA VITAMINE K

La vitamine K fut découverte au début des années 1930 par le danois Henrik Dam. Suite à des travaux portant sur le métabolisme du cholestérol, où des poulets étaient soumis à un régime carencé en lipides, celui-ci a observé la survenue de syndromes hémorragiques. La suite de ses recherches indiqua que la substance antihémorragique est un composé liposoluble et, en 1935, Dam lui donna le nom de vitamine K, faisant référence au terme danois Koagulation (1,2).

#### 1.1 FORMES MOLÉCULAIRES

La vitamine K est présente sous diverses formes moléculaires classées en deux groupes, soit les formes naturelles et les formes synthétiques. Les formes naturelles incluent la phylloquinone ( $K_1$  ou phytoménadione) et les ménaquinones ( $K_2$ ). Elles ont en commun un anneau naphthoquinone et diffèrent par la longueur de leur chaîne aliphatique située à la position 3 du noyau (**figure 1**). Cette chaîne se compose de quatre résidus isopréniques pour la phylloquinone, alors que le nombre de résidus varie de quatre à treize dans le cas des ménaquinones. L'abréviation MK- $n$  est couramment utilisée pour référer aux ménaquinones, où  $n$  représente le nombre de résidus isopréniques. Contrairement aux autres ménaquinones, la MK-4 n'est pas

synthétisée par les bactéries (3) et n'est pas présente dans l'alimentation. Elle est formée à partir de la ménadione ou de la phylloquinone au niveau tissulaire.



**Figure 1.** Structures chimiques de la phylloquinone, des ménaquinones et de la ménadione.

Les formes synthétiques de la vitamine K sont variées et sont utilisées à diverses fins. La ménadione ( $K_3$ ), qui comprend le noyau naphthoquinone commun à toutes les formes de la vitamine K, est utilisée principalement comme source de vitamine K dans l'alimentation chez l'animal (1). Bien qu'elle n'ait jamais été isolée dans la nature, elle possède une activité biologique (4) et sert de substrat à la synthèse des ménaquinones chez la bactérie. On retrouve également les homologues

synthétiques de la phylloquinone comme la vitamine K<sub>1(25)</sub> (2-méthyl-3-(3,7,11,15,19-pentométhyl-2-éicosényl)-1,4-naphtalenedione) (135). Ils sont obtenus suite à une transformation de la phylloquinone au niveau de la chaîne aliphatique et sont utilisés comme standards internes lors des dosages de la vitamine K par chromatographie liquide (HPLC) (5).

## 1.2 SOURCES ALIMENTAIRES

La phylloquinone constitue la principale source alimentaire de vitamine K. On la retrouve en plus grande quantité dans les légumes verts feuillus lesquels représentent 40-50 % de l'apport quotidien total (6). La teneur en phylloquinone de ces aliments varie entre 100 et 600 µg/100 g (5,7). Elle est présente en quantité plus faible dans les légumes « racines » et les fruits (< 60 µg/100 g) (4,7,8). Certaines huiles végétales en contiennent des quantités non négligeables, notamment les huiles de soya, de canola et d'olive avec des teneurs variant entre 50 et 200 µg/100 g (4,6,7). Les mets composés (ex. sautés, casseroles) constituent également des bonnes sources de phylloquinone en raison des huiles riches en vitamine K utilisées lors de leur préparation. Il a été estimé qu'environ 15% de l'apport quotidien de vitamine K proviennent de ces aliments (7). La phylloquinone est résistante à la chaleur mais très sensible à la lumière (rayons ultraviolets). Par conséquent, les huiles devraient être conservées dans des contenants opaques ou protégés de la lumière.

Les ménaquinones contribuent relativement peu à l'apport total de vitamine K, contrairement à la phylloquinone, en raison du fait qu'elles sont présentes dans un nombre limité d'aliments et lorsque présentes, elles le sont généralement en petites quantités. Plus spécifiquement, on les trouve dans les fromages (MK-8 et MK-9), les teneurs variant entre 5 et 20  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  (4,9), ainsi que dans les produits fermentés du soya (MK-6 et MK-8) (7). Le foie renferme des ménaquinones à chaîne variable (MK-6 à MK-13), par exemple les foies des ruminants en contiennent 10-20  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , mais cet aliment est généralement peu consommé (4,7). Il a été rapporté que les ménaquinones sont également présentes dans le jaune d'œuf, le beurre, le poisson, la viande et les aliments fermentés (4,7).

## 1.3 MÉTABOLISME

### *1.3.1 Absorption*

L'absorption de la vitamine K suit la voie classique d'absorption des lipides. Elle s'effectue dans la partie proximale de l'intestin grêle et nécessite la présence des sels biliaires et des sucs pancréatiques (1,10). La vitamine K est solubilisée dans la lumière intestinale puis est incorporée aux micelles, particules composées de sels biliaires, d'acides gras libres et de monoglycérides. Elle est ensuite absorbée par les entérocytes. En revanche, les ménaquinones, synthétisées par la flore intestinale au niveau du côlon, sont peu absorbées (4).

L'efficacité de l'absorption dépend de la source nutritionnelle de la vitamine et de la présence de matières grasses dans l'intestin. Dans sa forme pure (ex. comprimé), la vitamine K est absorbée à environ 80% chez l'humain en santé (10,11) alors que son absorption est d'environ 10% lorsqu'elle se présente dans l'intestin sous forme de légumes verts (12). Précisons que dans les végétaux, la vitamine est fortement liée aux chloroplastes (13). Par ailleurs, l'absorption de la vitamine K contenue dans les huiles est environ 1,5 fois plus élevée que celle des végétaux (légumes verts) (14). Soulignons que l'efficacité d'absorption de la vitamine K présente dans les légumes verts est améliorée par la présence de matières grasses. En effet, l'efficacité d'absorption de la vitamine contenue dans les épinards est passée de 8% à 26% lorsque ces derniers étaient consommés concurremment avec du beurre (12). D'autres études ont confirmé ces résultats (11,14).

### *1.3.2 Transport plasmatique*

Une fois intégrée à la paroi intestinale, la vitamine K est incorporée aux chylomicrons puis emprunte la lymphe pour rejoindre la circulation sanguine. Elle se rend ensuite au foie où elle est remise en circulation par le biais des lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Chez l'humain, près de 50% de la vitamine K est transportée par les lipoprotéines riches en triglycérides dont les VLDL, 25% par les LDL et 25% par les HDL (1,15-17). En revanche, les ménaquinones ont une distribution différente au sein des lipoprotéines, ces vitamines étant transportées plus

largement par les VLDL et les LDL. En effet, Schurgers *et al.* (17) ont observé la présence de la MK-9 presque uniquement dans les LDL.

### *1.3.3 Distribution tissulaire*

La vitamine K circulante est rapidement captée par les tissus par un mécanisme d'action qui n'est pas encore élucidé. La distribution tissulaire de la vitamine K varie selon la forme moléculaire. Il a été démontré que la phylloquinone et la MK-4 sont les deux formes de la vitamine K prédominantes dans les organes des animaux (18,19) et qu'elles y sont présentes à des concentrations variables. Plus précisément, la phylloquinone est présente en quantité décroissante dans le foie, le cœur, le pancréas, les glandes salivaires et le cerveau (18,20). Peu présente dans le foie, la MK-4 est également largement distribuée (pancréas, glandes salivaires, rein, cerveau, cœur, poumon, foie) (18) mais on la retrouve en quantité particulièrement élevée dans le cerveau, où elle constitue 98% de la vitamine K totale (21). Par ailleurs, des travaux se sont récemment penchés sur la distribution de la vitamine dans les différentes régions du cerveau. Plus précisément, il a été observé que la MK-4 est présente en plus grande concentration dans le mésencéphale et le bulbe pont, deux régions riches en substance blanche, et en plus faible concentration dans le bulbe olfactif, le striatum et le cervelet, trois régions riches en matière grise (21). Bien que peu nombreux, les travaux réalisés chez l'humain suggèrent une distribution tissulaire similaire de la vitamine (4,22).

#### *1.3.4 Facteurs affectant la concentration tissulaire de la vitamine K*

Plusieurs facteurs influencent la concentration tissulaire de la vitamine K, notamment la diète, l'âge et le sexe. De façon générale, la concentration de la vitamine dans les tissus augmente en fonction des apports alimentaires (18,23). Chez le rat, il a effectivement été démontré que la teneur en phylloquinone est de 1,5 à 7 fois plus élevée dans les tissus d'animaux ayant reçu une diète enrichie (6 µg de phylloquinone/g diète) en vitamine K, comparativement à ceux recevant une diète faible (0,6 µg de phylloquinone/g diète) (23).

L'âge affecte également la teneur tissulaire de la vitamine K chez le rat, de façon différente selon la forme moléculaire de la vitamine. Dans le cas de la MK-4, cette dernière diminue au cours de l'âge dans la plupart des tissus extrahépatiques et de façon moins marquée dans le foie (19). Par contre, les niveaux de phylloquinone ne semblent pas affectés par le vieillissement. Chez l'humain, seul le compartiment plasmatique a été étudié et la concentration plasmatique de la phylloquinone tend à augmenter en fonction de l'âge. Des concentrations de 0,92 nmol/L ont été rapportées chez des personnes âgées de plus de 65 ans, comparativement à 0,80 nmol/L chez des personnes de moins de 50 ans (24).

Enfin, la teneur tissulaire de la vitamine K varie en fonction du sexe des individus. Chez le rat, les concentrations tissulaires de MK-4 sont généralement plus élevées chez les femelles que chez les mâles, et ce quel que soit le tissu (19).

Toutefois, comme pour l'âge, la phylloquinone est peu affectée par le sexe de l'animal. Par contre, chez l'humain, le sexe ne semble pas affecter la concentration plasmatique de vitamine K (24).

### *1.3.5 Excrétion de la vitamine*

La vitamine K est excrétée dans les fèces et dans une moindre mesure, dans l'urine. Chez l'homme, environ 40-50% de la vitamine K ingérée est excrétée via les fèces alors que 20% se retrouve dans l'urine (25-27); environ 7% des pertes fécales correspondraient à la phylloquinone d'origine biliaire (25). Les fèces comportent également des ménaquinones, notamment celles à longue chaîne (MK-6 à MK-10) d'origine intestinale (27).

## 1.4 RECOMMANDATIONS NUTRITIONNELLES

Les recommandations nutritionnelles quotidiennes pour la vitamine K sont de 90 µg de vitamine K pour les femmes et de 120 µg pour les hommes et constituent des apports suffisants (28). Il est à noter qu'aucune toxicité de la vitamine n'a été observée à ce jour, même lorsqu'elle est consommée à des doses pharmacologiques (28). Récemment rapporté dans un article de revue (7), l'apport moyen chez des jeunes adultes (< 50 ans) est d'environ 80 µg/jour de phylloquinone et celui chez des

adultes plus âgés (> 50 ans) est d'environ 150 µg/jour. Les apports chez les jeunes adultes ne satisfont donc pas les recommandations nutritionnelles actuelles.

### 1.5 CARENCE DE VITAMINE K

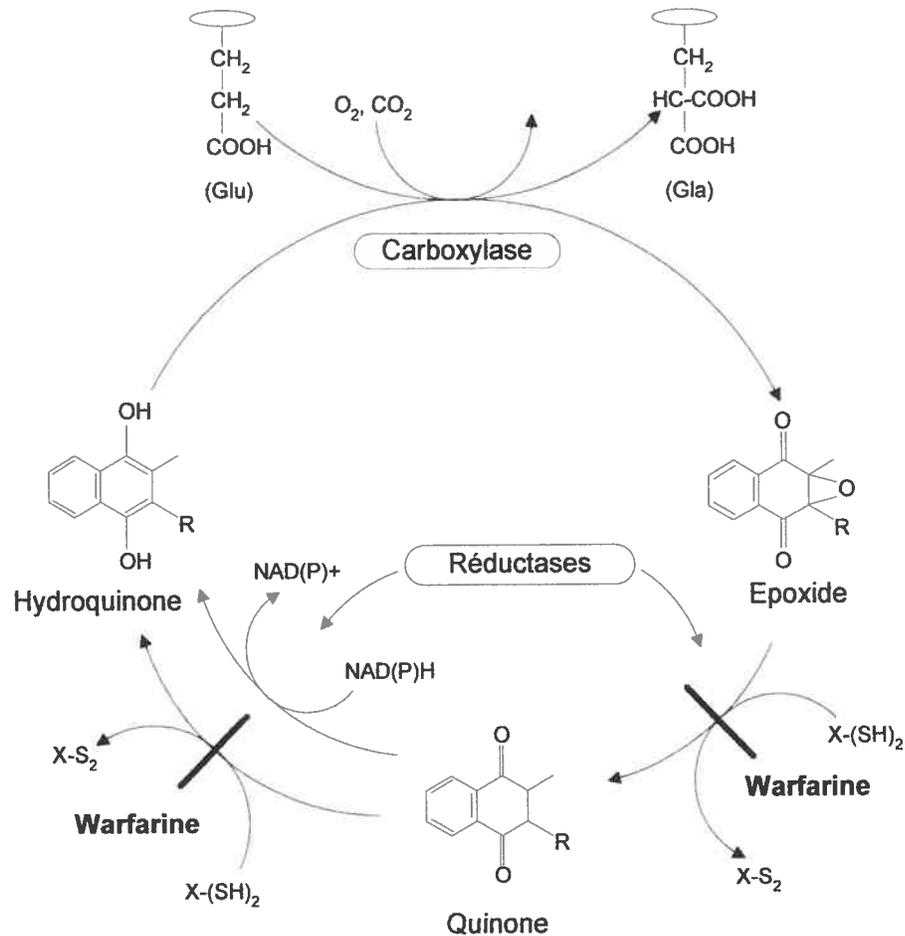
Au plan clinique, la carence de vitamine K se manifeste par des troubles de la coagulation. Elle se caractérise par une augmentation du temps de coagulation découlant d'une hypoprothrombinémie, et dans les cas plus sévères, par des saignements et/ou des hémorragies (1). Bien que rarement observée chez l'humain en santé, la carence de vitamine K est généralement associée à des désordres gastrointestinaux pouvant entraîner une malabsorption des lipides (ex. pancréatite, maladie inflammatoire de l'intestin, cholestase, fibrose kystique) et/ou à des désordres hépatiques (29-31). Les personnes sous anticoagulothérapie (ex. warfarine sodique et ses dérivés) sont également à risque de carence en raison de l'action antagoniste de ces médicaments (1,5). Il en est de même, bien que l'effet soit moins marqué, des personnes traitées à long terme aux antibiotiques à large spectre (ex. céphalosporines); le mécanisme d'action de ces médicaments serait comparable à celui de la warfarine sodique (1).

Les nouveaux-nés constituent également un groupe à risque de carence de vitamine K en raison du faible transfert placentaire de la vitamine et d'une synthèse encore sous-optimale des facteurs de coagulation résultant de l'immaturation du foie (1,5). La carence de vitamine K chez le nouveau-né entraîne une condition appelée

« syndrome hémorragique du nouveau-né ». Ce dernier se caractérise par une augmentation du risque de saignements au niveau cérébral dans les premières semaines de vie (1). Au Canada, comme dans la plupart des pays industrialisés, la prévalence de ce syndrome est presque inexistante en raison d'une pratique prophylactique qui suggère l'administration de 0,5 à 1 mg de phylloquinone par voie intramusculaire à la naissance (32).

### 1.6 RÔLE DE LA VITAMINE

Au plan moléculaire, la vitamine K agit comme cofacteur dans une réaction de carboxylation qui a pour but la transformation post-traductionnelle des résidus d'acide glutamique (Glu) en résidus d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla) (**figure 2**). Cette réaction est catalysée par l'enzyme carboxylase et nécessite la forme active de la vitamine K, l'hydroquinone (KH<sub>2</sub>). La présence de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et d'oxygène (O<sub>2</sub>) est également requise (33). Cette réaction survient au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (34) et est essentielle à l'activité biologique des protéines impliquées dans cette réaction. En effet, cette transformation des résidus Glu en Gla augmente l'affinité de ces protéines pour le calcium, une caractéristique qui leur permet de se lier aux composantes biologiques (phospholipides, hydroxyapatite, récepteurs membranaires) associées à leur action (33,35,36). Ces protéines constituent la famille des protéines dépendantes de la vitamine K.



**Figure 2.** Cycle de la vitamine K.  $X-(SH)_2$  et  $X-S_2$  indique les dithiols réduit et oxydés, respectivement. Les réductases dépendantes du dithiol sont inhibées par les anticoagulants tels que la warfarine alors que la réductase dépendante du  $NAD(P)H$  ne l'est pas.

Au terme de la réaction de carboxylation et tel qu'illustré à la **figure 2**, la  $KH_2$  est convertie en vitamine K époxyde, une forme inactive de la vitamine. Cette dernière est ensuite réduite en quinone (forme intermédiaire) puis en  $KH_2$  par des réductases dont l'action dépend de la présence de dithiols (34,37). Précisons que la quinone peut également être réduite en  $KH_2$  par une réductase dépendante du

NAD(P)H (38,39). La conversion des différentes formes de la vitamine constitue le cycle de la vitamine K. Par ailleurs, ce dernier peut toutefois être altéré par des composés dérivés de la warfarine sodique et certains antibiotiques (ex. céphalosporines) (1,5,40); d'ailleurs l'on réfère à eux comme à des antagonistes de la vitamine K. Plus précisément, ces composés agissent en bloquant l'action des réductases dépendantes des dithiols (38-40). Par contre, la réductase dépendante du NAD(P)H est insensible à ces antagonistes (38).

Enfin, en absence de vitamine K alimentaire ou en présence d'antagonistes, la réaction de carboxylation est bloquée et les protéines libérées dans la circulation sont sous-carboxylées. Ces protéines, appelées PIVKA pour *Protein Induced by Vitamin K Absence or antagonism*, sont biologiquement inactives et constituent un marqueur de l'état nutritionnel de la vitamine K (41).

## 1.7 PROTÉINES DÉPENDANTES DE LA VITAMINE K

Bien que la découverte de la vitamine K par Dam en 1930 (2) ait d'abord été associée à la coagulation sanguine, nous savons maintenant que cette vitamine agit dans divers autres systèmes biologiques par l'intermédiaire d'une gamme de protéines. Ces protéines sont impliquées dans l'hémostase, le métabolisme osseux, l'homéostasie calcique et la régulation du cycle cellulaire. Dans cette section, le rôle de ces protéines dépendantes de la vitamine K sera brièvement discuté pour chacun des systèmes biologiques.

### *1.7.1 Protéines impliquées dans l'hémostase*

La coagulation sanguine implique sept protéines dépendantes de la vitamine K, soit la prothrombine (facteur II), les facteurs VII, IX et X ainsi que les protéines C, S et Z. Synthétisées au foie, ces protéines possèdent un poids moléculaire variant entre 45 et 72 kDa et contiennent entre 10 et 12 résidus Gla (41). La prothrombine et les facteurs VII, IX et X participent à une cascade d'événements conduisant à la formation d'un caillot de fibrine, pour cette raison ils sont dits « procoagulants » (41,42). Par contre, les protéines C et S possèdent une activité anticoagulante en raison du fait qu'ils inhibent l'action procoagulante des facteurs V et VIII (41,42). Bien que la fonction physiologique de la protéine Z ne soit pas encore totalement caractérisée à ce jour, cette dernière aurait également une activité anticoagulante en participant en tant que cofacteur à l'inhibition du facteur X (43).

### *1.7.2 Protéines impliquées dans le métabolisme osseux*

Tel que mentionné précédemment, l'on retrouve des protéines dépendantes de la vitamine K dans l'os. Suite à l'identification des résidus Gla en 1974 par l'équipe de Stenflo (44,45), l'ostéocalcine est la première protéine à avoir été découverte dans ce système biologique. L'ostéocalcine est présente exclusivement dans l'os et la dentine (46-48), et constitue la protéine non-collagénique la plus abondante de l'organisme. Elle possède un poids moléculaire de 5,8 kDa, comporte trois résidus Gla (49) et présente une grande affinité pour l'hydroxyapatite (1). Même si son rôle

reste à préciser au plan moléculaire, les études réalisées à ce jour lui attribuent un rôle de régulateur de la formation osseuse (41,50). En effet, l'ostéocalcine serait impliquée dans le recrutement et la différenciation des cellules précurseurs des ostéoclastes, suggérant une action dans la résorption osseuse (41). Cette action ostéoclastique a effectivement été observée chez des rats rendus déficients en ostéocalcine suite à l'administration de warfarine sodique. Ces animaux présentaient des anomalies osseuses, incluant une minéralisation excessive de l'os, une fermeture prématurée des plaques de croissance et un arrêt de la croissance osseuse (50). Plus récemment, chez des souris dont le gène codant pour l'ostéocalcine a été éliminé, on observait une augmentation de leur masse osseuse et une plus grande résistance des os lorsque ces derniers étaient soumis à des pressions mécaniques (51). Notons que ces changements étaient associés à une augmentation du nombre d'ostéoclastes mais non à celui des ostéoblastes, appuyant ainsi les évidences suggérant un rôle de l'ostéocalcine dans la résorption osseuse.

Par ailleurs, les évidences actuelles indiquent que la vitamine K joue un rôle important dans le métabolisme osseux au cours du vieillissement, notamment par l'intermédiaire de l'ostéocalcine. En effet, il a été rapporté qu'un apport alimentaire faible en phylloquinone est associé à une augmentation du taux d'ostéocalcine sous-carboxylée (59), de même qu'à un risque de fractures de la hanche, particulièrement chez les femmes (136,137). De plus, des études d'intervention ont montré qu'une supplémentation en vitamine K réduisait les taux d'ostéocalcine sous-carboxylée (129,138). D'autre part, des taux élevés d'ostéocalcine sous-carboxylée ont été

associés au risque de fractures de la hanche chez des femmes âgées vivant en institution ou à la maison (136). Or, ces résultats vont à l'encontre de l'action de l'ostéocalcine observée chez la souris, présentée précédemment. Selon ces résultats, une augmentation des taux d'ostéocalcine sous-carboxylée devrait plutôt entraîner une augmentation de la densité minérale osseuse. D'autres investigations sont donc nécessaires afin de préciser le rôle de la vitamine K dans le métabolisme osseux.

La protéine S, connue pour son action dans la coagulation sanguine, semble également jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie osseuse. Au début des années 1990, deux cas d'ostéopénie sévère ont été rapportés chez des enfants ayant une déficience en protéine S (52). Par la suite, cette protéine a été détectée dans la matrice osseuse chez l'humain, où elle est synthétisée et sécrétée par les ostéoblastes (53). Cependant, le rôle spécifique de la protéine S dans le métabolisme osseux reste encore à être déterminé (41).

### *1.7.3 Protéine impliquée dans l'homéostasie calcique*

Seconde protéine à avoir été associée à l'os, la *matrix Gla protein* (MGP) possède un poids moléculaire de 10 kDa et contient cinq résidus Gla (54). Contrairement à l'ostéocalcine, cette protéine est largement distribuée dans l'organisme. En plus de sa présence dans l'os, on la retrouve dans plusieurs tissus mous tels que le poumon, le cœur, le rein et la rate (55). Elle est également présente dans les cartilages (56) et les cellules du muscle lisse vasculaire (57).

Sur la base des connaissances actuelles, la MGP serait un puissant inhibiteur de la calcification tissulaire (55,58,59). Des travaux menés chez des souris ne possédant pas le gène codant pour la MGP ont en effet montré une calcification des artères, provoquant la rupture des vaisseaux sanguins, puis la mort des animaux par hémorragie dans les deux premiers mois de vie (58). De plus, chez ces animaux, l'absence de MGP a résulté en une calcification inappropriée des cartilages, à un arrêt prématuré de la croissance osseuse, à une ostéopénie et à une apparition de fractures. Précisons que des résultats semblables ont aussi été observés chez des rats recevant de fortes doses de warfarine sodique. Après une semaine de traitement, ceux-ci présentaient une calcification des artères et des valves aortiques sans toutefois que la croissance des os ne soit affectée (60).

#### *1.7.4 Protéine impliquée dans la régulation cellulaire*

En 1993, une autre protéine dépendante de la vitamine K a été identifiée, soit la protéine Gas6. Les travaux réalisés à ce jour indiquent l'implication de cette protéine dans les processus de croissance, de prolifération et de mort cellulaire (apoptose) (61-63). Comme cette protéine est au cœur du présent travail, elle sera traitée de façon plus élaborée dans la section suivante.

### 1.7.5 Autres protéines dépendantes de la vitamine K

D'autres protéines dépendantes de la vitamine K ont récemment été découvertes, soient les *proline-rich Gla proteins* (PRGP1 et PRGP2) et les *transmembrane Gla proteins* (TMG3 et TMG4) (64,65). Selon les données actuellement disponibles, ces protéines possèdent un poids moléculaire variant entre 17 et 24 kDa et sont largement distribuées dans les tissus humains. La PRGP1 se retrouve en plus grande concentration dans la moelle épinière alors que la PRGP2 est particulièrement présente dans la glande thyroïde (64). Notons que ces quatre protéines sont détectées tant chez le fœtus que chez l'adulte (65), cependant, leurs rôles physiologiques restent à être déterminés.

## 2. LA PROTÉINE GAS6

Découverte en 1993 par Manfioletti *et al.* (66), la protéine Gas6 fut identifiée comme étant le produit du gène *growth arrest-specific 6* lorsqu'il a été démontré que l'expression de ce gène est augmentée dans des fibroblastes NIH 3T3 en période d'arrêt de croissance suite à une absence de sérum. Cette protéine possède un poids moléculaire de 75 kDa et se compose de 673 acides aminés dont 43-44% sont homologues à ceux de la protéine S, laquelle est impliquée dans la coagulation sanguine (66). Une fois synthétisée, la protéine Gas6 est sécrétée dans le milieu extracellulaire, par un mécanisme encore inconnu, où elle exerce ses activités biologiques (66,67).

## 2.1 STRUCTURE MOLÉCULAIRE

La protéine Gas6 comporte trois domaines, soit les domaines Gla, EGF et SHBG (**figure 3**). Le domaine Gla se situe à l'extrémité amine de la protéine et renferme les résidus d'acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Gla) qui dans cette protéine sont au nombre de 11 à 12 (67). Ces résidus sont produits lors de la réaction de carboxylation décrite dans la section précédente. Ces derniers augmentent l'affinité de la protéine pour les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), une propriété permettant à celle-ci de se lier à la membrane cellulaire (68-70). Il a effectivement été démontré que le domaine Gla est nécessaire à la liaison de Gas6 aux phospholipides, plus particulièrement aux molécules de phosphatidylsérines, en présence de calcium (68).

Le domaine EGF se compose de quatre séquences répétées analogues à celles que l'on retrouve dans le facteur de croissance épidermique (EGF) (66). Bien qu'aucune fonction particulière ne soit, à ce jour, associée à cette région, le domaine EGF pourrait jouer un rôle dans la modulation des activités biologiques de la protéine (69,71,72). Utilisant une variante de la protéine Gas6 où les domaines Gla et EGF étaient éliminés, McCloskey *et al.* (69) ont montré que cette dernière pouvait se lier aux récepteurs membranaires mais était incapable d'induire l'agrégation des cellules, une activité biologique de Gas6. Sur la base de ces résultats, les domaines EGF et Gla semblent donc jouer des rôles importants en regard de la modulation de l'activité de Gas6.



**Figure 3.** Structure moléculaire de la protéine Gas6.

Enfin, le domaine SHBG se situe à l'extrémité carboxyle de la protéine et est appelé ainsi en raison de sa ressemblance à la protéine *Sex Hormone-Binding Globulin* (SHBG) (66). Cette région permet à la protéine de se lier aux récepteurs membranaires (69,71,72). Utilisant des variantes de Gas6 où certains domaines étaient éliminés, Tanabe *et al.* (71) ont observé que les variantes dans lesquelles le domaine Gla, le domaine EGF ou les deux étaient absents, pouvaient se lier aux récepteurs, contrairement à la variante ne possédant pas le domaine SHBG, qui elle ne pouvait se lier à eux. Le domaine SHBG semble donc important pour la liaison de Gas6 aux récepteurs membranaires.

## 2.2 FORME ÉPISSÉE DE LA PROTÉINE GAS6

Peu après sa découverte, une forme épissée de la protéine Gas6 a été isolée puis caractérisée (73,74). Cette forme comporte une insertion dans son ADN entre les domaines EGF et SHBG, laquelle code pour une séquence de 43 acides aminés, et possède un poids moléculaire de 86 kDa (73). La forme épissée de Gas6 (Gas6SV) subit un clivage au niveau de la séquence insérée, la scindant ainsi en deux segments

(74), un de 36 kDa qui inclut les domaines Gla et EGF (extrémité amine), et un autre de 50 kDa comprenant le domaine SHBG (extrémité carboxyle). Ces observations ont aussi amené Goruppi *et al.* (74) à émettre l'hypothèse que cette forme épissée représente un mécanisme contrôlant la disponibilité de la protéine. Toutefois, le rôle physiologique de cette forme épissée de la protéine Gas6 reste à être déterminé.

### 2.3 DISTRIBUTION TISSULAIRE

La distribution tissulaire de la protéine Gas6 a été étudiée en considérant la présence de son ARN messenger (ARNm) et, dans une moindre mesure, celle de la protéine. Chez la souris, où il a été investigué initialement, l'ARNm de Gas6 est détecté dans une grande variété de tissus, les plus hauts niveaux d'expression se trouvant dans le cœur, le poumon, l'estomac et le rein (66). Chez le rat, l'ARNm est aussi largement distribué dans les tissus, où les niveaux les plus élevés ont été observés dans le poumon, le nerf sciatique (cellules non-neuronales), le cœur et le rein (75). De plus, l'ARNm de Gas6 est présent dans la majorité des régions du cerveau, ce dernier étant détecté en concentrations élevées dans le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe et l'hypothalamus (75). Enfin, chez l'humain, l'ARNm est présent dans le poumon, l'intestin, la moelle osseuse, les cellules endothéliales (66) ainsi que dans les chondrocytes (76). Par contre, en ce qui concerne la forme épissée de la protéine (Gas6SV), la distribution tissulaire de son ARNm semble plus restreinte que celle de la forme initialement découverte (70 kDa). Chez l'humain, des travaux de Marcandalli *et al.* (73) ont en effet révélé la présence de l'ARNm de

Gas6SV dans la rate, le poumon et le rein, et plus faiblement dans le foie. Fait intéressant, dans le rein, les taux d'expression de l'ARNm Gas6SV sont plus élevés que ceux de Gas6, suggérant une prédominance de Gas6SV dans cet organe.

Comme pour l'ARNm, la protéine Gas6 est exprimée dans une variété de tissus. Chez le rat, la protéine est présente dans la peau, le poumon, l'aorte, le thymus, la rate, la moelle osseuse, les plaquettes sanguines (77) et la paroi vasculaire (67). Dans le cerveau, la protéine Gas6 a été détectée, par immunohistochimie, dans le bulbe olfactif, le cervelet, l'hippocampe, le cortex, le striatum et plusieurs structures hypothalamiques (78). La protéine Gas6 a également été étudiée chez l'humain, où elle est présente dans le cartilage (76), le poumon (79) et plus faiblement dans le pancréas (les îlots de Langerhans) (80) et dans le rein (81). Soulignons le fait que, contrairement au faible taux d'expression de la protéine dans le rein, cette dernière est fortement exprimée dans plusieurs maladies rénales inflammatoires de diverses étiologies telles que la néphrite, la glomérulonéphrite et en cas de rejet aigu de greffe rénale (81). Enfin, l'expression tissulaire de Gas6SV n'a, à ce jour, pas encore été étudiée.

En résumé, Gas6 est exprimée dans une variété de tissus, dont le cœur, le poumon, le rein et la rate ainsi que dans diverses régions du cerveau. Toutefois, son expression n'a pas été étudiée dans tous les organes et ce, de façon plus particulière en regard de l'expression de la protéine. Par exemple, aucune donnée n'est

actuellement disponible quant à la présence de la protéine Gas6 dans les glandes telles que les organes génitaux, la thyroïde et le pancréas chez le rat.

#### 2.4 FACTEUR AFFECTANT LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE LA PROTÉINE GAS6

Bien que peu nombreux, les travaux réalisés chez le rat suggèrent une influence de l'âge sur la concentration tissulaire de Gas6. Précisons que cet effet de l'âge a été étudié à ce jour uniquement dans le cerveau. Les données actuellement disponibles indiquent une augmentation des taux d'ARNm dans le cerveau entier au cours du développement embryonnaire, plus précisément à partir du jour 17 de la période de gestation qui, chez le rat, est de 21 à 23 jours (82), pour atteindre les plus hauts niveaux trois jours après la naissance (78). Des résultats semblables ont été observés de façon plus spécifique dans l'hippocampe. En effet, des travaux réalisés par Funakoshi *et al.* (75) ont révélé une augmentation des niveaux d'ARNm de Gas6 à partir du onzième jour de vie de l'embryon, atteignant les taux maximaux au 21<sup>e</sup> jour postnatal. Par contre, les niveaux d'expression de la protéine Gas6 n'augmentent qu'après la naissance où les niveaux les plus élevés ont été observés au quinzième jour postnatal (78). À l'âge adulte, des travaux menés par Prieto *et al.* (78) ont révélé un maintien des taux d'ARNm de Gas6 à des niveaux élevés chez des animaux âgés de 8 et 24 mois. En revanche, l'expression de la protéine Gas6 diminue au cours du vieillissement. Tsaioun *et al.* (83) ont effectivement observé une baisse de 55 à 86 % de l'expression de la protéine dans le striatum, l'hippocampe et le cortex frontal provenant de rats âgés de 24 mois, comparativement à ceux de rats âgés de 6 mois.

Cette diminution de l'expression de Gas6 a aussi été observée, bien que de façon moins marquée, dans l'hippocampe et le cortex frontal à 12 mois par comparaison à ce qui est observé chez des rats âgés de 6 mois. En somme, ces résultats suggèrent une augmentation des taux d'ARNm dans le cerveau du rat au cours du développement embryonnaire et dans les premières semaines de vie, et un maintien de ces niveaux tout au long de la vie. En ce qui concerne la protéine elle-même, ses taux d'expression augmentent dans les premières semaines de vie et se maintiennent à ces niveaux jusqu'à l'âge adulte. Toutefois, et contrairement à l'ARNm, les taux d'expression de la protéine diminuent au cours du vieillissement. Ceci suggère la présence d'un mécanisme de contrôle de l'activité de la protéine Gas6 dans le cerveau et plus particulièrement au cours de l'âge. Par ailleurs, l'effet de l'âge n'a pas été étudié jusqu'à présent dans les organes.

## 2.5 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DE LA PROTÉINE GAS6

Bien que son mécanisme d'action ne soit pas complètement élucidé à ce jour, la protéine Gas6 participe à la régulation du cycle cellulaire, plus précisément dans les processus de croissance, de prolifération et de mort cellulaire programmée (apoptose) (61-63). Ces activités biologiques de Gas6 nécessitent l'activation de récepteurs tyrosine kinases (84-87), lesquels activent différentes voies de signalisation cellulaire (88-91). Par ailleurs, un nombre limité de travaux suggère que la protéine Gas6 joue également un rôle dans les fonctions plaquettaire (92-94) et osseuse (95,96) ainsi que dans la vision (97-99).

Avant de poursuivre, rappelons que la protéine Gas6 doit être carboxylée pour exercer ses activités biologiques (62,63,100-102). En effet, des travaux menés chez la souris par Stenhoff *et al.* (100) ont révélé que l'ajout de la protéine carboxylée à une culture de fibroblastes cardiaques stimulait la prolifération de ces derniers alors qu'aucun effet prolifératif n'était observé en présence de la protéine décarboxylée. La présence des résidus Gla est également nécessaire en regard de l'action de Gas6 dans la survie cellulaire. Nakano *et al.* (63) ont observé qu'en présence de la protéine Gas6 dénuée de résidus Gla, le taux de survie des cellules du muscle lisse vasculaire était de l'ordre de 5%, contrairement à 70-75% lorsque la vitamine K était ajoutée dans le milieu de culture, permettant la formation des résidus Gla.

Dans la section qui suit, les activités biologiques de la protéine Gas6 seront discutées, en commençant par son implication dans la régulation du cycle cellulaire, puis son action dans les fonctions plaquettaire et osseuse et finalement dans la vision.

### *2.5.1 Régulation du cycle cellulaire*

La protéine Gas6 régule le cycle cellulaire en se liant d'abord à des récepteurs tyrosine kinases via son domaine SHBG (69,71,72,74), ce qui induit la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs membranaires puis leur activation (84,86,87). Cette interaction entre Gas6 et ces récepteurs entraîne l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires, lesquelles régulent la prolifération,

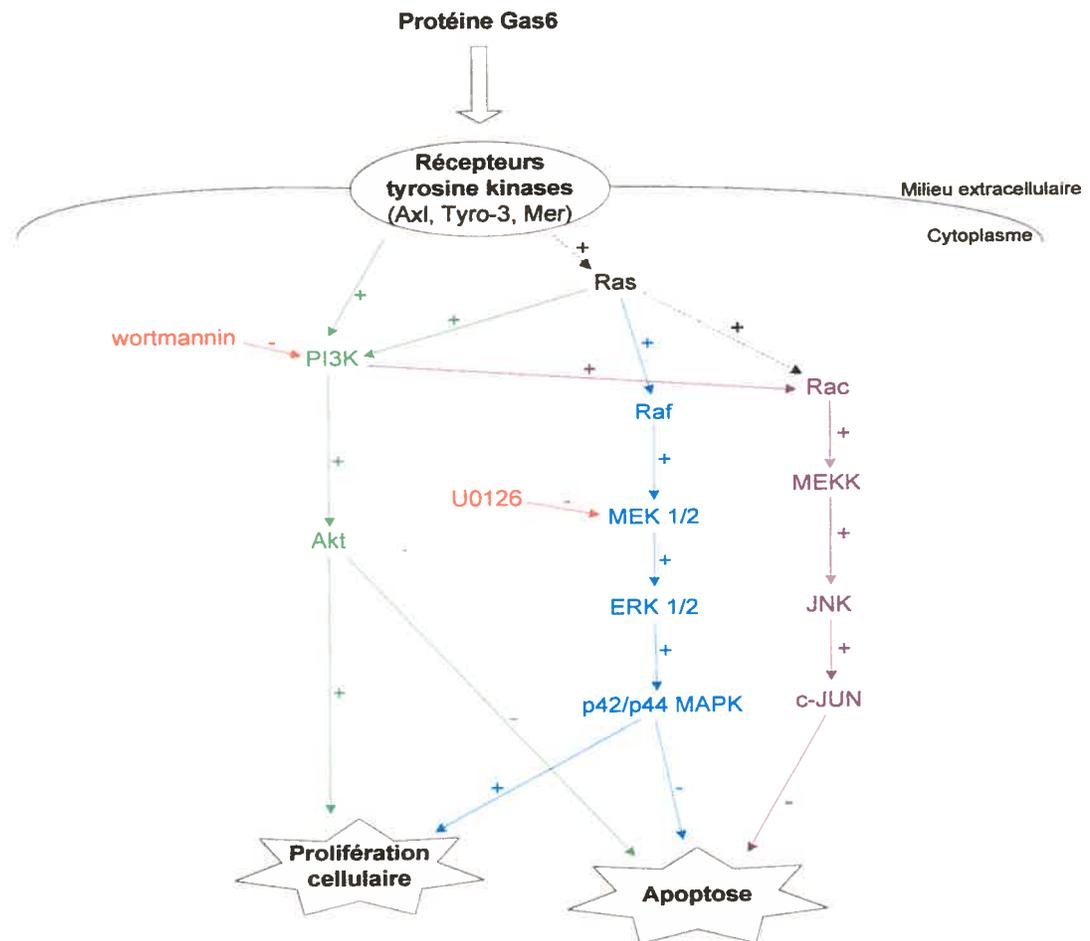
la différenciation et la survie de la cellule. Précisons toutefois que la réponse cellulaire induite varie selon le récepteur activé et le type cellulaire.

#### 2.5.1.1 Récepteurs tyrosine kinases

Comme mentionné plus haut, la protéine Gas6 est le ligand d'une famille de récepteurs tyrosine kinases, composée des récepteurs Axl (aussi nommé Ark, UFO et Tyro-7) (84,86,103,104), Tyro-3 (aussi nommé Sky, Rse et Dtk) (84,87,104,105) et Mer (aussi nommé Eyk et Tyro-12) (84,85). Ces récepteurs sont exprimés au cours du développement embryonnaire et sont largement distribués dans les tissus. Plus spécifiquement, le récepteur Tyro-3 est exprimé de façon prédominante dans le système nerveux (104,106,107) et, dans une moindre mesure, dans les autres tissus tels que le rein (103), le cœur, le placenta, le foie, le poumon, le pancréas et le muscle squelettique (107). Bien que les récepteurs Axl et Mer se retrouvent dans le système nerveux, ils sont plus largement présents dans les tissus périphériques. Le récepteur Axl est exprimé dans certains organes tels que le cœur, le poumon, le rein et la rate (108). De plus, son expression a été observée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (ex. cancer métastatique du côlon, carcinome de la thyroïde chez l'humain, leucémie myéloïde aiguë, mélanome) (109). D'autre part, le récepteur Mer est présent dans les testicules, les ovaires, la prostate, le poumon, le rein ainsi que la moelle osseuse (110). Il est important de souligner que la protéine Gas6 possède une affinité de liaison différente pour chacun des récepteurs, la plus grande affinité étant pour le récepteur Axl, ensuite pour Tyro-3 et finalement pour Mer (84,85,104).

### 2.5.1.2 Voies de signalisation cellulaire

L'action de la protéine Gas6 dans la régulation du cycle cellulaire fait appel à trois voies de signalisation, soit celles de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt (88-90), de MEK/ERK (90) et, dans une moindre mesure, celle de JNK (91). Bien qu'une description exhaustive de chacune de ces voies déborde du présent travail, une version abrégée de celles-ci est présentée à la **figure 4**.



**Figure 4.** Voies de signalisation cellulaire impliquées dans les activités biologiques de la protéine Gas6. La voie de signalisation PI3K/Akt est représentée en vert, celle de MEK/ERK, en bleu et celle de JNK, en mauve. Les inhibiteurs spécifiques de certains intermédiaires de ces voies de signalisation sont représentés en rouge.

### 2.5.1.3 Prolifération cellulaire

Nous savons maintenant que la protéine Gas6 favorise la prolifération de plusieurs types cellulaires tels que les cellules du muscle lisse vasculaire (67,111), les chondrocytes humain (76), les fibroblastes NIH 3T3 (112) et les cellules mésangiales du glomérule (102,113,114). En effet, le rôle prolifératif de Gas6 a été mis en évidence dans les fibroblastes NIH 3T3 lorsque ceux-ci sont en arrêt de croissance suite à une absence de sérum (112). Dans une étude de Goruppi *et al.* (112), il a été observé que près de 60% des fibroblastes traitées avec Gas6 entraient en phase de croissance, comparativement à 10% pour les fibroblastes non traités. De même, chez des souris où le gène *gas6* était éliminé, Yanagita *et al.* (114) ont observé une diminution de l'ordre de 85 % de la prolifération cellulaire du glomérule. Par ailleurs, la protéine exerce son action mitogénique en se liant au récepteur Axl (76,81,102,111,113-116). En effet, chez des rats où la liaison de la protéine Gas6 au récepteur Axl était bloquée, Yanagita *et al.* (102) ont montré une diminution de 89% de la prolifération des cellules mésangiales du glomérule.

Selon les données actuellement disponibles, l'interaction entre la protéine Gas6 et le récepteur Axl entraîne l'activation de deux voies de signalisation cellulaire, soit celles de MEK/ERK et de PI3K/Akt (61,100,101,117,118). Plus précisément, il a été observé que l'action de Gas6 passe par la voie de signalisation MEK/ERK dans des cellules de carcinome de la prostate (117), des glomérules provenant de rats atteints de néphropathie diabétique (101), les fibroblastes

cardiaques (100) et les cellules de Schwann humaines (61). Par exemple, dans une lignée de carcinome de la prostate mise en présence de Gas6 et de U0126, un inhibiteur spécifique de MEK (voir **figure 4**), Sainaghi *et al.* (117) ont noté une diminution de 47 à 86% du taux de prolifération de ces cellules. Précisons que dans cette lignée cellulaire, l'action de Gas6 passe également par la voie PI3K/Akt. Lorsque la wortmannin, un inhibiteur spécifique de PI3K (voir **figure 4**), était ajoutée à une culture de cellules de carcinome de la prostate, Sainaghi *et al.* (117) ont effectivement observé une diminution de 26 à 54% de leur taux de prolifération. D'autre part, dans les fibroblastes NIH 3T3, la protéine Gas6 agit via la cascade de signalisation de PI3K/Akt. En effet, lorsque ces cellules étaient mises en présence de Gas6 et de la wortmannin, le taux de prolifération était de 15%, comparativement à 50% dans les fibroblastes traités uniquement avec Gas6 (118).

En résumé, les travaux réalisés à ce jour indiquent que la protéine Gas6 favorise la prolifération d'une variété de cellules et que cette activité est médiée par le récepteur Axl, lequel active la voie de signalisation MEK/ERK et, dans certains types cellulaires, celle de PI3K/Akt.

#### 2.5.1.4 Différenciation cellulaire

Bien que limité, des travaux suggèrent également l'implication de la protéine Gas6 dans la différenciation cellulaire. La seule étude réalisée à ce jour a révélé que, dans une culture de péricytes vasculaires, la protéine Gas6 inhibe la différenciation

ostéogénique de ceux-ci, empêchant ainsi la formation de nodules minéralisés (119). Précisons que les péricytes peuvent se différencier en d'autres types cellulaires tels que les chondrocytes et les ostéoblastes (119). De plus, il semble que cette action différenciatrice de Gas6 requiert la présence du récepteur Axl à la surface cellulaire. En effet, Collett *et al.* (119) ont démontré que dans une culture de péricytes mis en présence de Gas6, 12 à 25% des nodules formés étaient minéralisés contre 75 à 90% lorsque la liaison de la protéine au récepteur Axl était bloquée. Ces résultats suggèrent donc un rôle protecteur de la protéine Gas6 en regard de la calcification de la paroi des vaisseaux sanguins.

#### 2.5.1.5 Survie cellulaire

En plus de ses actions prolifératrice et différenciatrice, la protéine Gas6 participe au cycle cellulaire en protégeant les cellules de l'apoptose, ou mort cellulaire programmée. Cette action antiapoptotique a entre autres été démontrée dans les cellules endothéliales du muscle lisse vasculaire (63,67), les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (120), les fibroblastes NIH 3T3 (112,121), les neurones gonadotropes (GnRH) (122) et les neurones de l'hippocampe (75). En effet, des travaux réalisés *in vitro* par Nakano *et al.* (63) ont révélé que dans les cellules du muscle lisse vasculaire, le taux de survie des cellules traitées à la protéine Gas6 était de l'ordre de 75%, comparativement à 5% dans les cellules non traitées (63). Par ailleurs, les évidences actuelles indiquent que cette action antiapoptotique de Gas6 est médiée par le récepteur Axl (75,76,79,86,112,116,121-127). Dans une culture de

cellules endothéliales pulmonaires exprimant ce récepteur, Healy *et al.* (79) ont effectivement observé une diminution de 54% du taux d'apoptose en présence de la protéine Gas6, comparativement aux cellules n'exprimant pas le récepteur Axl.

D'autre part, la protéine Gas6 exerce son action antiapoptotique en passant par la voie de signalisation PI3K/Akt (121-128) et, dans une moindre mesure, par celles de JNK (121) et de MEK/ERK (122). L'activation de la cascade de signalisation PI3K/Akt par Gas6 a entre autres été démontrée dans les oligodendrocytes humains (128). Lorsque ces derniers étaient mis en présence de Gas6 et d'un inhibiteur de Akt, le taux de mort cellulaire était de 70%, comparativement à 50% dans les cellules traitées uniquement avec Gas6. Des résultats semblables ont également été observés dans d'autres types cellulaires tels que les cellules du muscle lisse vasculaire (125,126), les cellules épithéliales du cristallin (127), les neurones GnRH (122) et les fibroblastes NIH 3T3 (121). Précisons toutefois que dans ce dernier type cellulaire, l'action de la protéine Gas6 emprunte également la voie de signalisation JNK (voir **figure 4**). Goruppi *et al.* (121) ont en effet observé l'activation de JNK dans les fibroblastes NIH 3T3 mis en présence de Gas6 alors qu'aucune activité de JNK n'était détectée dans ceux non traités. Par ailleurs, dans les neurones GnRH, la protéine Gas6 exerce son action antiapoptotique via la voie de signalisation MEK/ERK, en plus de celle de PI3K/Akt. En effet, lorsque Gas6 et un inhibiteur spécifique de MEK étaient ajoutés au milieu de culture, Allen *et al.* (122) ont noté une augmentation du taux d'apoptose des

neurones GnRH, lequel était de 12,8% dans ces cellules, comparativement à 4,8% dans les neurones traités uniquement avec Gas6.

En résumé, la protéine Gas6 protège les cellules de l'apoptose en se liant au récepteur Axl, à l'exception des neurones de l'hippocampe où elle semble se lier au récepteur Tyro-3. L'interaction entre la protéine et le récepteur Axl active la voie de signalisation PI3K/Akt et, dans une moindre mesure, celles de JNK et de MEK/ERK.

### *2.5.2 Fonctions cellulaires*

En plus de son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, les données actuellement disponibles indiquent que la protéine Gas6 est impliquée dans les fonctions plaquettaire et osseuse de même que dans la vision. Dans cette section, chacune des activités biologiques de Gas6 est présentée, ainsi que les voies de signalisation cellulaire impliquées.

#### 2.5.2.1 Fonction plaquettaire

Selon un nombre limité de travaux, la protéine Gas6 jouerait un rôle dans l'hémostase, et plus particulièrement dans la fonction plaquettaire. Plus spécifiquement, Gas6 stimulerait l'agrégation plaquettaire (92-94), une étape essentielle à la formation de caillots sanguins (94). Chez des souris où le gène *gas6*

était désactivé (Gas6<sup>-/-</sup>), Angelillo-Scherrer *et al.* (92) ont observé que la taille de thrombus, induits par la ligature de la veine cave abdominale, était de 60 à 85 % plus petite que celle de thrombus provenant de souris qui expriment Gas6. De plus, les souris Gas6<sup>-/-</sup> présentaient une dysfonction plaquettaire; l'agrégation des plaquettes sanguines de ces animaux était réversible alors qu'elle était irréversible chez les souris témoins (92). D'autre part, l'action de Gas6 en regard des plaquettes semble nécessiter la présence des trois récepteurs tyrosine kinases, soit Axl, Tyro-3 et Mer, à la surface cellulaire. En effet, dans une culture de plaquettes sanguines où l'un des trois récepteurs étaient éliminés (Axl<sup>-/-</sup>, Tyro-3<sup>-/-</sup>, et Mer<sup>-/-</sup>), Angelillo-Scherrer *et al.* (94) rapportaient une absence de phosphorylation par Gas6 des deux autres récepteurs. En revanche, Gas6 induisait leur phosphorylation dans les plaquettes exprimant les trois récepteurs. Par ailleurs, l'interaction entre la protéine Gas6 et ses récepteurs entraîne l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (voir **figure 4**) (93,94), laquelle a été observé dans les plaquettes sanguines provenant de souris témoins mais pas dans celles provenant des souris Axl<sup>-/-</sup>, Tyro-3<sup>-/-</sup> et Mer<sup>-/-</sup> (94).

#### 2.5.2.2 Fonction osseuse

D'autres travaux ont mis en évidence une implication de la protéine Gas6 dans la fonction osseuse, plus particulièrement dans la fonction des ostéoclastes (95,96). Des travaux menés par Nakamura *et al.* (95) ont révélé une augmentation de l'ordre de 2,5 fois de la résorption osseuse lorsque les ostéoclastes étaient traités avec Gas6. Notons que l'action ostéoclastique de la protéine Gas6 semble être associée à

l'activité des ostéoclastes plutôt qu'à leur nombre. En effet, dans une étude réalisée par Katagiri *et al.* (96) où une stimulation de la résorption osseuse par les ostéoclastes en présence de Gas6 était également observée, les auteurs n'ont noté aucune différence entre le nombre d'ostéoclastes traités avec Gas6 et ceux non traités. L'action ostéoclastique de la protéine Gas6 semble être médiée par le récepteur Tyro-3, ce dernier étant détecté dans les ostéoclastes (95,96), et emprunte la voie de signalisation MEK/ERK. En effet, en présence d'un inhibiteur spécifique de p42/p44 MAPK (voir **figure 4**), Katagiri *et al.* (96) ont observé une diminution de l'ordre de 70 % de la résorption osseuse par les ostéoclastes.

#### 2.5.2.3 Vision

Bien que peu nombreux, des travaux récents suggèrent un rôle de Gas6 dans la vision, particulièrement dans le maintien de l'intégrité rétinienne. Plus spécifiquement, Gas6 semble stimuler la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, laquelle est effectuée par les cellules épithéliales des pigments de la rétine (RPE) (97-99). Précisons que ce phénomène est nécessaire à la fonction et à la survie des photorécepteurs et se produit sur une base quotidienne (97). En revanche, une défaillance dans la fonction phagocytaire des cellules RPE résulte en la dégénérescence des photorécepteurs (97). D'autre part, il semble que l'action de Gas6 requiert la présence du récepteur Mer à la surface cellulaire. Des travaux menés par Hall *et al.* (97) révélaient que, lorsque des cellules RPE n'exprimant pas ce récepteur étaient mises en présence de Gas6, la phagocytose des segments externes

des photorécepteurs était inhibée. Par contre, les segments externes étaient phagocytés dans les cellules exprimant le récepteur Mer. Cette activité de la protéine Gas6 passe par l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (voir la **figure 4**). En effet, lorsque les cellules RPE étaient traitées avec un inhibiteur spécifique de PI3K, Hall *et al.* (99) ont observé une inhibition, dépendante de la dose, de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs.

### 3. PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIF

#### 3.1 PROBLÉMATIQUE

Comme nous venons de le voir, la protéine Gas6 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire de même que dans diverses fonctions cellulaires. Ces activités de la protéine pourraient avoir un impact important au cours du vieillissement. En effet, plusieurs maladies associées au grand âge découlent de désordres de l'homéostasie cellulaire, c'est le cas notamment du diabète et des désordres hémostatiques (coagulation). Toutefois, et comme mentionné précédemment, la protéine Gas6 a été très peu étudiée en fonction de la sénescence. D'autre part, des travaux ont révélé que la protéine Gas6 doit être carboxylée pour exercer son action. Or, malgré cette dépendance vis-à-vis de la vitamine K, aucune étude ne s'est penchée à ce jour sur l'effet modulateur de la vitamine K sur l'action de la protéine. À la lumière de ceci, l'effet de la vitamine K sur l'expression de la protéine Gas6 a donc été étudié chez des rates âgées de 6 et 22 mois ayant reçu une diète faible, adéquate ou enrichie en phylloquinone tout au long de leur vie.

### 3.2 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE

L'apport alimentaire de vitamine K influence les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 dans les tissus à différents stades de la vie.

### 3.3 OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'objectif de cette étude est le suivant :

Déterminer l'influence de l'apport vitaminique K sur la carboxylation de la protéine chez des rates âgées de 6 et 22 mois ayant été soumises à des régimes contenant des quantités variables de phylloquinone (faible : 80 µg/kg diète; adéquate : 500 µg/kg diète; enrichie : 2000 µg/kg diète).

### III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 1. ANIMAUX ET DIÈTES

Cette étude a été approuvée par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal en accord avec les lignes directrices du Conseil Canadien de la protection des animaux. Des rates Sprague-Dawley âgées de 4 semaines et ayant un poids corporel de 50-70 g ont été obtenues de Charles Rivers Canada (St-Constant, QC) et maintenues en groupes de trois dans des cages grillagées suspendues. Les animaux étaient logés dans une salle gardée à 22 °C et munie d'un cycle jour-nuit de 12 heures. Les rates avaient accès à de l'eau et à de la nourriture à volonté. Au cours de la première semaine (adaptation), les animaux ont reçu une diète standard avant d'être répartis au hasard en trois groupes : diète faible (F; 80 µg/kg) (n = 30), adéquate (A; 500 µg/kg) (n = 30) ou enrichie (E; 2000 µg/kg) (n = 30) de phylloquinone (K<sub>1</sub>). Les diètes étaient préparées au laboratoire à partir des ingrédients de base (**Tableau I**) et leur teneur en K<sub>1</sub> était déterminée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les teneur en K<sub>1</sub> de chacune des diètes était de (moyenne ± écart-type, n = 5 à 6) 90.7 ± 7.5, 513.5 ± 15.0 et 2022.3 ± 59.9 µg respectivement. La consommation alimentaire et le poids corporel des animaux étaient notés à chaque deux semaines.

À l'âge de 6 et 22 mois, les rates ont été anesthésiées au pentobarbital à raison de 5 mg / 100 g de poids corporel puis saignées à partir de l'aorte abdominale. Le

cœur, le foie, les ovaires, le poumon et le rein ont rapidement été prélevés, congelés immédiatement dans l'azote liquide puis conservés à  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment des analyses.

## 2. ANALYSES DE LA VITAMINE K

La vitamine K a été quantifiée par HPLC après une réduction de sa forme naturelle (quinone) en sa forme réduite (hydroquinone), laquelle a ensuite été quantifiée par détection en fluorescence (21). La  $K_1$  et la ménaquinone-4 (MK-4) utilisées pour les standards ont été achetées de Sigma Chemicals (St Louis, MO). Tous les solvants utilisés pour l'extraction tissulaire et la chromatographie étaient de qualité HPLC et ont été achetés de Fischer Scientific Canada (Nepean, ON). De plus, tout le matériel de verre utilisé lors du dosage était nettoyé avec une solution composée des acides chromique et sulfurique. Le système de chromatographie était composé d'un injecteur automatique (Modèle 717, Waters, Mississauga, ON), d'une pompe (Modèle 600E, Waters) et d'un détecteur à fluorescence (Modèle L-7480, Hitachi). La colonne analytique ( $150 \times 4,6\text{ mm}$ ) était de type C-18, ODS-Hypersil  $3\text{ }\mu\text{m}$  (Keystone Scientific, Belfonte, PA). Après leur séparation sur cette dernière, les quinones injectées passaient dans une colonne de zinc ( $2,0 \times 50\text{ mm}$ ; poudre de zinc (100 mesh, Alpha Aesar, Wardhill, MA)), où des dérivés fluorescents étaient produits proportionnellement à la quantité de vitamine K présente (longueurs d'onde d'émission :  $418\text{ nm}$  et d'excitation :  $248\text{ nm}$ ).

Les standards étaient préparés dans du méthanol de qualité HPLC et leur concentration ( $\mu\text{g}$  / unité de densité optique) était vérifiée par spectrophotométrie (longueur d'onde de la  $K_1$  : 248 nm, et de la MK-4 : 243 nm) puis confirmée par chromatographie (longueurs d'onde d'émission : 418 nm et d'excitation : 248 nm) avant leur utilisation. Le standard utilisé pour le calibrage consistait en un mélange de  $K_1$ , de MK-4 et de  $K_1H_2$  dont la concentration était de 2,2  $\mu\text{mol}$  / 50 mL. Tous les standards étaient conservés à 4°C et protégés de la lumière afin d'éviter la déperdition de la vitamine. D'ailleurs, toutes les opérations entourant le dosage de la vitamine K ont été exécutées sous un éclairage jaune, cette longueur d'onde ne détruisant pas la vitamine.

**Extraction lipidique des tissus.** Chaque échantillon de tissu était pesé et pulvérisé à l'aide d'un pilon et d'un mortier dans du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre (10 fois le poids de l'échantillon). La poudre était ensuite transférée dans un tube de verre et un standard interne composé de 2,2  $\mu\text{mol}$  / 50  $\mu\text{L}$  dihydrophyloquinone ( $K_1H_2$ ; un don du laboratoire de la Vitamine K, *Jean Mayer, USDA Human Nutrition Research Center on Aging* à Tufts University, Boston) était ajouté suivi de 10 mL d'acétone. Ce mélange était extrait pendant une heure à l'aide d'un agitateur horizontal. Après centrifugation ( $500 \times g$  à 4 °C pendant 10 min), la couche d'acétone était retirée et évaporée sous azote à 45 °C. Le résidu solide était ensuite réextrait dans 6 mL d'hexane et 2 mL d'eau en agitant vigoureusement pendant trois minutes, puis les couches étaient séparées par centrifugation et la couche d'hexane était retirée et

évaporée sous azote. Le résidu était ensuite redissout dans 2 mL d'hexane pour la phase d'extraction solide, laquelle permettait la purification des échantillons.

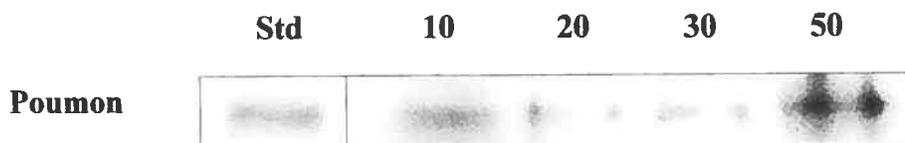
**Purification des échantillons.** Pour cette étape, des colonnes de gel de silice de 3 mL (JT Baker Inc., Phillipsburg, NJ) étaient d'abord conditionnées avec 8 mL d'un mélange d'hexane-éther diéthylique (97:3, v/v) suivi de 8 mL d'hexane. L'extrait d'hexane de 2 mL, obtenu à l'étape précédente, était ensuite appliqué sur la colonne puis rincé avec 8 mL d'hexane. La fraction de  $K_1$  et de MK-4 était éluée avec 8 mL d'hexane-éther diéthylique (97:3, v/v) puis évaporée sous azote et le résidu était dissout dans 200 mL de la phase mobile, laquelle était composée de 94,5% de méthanol, 5% de chlorure de méthylène, 0,5% de phase aqueuse (10 mmol/L de chlorure de zinc, 10 mmol/L d'acide acétique et 5 mmol/L d'acétate de sodium). Vingt à 50  $\mu$ L des échantillons étaient injectés dans le système de chromatographie. Le pourcentage de recouvrement des échantillons était calculé à partir du standard interne et variait entre 75 et 90%. Le logiciel Millennium (Waters) a été utilisé pour l'intégration et la quantification des pics chromatographiques.

### 3. EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 PAR IMMUNOBUVARDAGE

L'expression de la protéine Gas6 a été déterminée par immunobuvardage, laquelle permettait la séparation selon leur poids moléculaire d'une quantité connue de protéines et s'effectuait sur un gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes. La détection de la protéine Gas6 a été réalisée à l'aide de deux

anticorps : un anticorps anti-Gas6 et un anticorps anti-Gla. Le premier permettait de déterminer l'expression de la protéine totale alors que le deuxième reconnaissait les résidus Gla contenus dans la protéine, lesquels sont formés lors de la réaction de carboxylation. L'expression de Gla constituait ainsi un indice du degré d'activité biologique de la protéine Gas6. Précisons qu'il n'existe pas actuellement sur le marché d'anticorps capable de détecter les différentes formes – totalement ou partiellement carboxylée – de la protéine Gas6. Tous les solvants utilisés pour l'immunobuvardage étaient achetés de Fischer Scientific Canada (Nepean, ON) et de Sigma Chemicals (St Louis, MO).

Quelques aspects de la technique d'immunobuvardage ont dues être mises au point avant le début des expériences. Un des éléments importants consistait en la détermination de la quantité de protéines devant être appliquée sur le gel afin de permettre une détection optimale de la protéine Gas6. Dix, 20, 30 et 50  $\mu\text{g}$  de protéines totales ont ainsi été testés avec chacun des anticorps et pour chacun des organes étudiés. L'exemple du poumon est présenté à la **figure 5**.



**Figure 5.** Expression de la protéine Gas6 dans le poumon telle que détectée par l'anticorps anti-Gla. Des quantités variables de protéines totales (10, 20, 30 et 50  $\mu\text{g}$ ) ont été appliquées sur le gel de polyacrylamide. Std : standard positif de Gas6 constitué d'un échantillon de la protéine Gas6 surexprimée générée dans une culture cellulaire.

Au terme de ces essais, une quantité de 50 µg de protéines totales était retenue comme étant optimale. Toutes les autres étapes de mise au point de la technique d'immunobuvardage (ex. concentration du gel de polyacrylamide, détermination de la concentration des anticorps) ont été réalisées au laboratoire avant mon arrivée.

**Échantillons.** Les tissus congelés de chacun des organes étaient homogénéisés dans une solution composée de 50 mM Tris de pH 7.5, de 150 mM EDTA, de 1% Triton X-100, de 0,5% NP-40 et d'inhibiteurs de protéases (Protease Arrest cocktail, Calbiochem, San Diego, CA) puis centrifugés à haute vitesse (14 000 rpm) à 4°C pendant 3 minutes. Le surnageant était ensuite recueilli et la concentration de protéines des échantillons y était mesurée à l'aide d'une trousse BioRad (méthode Bradford, Mississauga, ON). Une courbe étalon d'albumine de sérum bovin avait été préalablement générée à cette fin. Avant d'être déposés sur le gel, 50 µg de chaque échantillon étaient d'abord incubés avec une solution A [1,25 M Tris à un pH 6,8, 8% glycérol, 34,6 mM sodium dodécylsulfate (SDS), bleu de bromophénol (permettant la visualisation des échantillons lors de leur migration sur le gel) et 5% β-mercaptoéthanol (pour briser les ponts disulfures des protéines)] dans un ratio échantillon:solution de 5:1 (v:v) pendant 20 minutes sur glace. Les échantillons étaient ensuite bouillis durant 4 minutes puis refroidis sur glace durant 20 minutes. Ces derniers étaient par la suite appliqués sur un gel de polyacrylamide 10% contenant 3,5 mM SDS. La partie supérieure de ce dernier était constituée d'un gel de polyacrylamide 1,3% contenant 3,5 mM SDS; cette section permettait aux protéines de se concentrer et ainsi migrer en même temps au travers du gel de polyacrylamide

10%. La séparation des protéines selon leur poids moléculaire, aussi appelée électrophorèse, s'effectuait dans une solution tampon composée de 192 mM glycine, de 25 mM Tris et de 1,7 mM SDS à 120 volts durant environ 1h30. Au terme de l'électrophorèse, les protéines étaient transférées sur une membrane de polyfluorure de vinyldène pour l'immunoempreinte.

**Immunoempreinte.** Les membranes étaient d'abord conditionnées à la température ambiante dans 100% méthanol durant 1 minute puis dans une solution tampon composée de 25 mM Tris, de 192 mM glycine et de 20% méthanol durant 15 minutes. Le transfert des protéines était de type « semi-sec » et s'effectuait à 10 volts durant 1h30. Les membranes étaient ensuite saturées dans une solution de poudre de lait écrémé à une concentration de 5% toute la nuit à 4°C sur une plaque agitatrice. Les membranes étaient rincées quatre fois dans une solution de PBS avec 1% de Tween 20 (PBS-T) durant 10 minutes à la température ambiante; la solution PBS-T était changée entre chaque lavage. Il convient de préciser que toutes les opérations subséquentes étaient réalisées à la température ambiante. Les membranes étaient ensuite incubées pendant une heure dans une solution de PBS-T contenant soit l'anticorps anti-Gas6 (dilué à 1:2500, fourni généreusement par Dre Anne Prieto, Indiana University (29)) ou l'anticorps anti-Gla (dilué à 1:25 000, American Diagnostica, Montréal, QC). Les membranes étaient ensuite rincées avec la solution de PBS-T (4 X 10 minutes) puis incubées pendant 1 heure dans une solution de PBS-T contenant un deuxième anticorps lié à la peroxydase du raifort. Le signal était visualisé à l'aide d'une trousse de détection potentialisant la chimioluminescence

(ECL Plus, Amersham Corp, Baie d'Urfé, QC) et les bandes étaient quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ du NIH. Les bandes détectées à l'aide de l'anticorps anti-Gas6 représentaient l'expression de la protéine Gas6 totale alors que celles obtenues avec l'anticorps anti-Gla représentaient l'expression de la protéine carboxylée; les termes « protéine Gas6 totale » et « protéine Gas6 carboxylée » seront utilisés par la suite afin d'alléger le texte.

**Présentation des résultats relatifs à l'effet de l'apport en vitamine K sur les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6.** Le but de ces expériences était de déterminer dans quelle mesure l'apport vitaminique  $K_1$  influence la carboxylation de la protéine Gas6 chez des rates âgées de 6 et 22 mois. Pour ce faire, chaque organe a été testé séparément. Sur chacun des gels générés, les échantillons étaient disposés de la façon suivante : pour chaque groupe d'âge, les échantillons correspondant aux diètes faible, adéquate et enrichie en  $K_1$  étaient appliquées de gauche à droite, tel qu'illustré à la **figure 6**. Chacune des expériences étaient réalisées en triplicata (trois séries d'animaux distincts) afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.



**Figure 6.** Expression de la protéine Gas6 telle que détectée par l'anticorps anti-Gla dans le coeur de rates âgées de 6 et 22 mois. F : diète faible, A : diète adéquate, E : diète enrichie en phyloquinone.

L'effet de l'apport en  $K_1$  sur les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 a été déterminé, à chacun des âges, en comparant les données densitométriques des groupes F, A et E, les unes par rapport aux autres. Toutefois, étant donné que trois séries de gels étaient générées par organe et compte tenu du fait que les données provenant de gels différents ne peuvent être comparées directement, les données densitométriques ont été transformées en utilisant le groupe A comme groupe de référence. Des données « relatives » ont ainsi été générées pour chacun des gels. Par exemple, considérant les données densitométriques suivantes :

<u>Diète</u>	<u>6 mois</u>	<u>22 mois</u>
F :	2820	2369
A :	3443	4434
E :	5142	8013

l'expression relative de la forme carboxylée de la protéine correspondant au groupe F, 6 mois, aurait été de :

$$\frac{\text{diète F}}{\text{diète A}} = \frac{2820}{3443} = 0,82$$

De même, celle du groupe E, 22 mois, aurait été de :

$$\frac{\text{diète E}}{\text{diète A}} = \frac{8013}{4434} = 1,81$$

Les données générées pour l'ensemble des trois gels ont ensuite été regroupées et une moyenne a été calculée pour chacun des groupes (âge et diète). L'effet de l'apport en  $K_1$  sur les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 a ensuite été testé en vérifiant le degré de corrélation existant entre les valeurs d'expression relative moyennes de tous les organes et leurs concentrations moyennes de vitamine K. Plus spécifiquement, des corrélations, en échelle semi-logarithmique, ont été établies entre les moyennes relatives des taux d'expression de Gas6 carboxylée et la vitamine K totale, la MK-4 et la  $K_1$  à 6 mois et à 22 mois. Toutefois, comme les données du groupe A étaient arbitrairement fixées à 1 (groupe de référence), ces corrélations incluent uniquement les valeurs des groupes F et E.

#### 4. ANALYSES STATISTIQUES

Les données présentées sont la moyenne  $\pm$  SEM. Le degré d'association entre l'expression des formes carboxylée ou totale de la protéine Gas6 et la vitamine K totale, la MK-4 et la  $K_1$  a été déterminée par des corrélations de Spearman en échelle semi-logarithmique (une procédure statistique). L'effet de l'âge sur la modulation de la vitamine K sur l'expression de la forme carboxylée de Gas6 a été déterminé par une ANOVA factorielle en fonction de l'âge et de la diète. Les concentrations tissulaires de vitamine K ont été analysées pour chacun des organes en fonction des diètes par une ANOVA à une voie en utilisant le logiciel Sigmatat version 2.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Les différences étaient considérées statistiquement significatives à  $p < 0.05$ .

**Tableau I : Composition des diètes (g/kg de diète)**

Caséine (sans vitamine)	220
Sucrose	485
Fécule de maïs	150
Cellulose	46
Huile de maïs	50
Mélange de minéraux AIN-76 <sup>1</sup>	35
DL méthionine	3
Mélange de vitamine AIN-76 sans vitamine K <sup>2</sup>	10

<sup>1</sup> Composition du mélange de minéraux (g/kg) provenant de ICN Biochemicals Canada: Phosphate bicalcique, 500; Chlorure de sodium, 74; Citrate de potassium monohydrate, 220; Sulfate de potassium, 52; Oxyde de magnésium, 24; Carbonate de manganèse, 3.5; Citrate de fer, 6; Carbonate de zinc, 1.6; Carbonate cuprique, 0.3; Iodate de potassium, 0.01; Sélénite de sodium, 0.01; Sulfate de chrome et de potassium, 0.55; Sucrose, 118.

<sup>2</sup> Composition du mélange de vitamines (g/kg) provenant de ICN Biochemicals Canada: Chlorhydrate de thiamine, 0.6; Riboflavine, 0.6; Chlorhydrate de pyridoxine, 0.7; Acide nicotinique, 3; D-pantothénate de calcium, 1.6; Acide folique, 0.2; D-Biotine, 0.02; Cyanocobalamine, 0.001; Palmitate de rétinyle, 1.6; Acétate de DL-alpha-Tocophérol, 20; Colécalciférol, 0.25; Sucrose, 973.

## IV. RÉSULTATS

### 1. CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE PHYLLOQUINONE ( $K_1$ ), DE MÉNAQUINONE-4 (MK-4) ET DE VITAMINE K TOTALE

Les concentrations de vitamine K totale (VK totale :  $K_1$  + MK-4), de MK-4 et de  $K_1$  dans le cœur, le foie, l'ovaire, le poumon et le rein provenant des rates âgées de 6 et 22 mois sont illustrées à la **figure 7**. Un effet significatif de la diète est observé dans tous les organes étudiés, les concentrations tissulaires de VK totale, de MK-4 et de  $K_1$  augmentant en fonction de l'apport alimentaire de  $K_1$  dans chaque cas ( $p < 0,001$ ). En effet, concernant la VK totale, la teneur tissulaire augmente en moyenne de 2,3 à 3,8 fois entre les groupes F et A, et de 2,4 à 2,8 fois entre les groupes A et E. D'autre part, les concentrations tissulaires de  $K_1$  varient de façon plus marquée en fonction de la diète que celles de la MK-4, augmentant en moyenne de 4,3 à 7,0 fois entre les groupes F et A, et de 3,3 à 3,9 fois entre les groupes A et E. Pour la MK-4, les niveaux tissulaires augmentent en moyenne de 1,8 à 2,8 fois entre les groupes F et A, et d'environ deux fois entre les groupes A et E.

Indépendamment de la diète, les concentrations de VK totale sont plus élevées dans l'ovaire et dans le foie. À l'inverse, les concentrations les plus faibles sont observées dans le rein et le poumon. Par ailleurs, dans tous les organes à l'exception du foie, la MK-4 est présente en quantité plus élevée que la  $K_1$ , contribuant de 68 à 92 % de la VK totale pour les animaux de 6 et de 22 mois

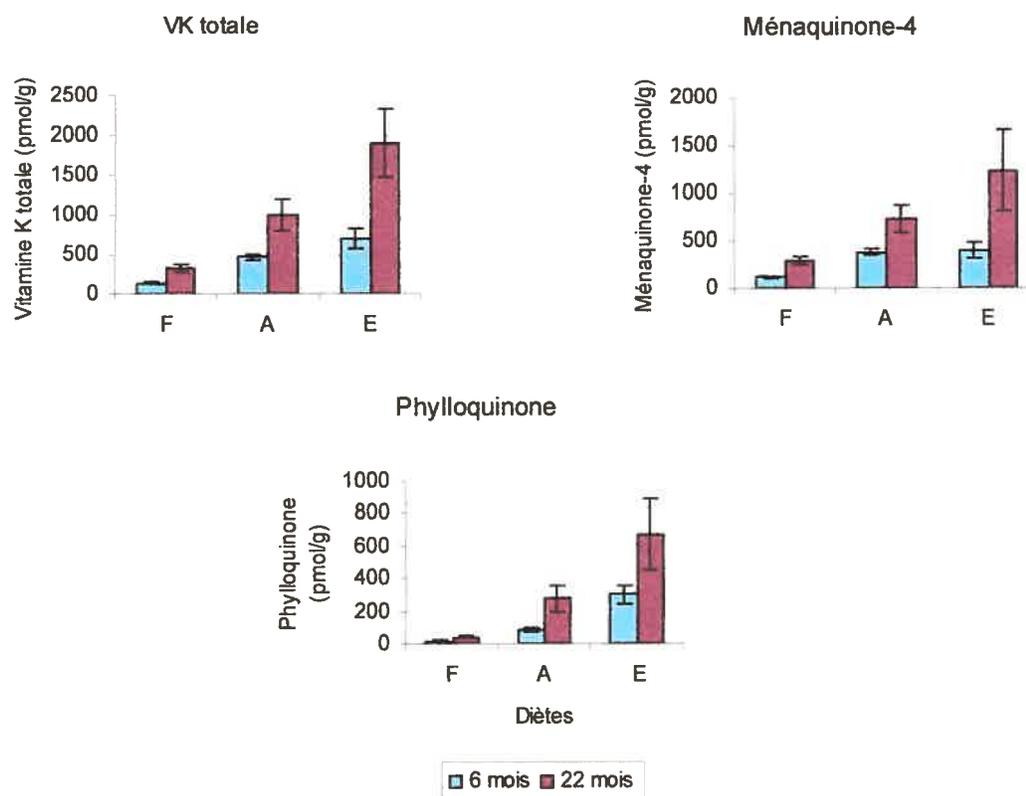
(ovaire : 75%, cœur : 68-70%, rein : 90-92%, poumon : 80-83%). À l'inverse, dans le foie, la  $K_1$  représente 75 à 80 % de la VK totale.

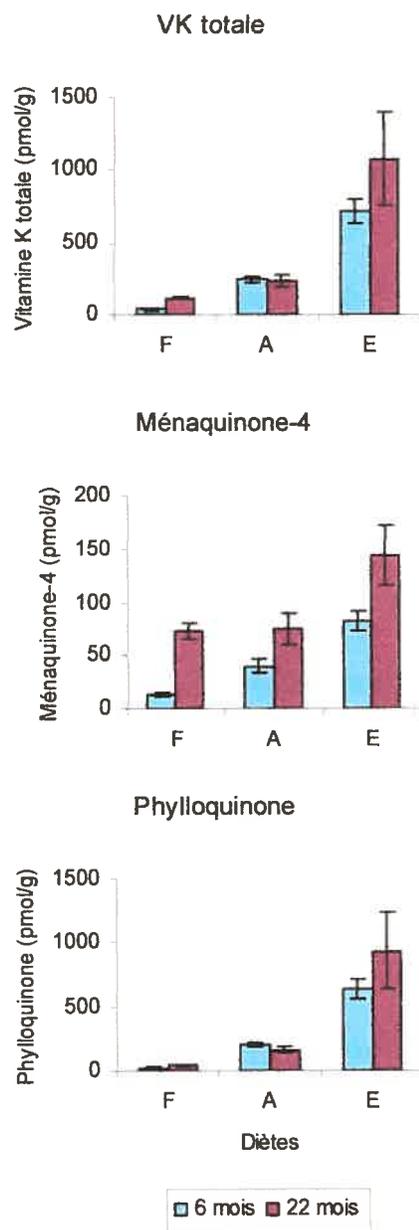
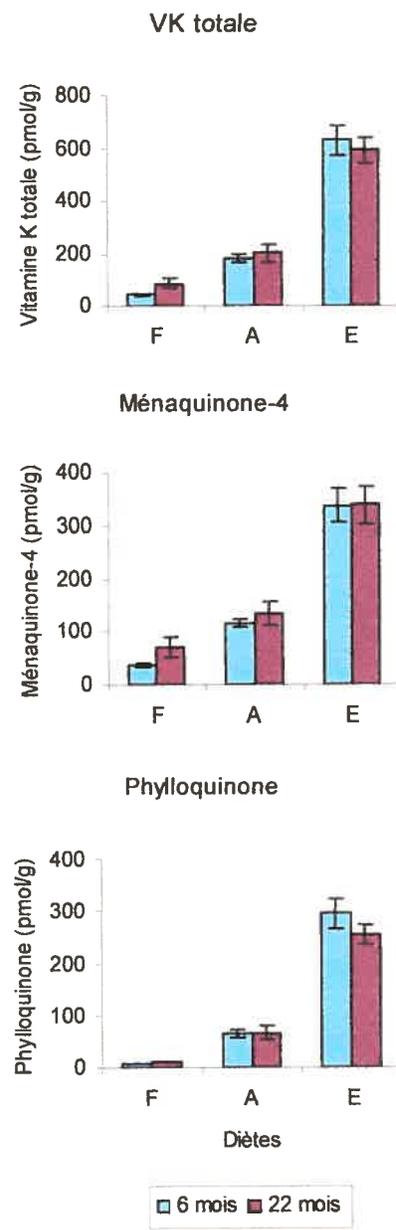
La teneur tissulaire des différentes formes de la vitamine K varie également en fonction de l'âge. En effet, dans l'ovaire (**figure 7A**) et le rein (**figure 7D**), les concentrations de VK totale, de MK-4 et de  $K_1$  étaient plus élevées chez les animaux âgés de 22 mois comparativement à ceux âgés de 6 mois (ovaire : VK totale et MK-4,  $p < 0,001$ ;  $K_1$ ,  $p < 0,05$ ; rein : VK totale,  $p < 0,01$ ; MK-4,  $p < 0,05$ ;  $K_1$ ,  $p < 0,001$ ). Dans le foie, seule la teneur tissulaire de MK-4 augmentait en fonction de l'âge ( $p < 0,05$ , **figure 7B**). Aucun effet de l'âge n'a été observé pour les teneurs tissulaires de VK totale, de MK-4 et de  $K_1$  dans le cœur et le poumon (**figure 7C et 7E**).

En somme, les concentrations tissulaires de vitamine K (VK totale, MK-4 et  $K_1$ ) augmentent en fonction de l'apport alimentaire de  $K_1$  dans tous les organes testés. L'augmentation des niveaux tissulaires est plus marquée pour la  $K_1$  que la MK-4. Toutefois, à l'exception du foie, la  $K_1$  ne constitue pas la forme prédominante de vitamine K dans les tissus, la MK-4 étant le vitamère le plus abondant. Les teneurs tissulaires de vitamine K (VK totale, MK-4 et  $K_1$ ) augmentent également en fonction de l'âge dans l'ovaire et le rein, dans le foie, cet effet étant observé uniquement pour la MK-4.

**Figure 7.** Concentrations tissulaires de la vitamine K totale (phylloquinone + ménaquinone-4), de la ménaquinone-4 et de la phylloquinone dans les organes de rates âgées de 6 et 22 mois. Des différences significatives pour la vitamine K totale, la ménaquinone-4 et la phylloquinone ont été observées entre les diètes (F, A, E) dans tous les organes pour les groupes de 6 et de 22 mois ( $p < 0,001$ ). Un effet significatif de l'âge a été observé dans l'ovaire (VK totale et MK-4,  $p < 0,001$ ;  $K_1$ ,  $p < 0,05$ ), le rein (VK totale,  $p < 0,01$ ; MK-4,  $p < 0,05$ ;  $K_1$ ,  $p < 0,001$ ) et le foie (MK-4,  $p < 0,05$ ).

### A. Ovaire

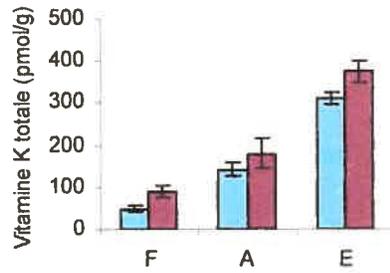


**B. Foie****C. Coeur**

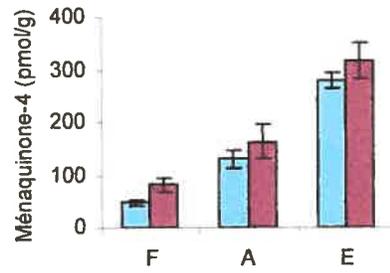
D.

Rein

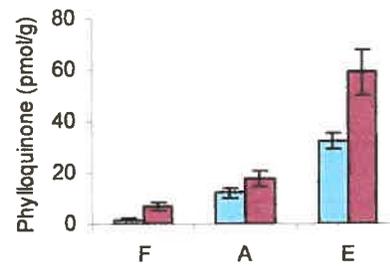
VK totale



Ménaquinone-4



Phylloquinone



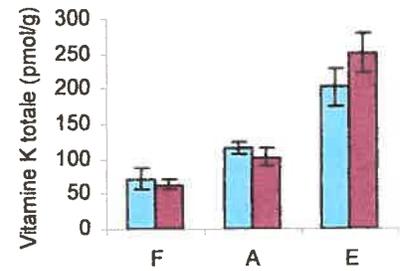
Diètes

6 mois	22 mois
--------	---------

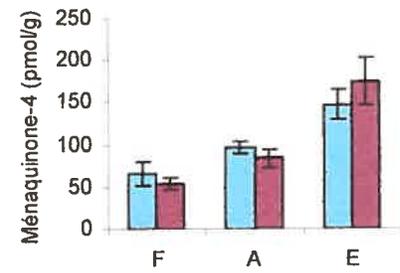
E.

Poumon

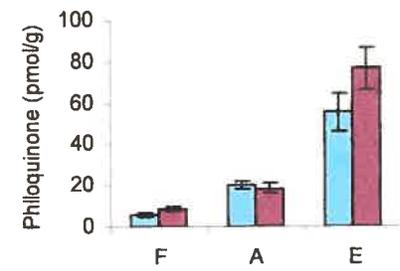
VK totale



Ménaquinone-4



Phylloquinone



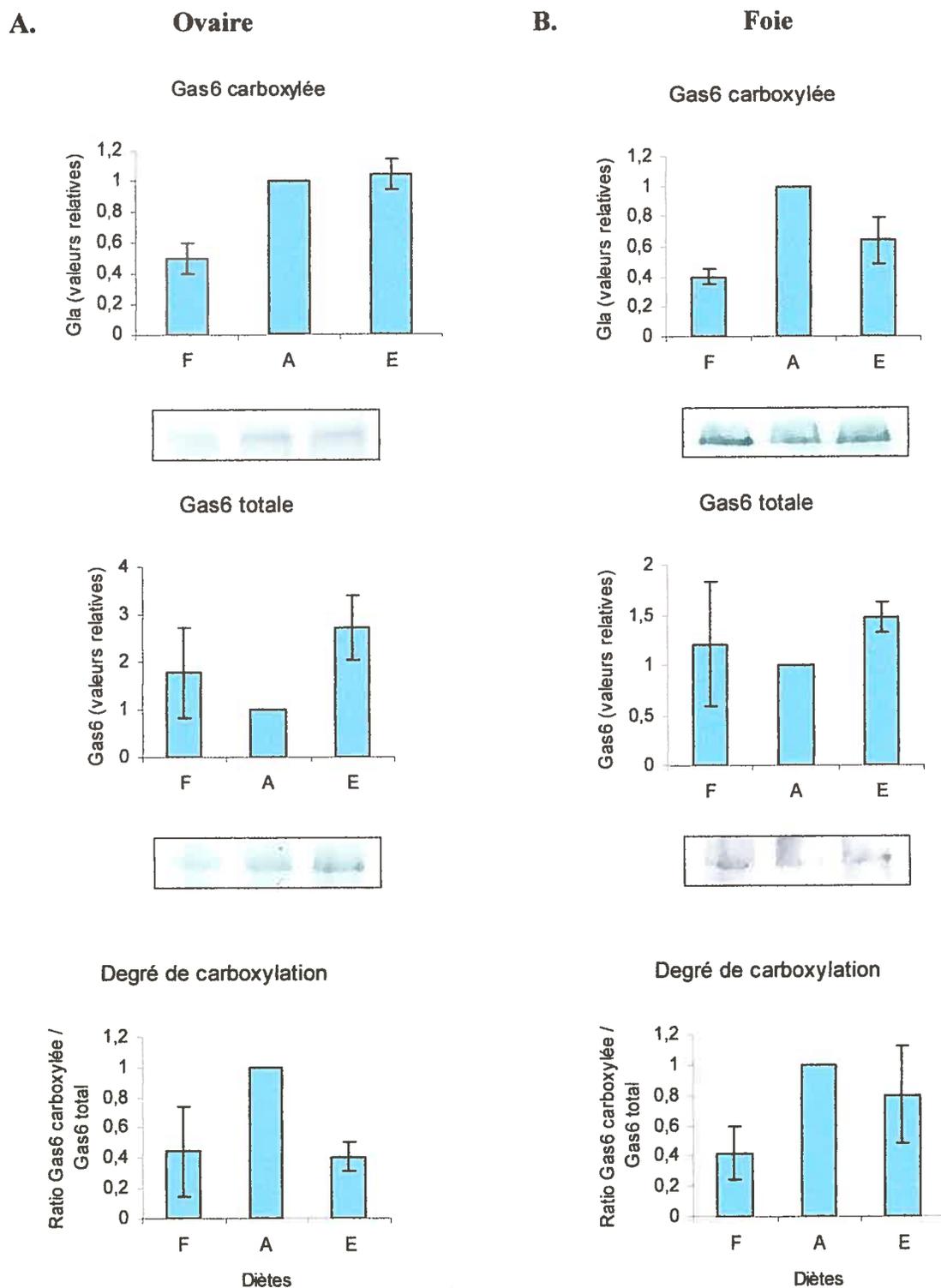
Diètes

6 mois	22 mois
--------	---------

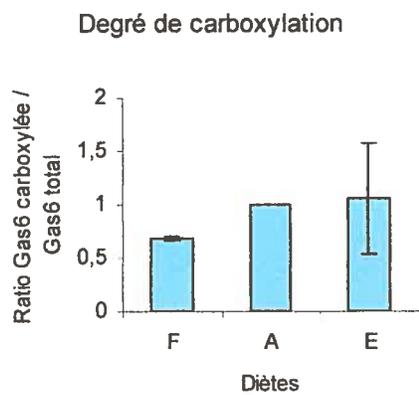
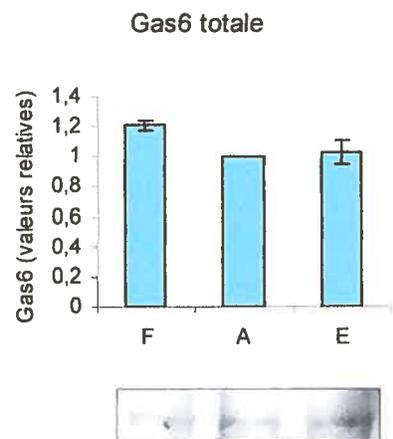
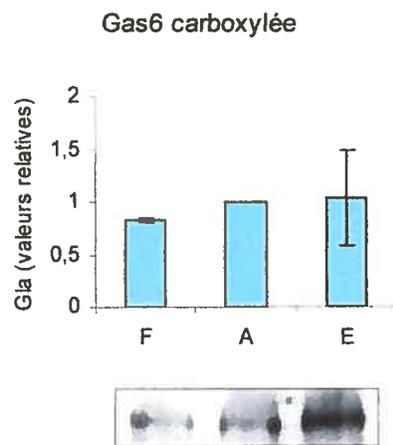
## 2. EXPRESSION TISSULAIRE DES FORMES TOTALE ET CARBOXYLÉE DE LA PROTÉINE GAS6

L'expression des formes carboxylée et totale de la protéine Gas6 de même que le ratio de ces deux formes (degré de carboxylation) de la protéine dans le cœur, le foie, l'ovaire, le poumon et le rein chez des rates âgées de 6 et 22 mois sont présentés aux **figures 8 et 9**, respectivement. L'identité de Gas6 a été authentifiée à l'aide d'un échantillon de la protéine Gas6 surexprimée dans une culture cellulaire (généreusement fourni par Dre Anne Prieto, Indiana University). Le degré de carboxylation de la protéine Gas6 représente le ratio entre l'expression de la forme carboxylée et celle de la forme totale. Comme on peut le constater, les deux formes de la protéine sont détectées dans tous les organes. Aucun effet statistiquement significatif de la diète n'a été observé sur l'expression des formes carboxylée et totale de la protéine Gas6, de même que sur son degré de carboxylation, dans les cinq organes testés. Malgré cela, les taux d'expression de la forme carboxylée de Gas6 ont tendance à augmenter en fonction de la diète dans l'ensemble des organes des animaux âgés de 6 et 22 mois, à l'exception du poumon à 22 mois, où une tendance inverse est observée. Bien que non significatif, l'effet de la diète sur l'expression de la forme totale de la protéine diffère d'un organe à l'autre. Enfin, il semble que le degré de carboxylation de la protéine Gas6 ait tendance à augmenter en fonction de la diète dans le foie, le cœur et le poumon chez les animaux âgés de 6 mois, et dans tous les organes chez ceux âgés de 22 mois, à l'exception du poumon.

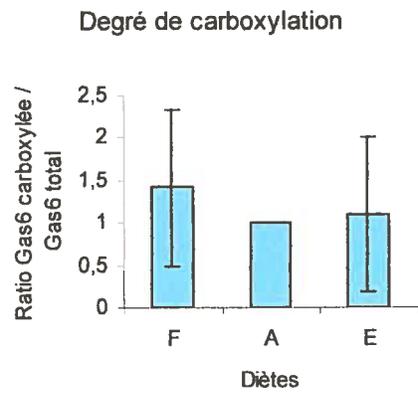
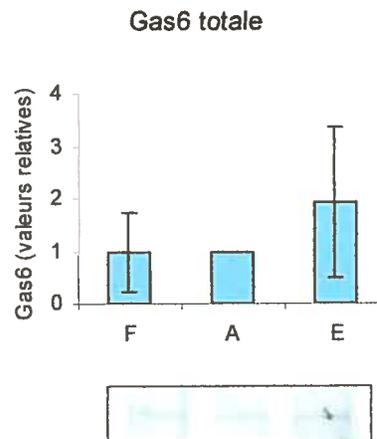
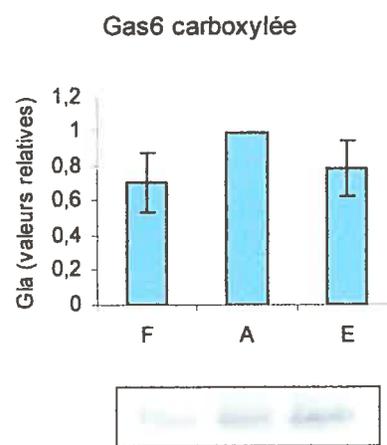
**Figure 8.** Expression tissulaire de la forme totale, de la forme carboxylée et du degré de carboxylation de la protéine Gas6 dans les organes de rates âgées de 6 mois.

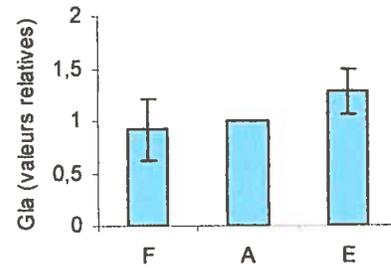
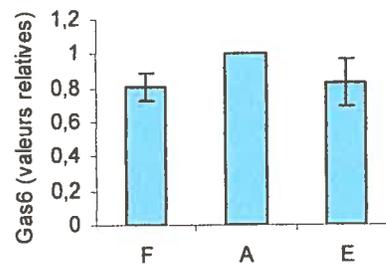
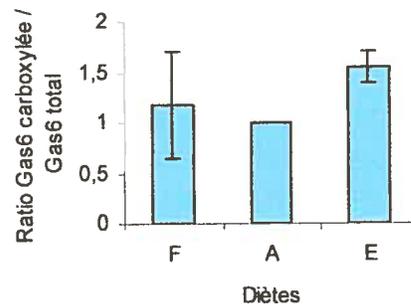


### C. Coeur

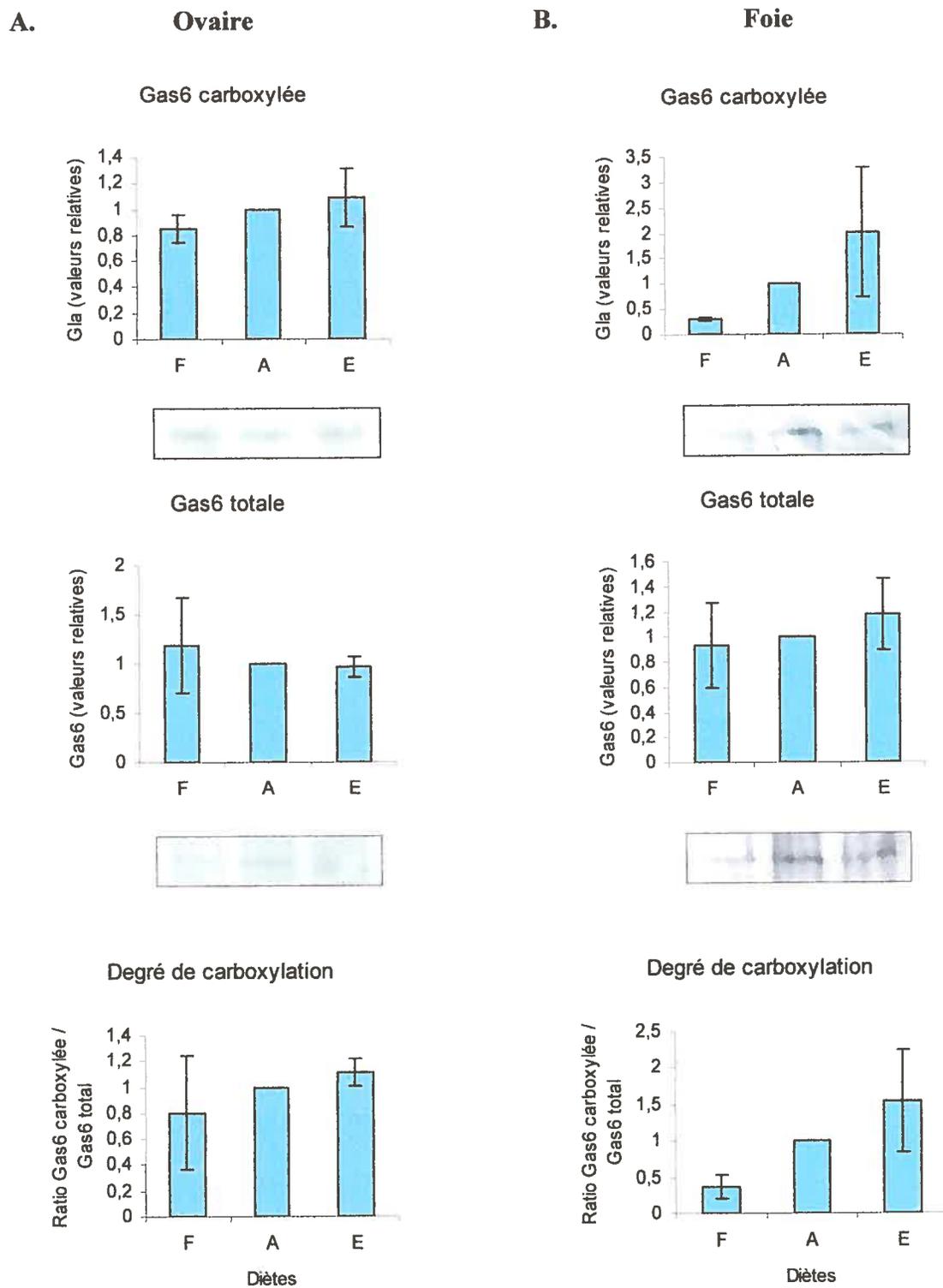


### D. Rein



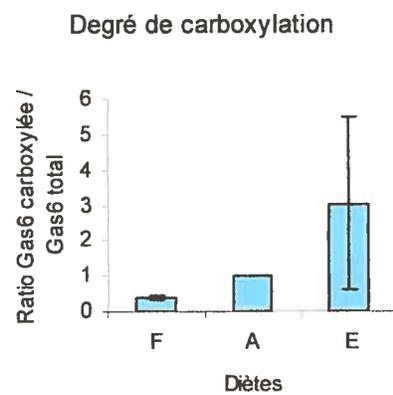
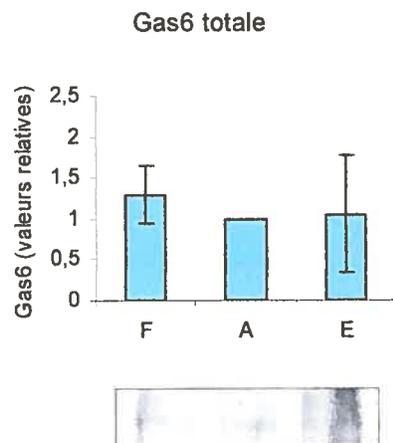
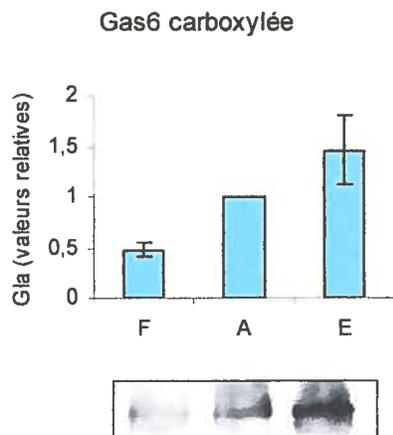
**E. Poumon****Gas6 carboxylée****Gas6 totale****Degré de carboxylation**

**Figure 9.** Expression tissulaire de la forme totale, la forme carboxylée et du degré de carboxylation de la protéine Gas6 dans les organes de rates âgées de 22 mois.



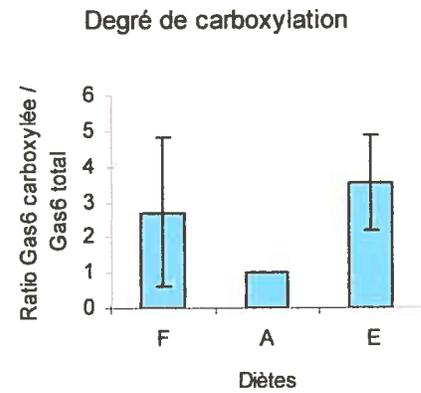
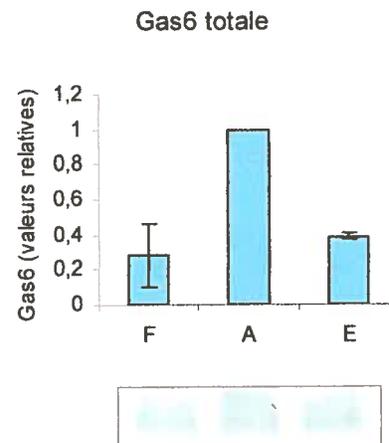
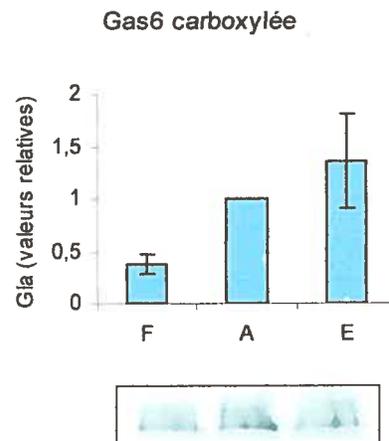
C.

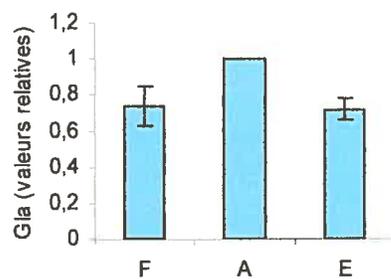
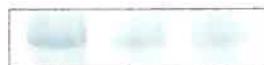
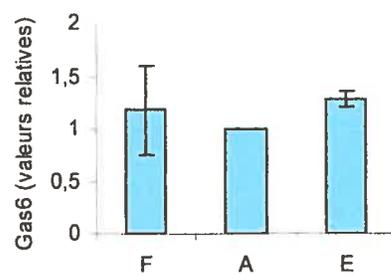
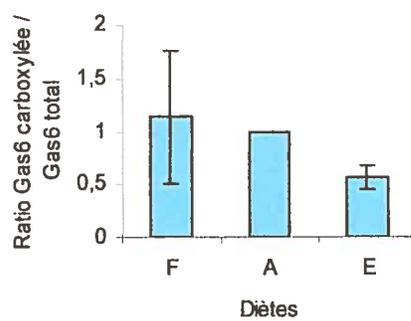
Coeur



D.

Rein



**E. Poumon****Gas6 carboxylée****Gas6 totale****Degré de carboxylation**

### 3. RELATION ENTRE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 CARBOXYLÉE ET LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE VITAMINE K

Des corrélations entre les taux moyens d'expression de la protéine Gas6 carboxylée et les concentrations tissulaires moyennes de VK totale, de MK-4 et de K<sub>1</sub> ont été établies pour les animaux âgés de 6 mois et de 22 mois (n = 3 animaux / groupe) et en incluant les données des cinq organes étudiés (cœur, foie, poumon, ovaire et rein). Ces relations ont été analysées par diverses fonctions mathématiques (linéaire, logarithmique, échelle semi-logarithmique, exponentielle et de puissance) et la fonction en échelle semi-logarithmique s'est avérée celle révélant les plus fortes associations, elle a donc été retenue (procédure statistique). La **figure 10** illustre les courbes obtenues pour chacune des formes de vitamine K et un sommaire des résultats obtenus est présenté au **tableau II**.

Des corrélations positives sont observées entre les taux d'expression de Gas6 carboxylée et la VK totale tissulaire pour les groupes de 6 mois et 22 mois (6 mois :  $r = 0,556$ ,  $p < 0,05$ ; 22 mois :  $r = 0,668$ ,  $p < 0,01$ ), indiquant une augmentation des niveaux d'expression de Gas6 carboxylée en fonction de la concentration tissulaire de VK totale (**figure 10A**). D'autre part, les taux d'expression de Gas6 carboxylée sont également corrélés de façon positive à la MK-4 tissulaire cette fois pour les deux groupes (6 mois :  $r = 0,671$ ,  $p < 0,01$ ; 22 mois :  $r = 0,740$ ,  $p < 0,001$ ) (**figure 10B**). Notons que les coefficients de corrélations sont plus élevés que ceux obtenus pour la VK totale. En revanche, pour la VK totale, les taux d'expression de

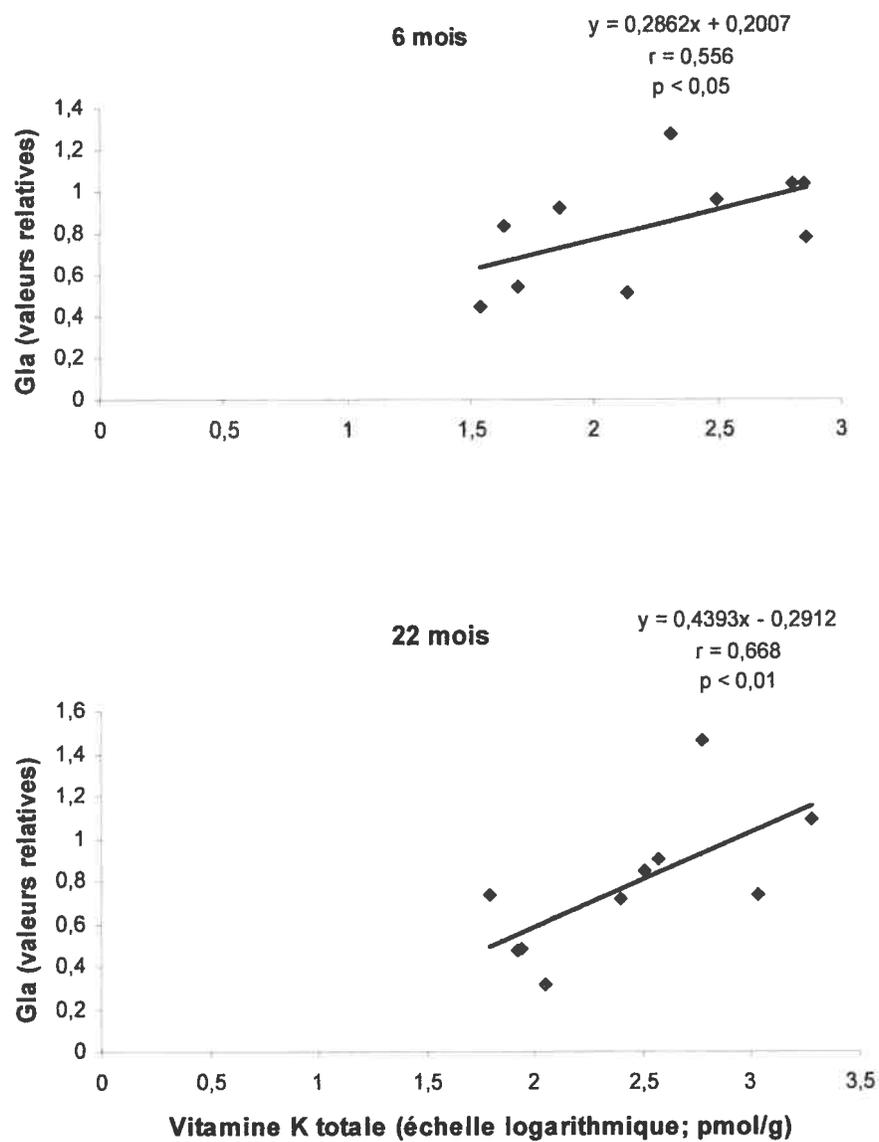
la forme carboxylée de la protéine Gas6 sont positivement corrélés à la  $K_1$  tissulaire seulement pour le groupe de 22 mois ( $r = 0,581$ ,  $p < 0,05$ ) (**figure 10C**). Les corrélations pour le groupe de 6 mois n'est pas statistiquement significative (6 mois :  $r = 0,436$ ).

Pour la VK totale et la MK-4, on observe que la pente de la droite du groupe de 22 mois est une fois et demie plus élevée que celle du groupe de 6 mois (**tableau II**), suggérant un effet de l'âge sur les taux d'expression de la forme carboxylée en fonction de la vitamine K tissulaire. Afin d'évaluer si cet effet de l'âge est statistiquement significatif, nous avons effectué une ANOVA factorielle en fonction de l'âge (6 mois versus 22 mois) et en fonction de la vitamine K tissulaire. Pour ce faire, nous avons séparé les valeurs de vitamine K tissulaire et celles du taux d'expression de la protéine carboxylée (Gla [valeurs relatives]) de façon à former deux groupes ( $n$  comparable), en se basant sur les valeurs de vitamine K tissulaire : VK totale et MK-4  $\leq$  et  $>$  100 pmol/g et  $K_1 \leq$  et  $>$  50 pmol/g (VK totale : (moyenne  $\pm$  SEM) à 6 mois :  $50 \pm 8$ , ( $n = 4$ ) et  $450 \pm 107$  ( $n = 6$ ), à 22 mois :  $87 \pm 10$  ( $n = 4$ ) et  $755 \pm 261$  ( $n = 6$ ); MK-4 : à 6 mois :  $49 \pm 12$  ( $n = 5$ ) et  $258 \pm 55$  ( $n = 5$ ), à 22 mois :  $70 \pm 6$  ( $n = 4$ ) et  $417 \pm 167$  ( $n = 6$ );  $K_1$  : à 6 mois :  $14 \pm 5$  ( $n = 6$ ) et  $320 \pm 118$  ( $n = 4$ ), à 22 mois :  $21 \pm 7$  ( $n = 5$ ) et  $400 \pm 173$  ( $n = 5$ )). Si les pentes varient en fonction de l'âge, on devrait s'attendre à observer une interaction significative entre l'âge et la concentration tissulaire de vitamine K. Or, les résultats de cette analyse montrent que cette interaction est non significative ( $F_{(1,15)} < 1,3$ ).

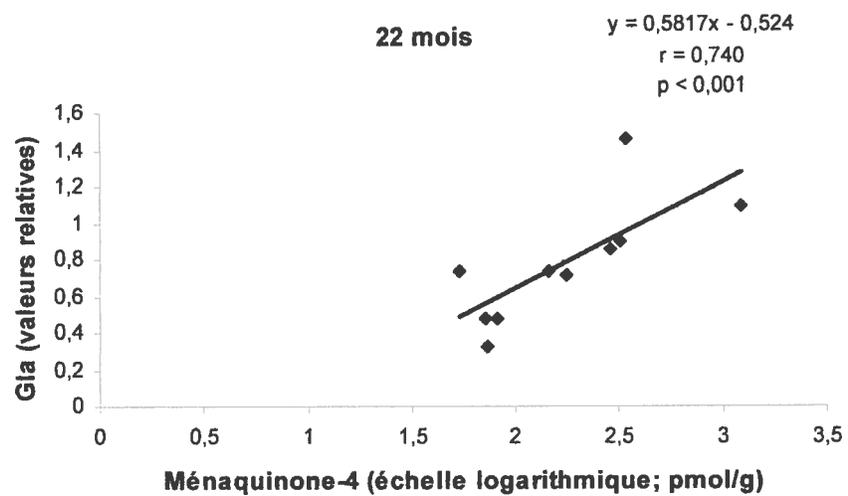
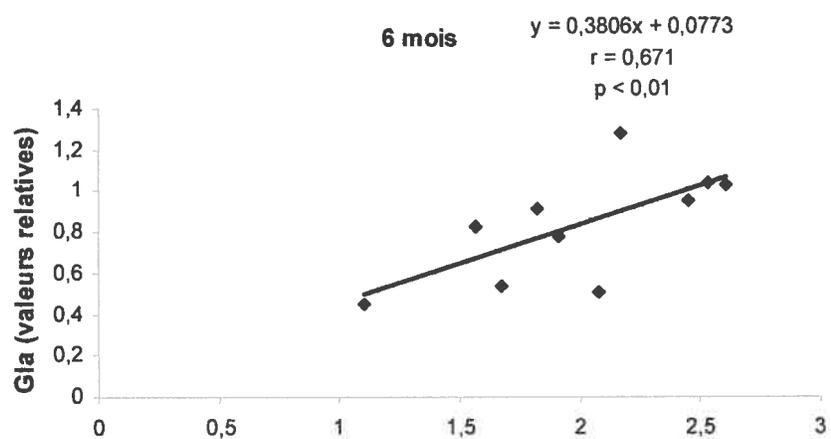
En résumé, les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 sont positivement corrélés aux concentrations tissulaires de VK totale et de MK-4 pour les deux groupes. Des corrélations positives sont également observées pour la K<sub>1</sub> pour le groupe de 22 mois. Enfin, l'âge n'influence pas les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 en fonction de la concentration tissulaire en vitamine K.

**Figure 10.** Corrélations, en échelle semi-logarithmique, entre l'expression de la protéine Gas6 carboxylée et les concentrations tissulaires de vitamine K totale (A), de ménaquinone-4 (B) et de phylloquinone (C) chez des rates de 6 mois et 22 mois.

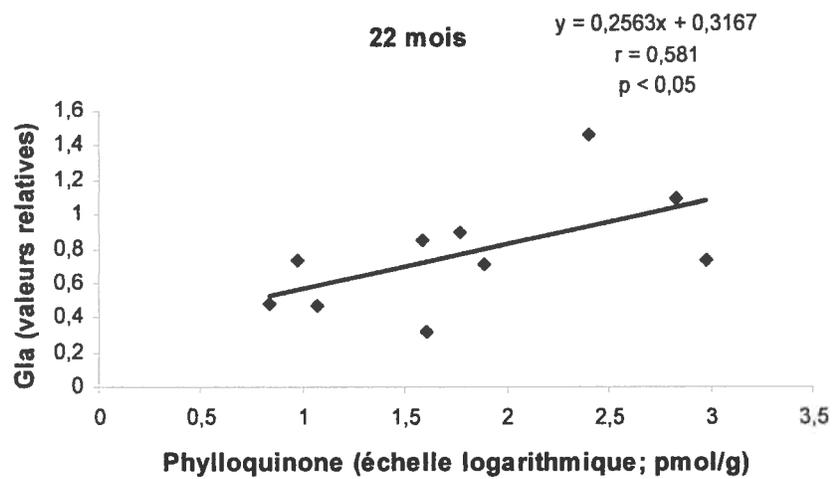
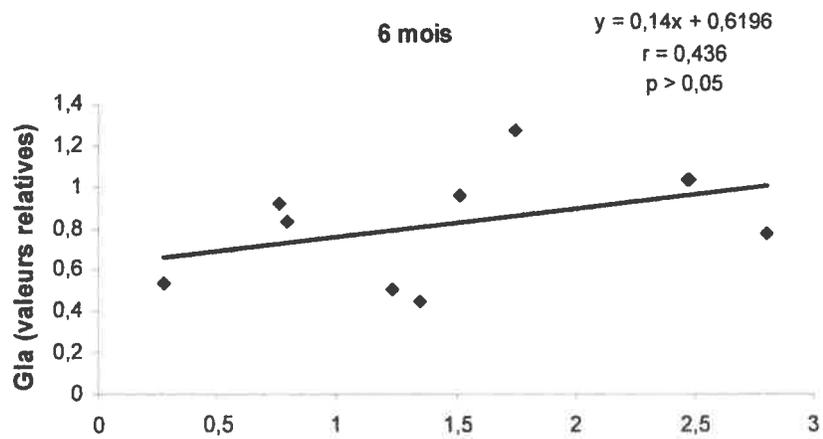
**A. Vitamine K totale (phylloquinone + ménaquinone-4)**



## B. Ménaquinone-4



## C. Phylloquinone



**Tableau II.** Corrélations, en échelle semi-logarithmique<sup>1</sup>, entre les taux moyens d'expression de la protéine Gas6 carboxylée et les concentrations tissulaires de vitamine K totale, de ménaquinone-4 et de phylloquinone chez des rates âgées de 6 mois et 22 mois.

	<b>6 mois</b>	<b>22 mois</b>
<b>VK totale<sup>2</sup></b>	$r^2 = 0,31$ * (n = 10) pente = 0,2862	$r^2 = 0,45$ ** (n = 10) pente = 0,4393
<b>Ménaquinone-4</b>	$r^2 = 0,45$ ** (n = 10) pente = 0,3806	$r^2 = 0,55$ *** (n = 10) pente = 0,5817
<b>Phylloquinone</b>	$r^2 = 0,19$ (n = 10) pente = 0,14	$r^2 = 0,34$ * (n = 10) pente = 0,2563

<sup>1</sup> fonction semi-logarithmique :  $y = a(x) + b$

<sup>2</sup> VK totale : vitamine K totale (phylloquinone + ménaquinone-4)

\*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,01$

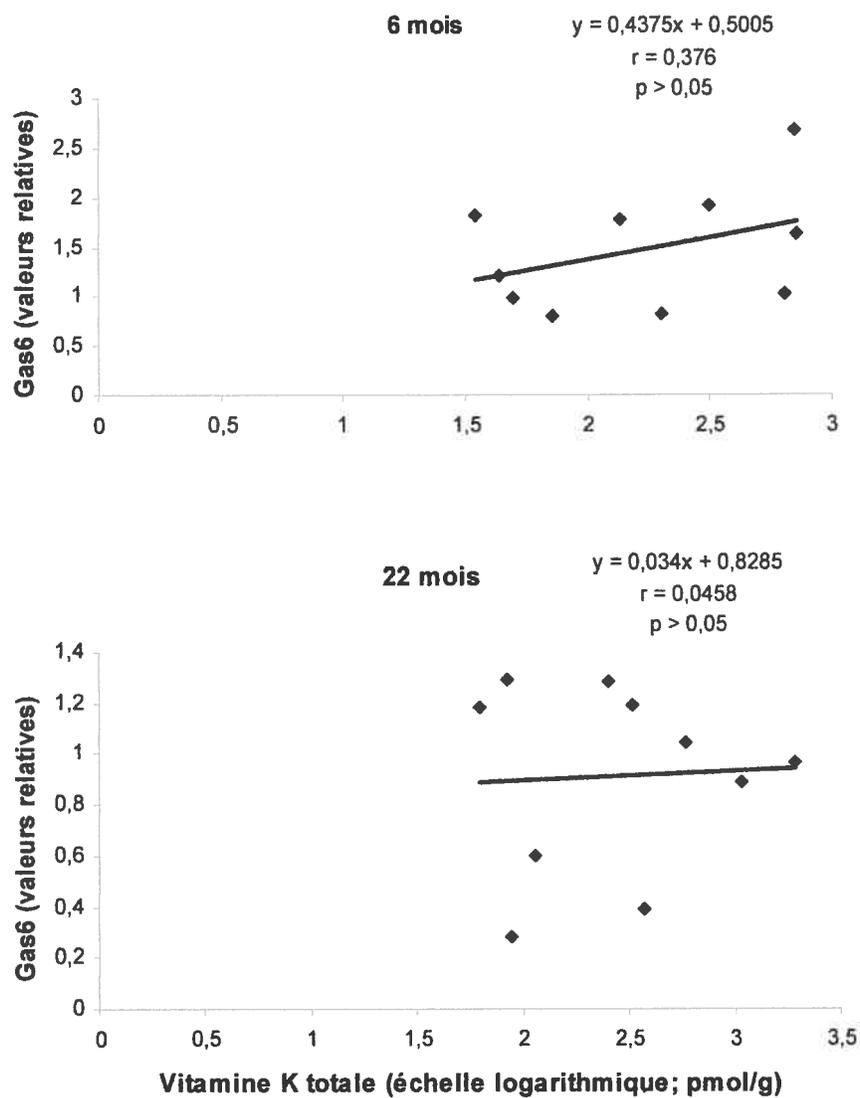
\*\*\*  $p < 0,001$

#### 4. RELATION ENTRE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 TOTALE ET LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE LA VITAMINE K

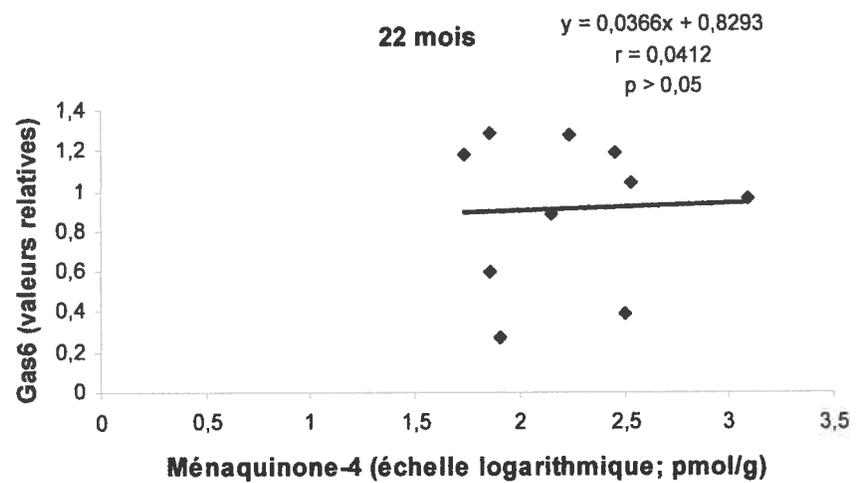
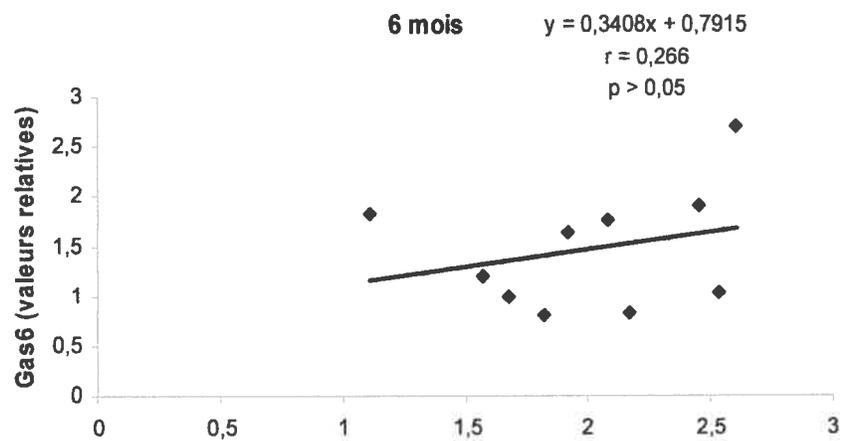
Bien qu'il n'y ait pas d'indication à l'effet que la vitamine K alimentaire influence la synthèse des protéines dépendantes de la vitamine K (elle influence leur activité biologique), nous avons néanmoins voulu vérifier cette possibilité. Des corrélations ont ainsi été établies entre les niveaux d'expression de la protéine Gas6 totale et les teneurs tissulaires de vitamine K (VK totale, MK-4 et K<sub>1</sub>), comme il avait été fait pour la forme carboxylée de Gas6. Telles qu'en témoigne les droites illustrées à la **figure 11**, aucune corrélation n'a été observée entre les concentrations tissulaires de VK totale, de MK-4 ou de K<sub>1</sub> et les niveaux d'expression de la protéine Gas6 totale.

**Figure 11.** Corrélations, en échelle semi-logarithmique, entre l'expression de la protéine Gas6 totale et les concentrations tissulaires de vitamine K totale (A), de ménaquinone-4 (B) et de phylloquinone (C) chez des rates de 6 mois et 22 mois.

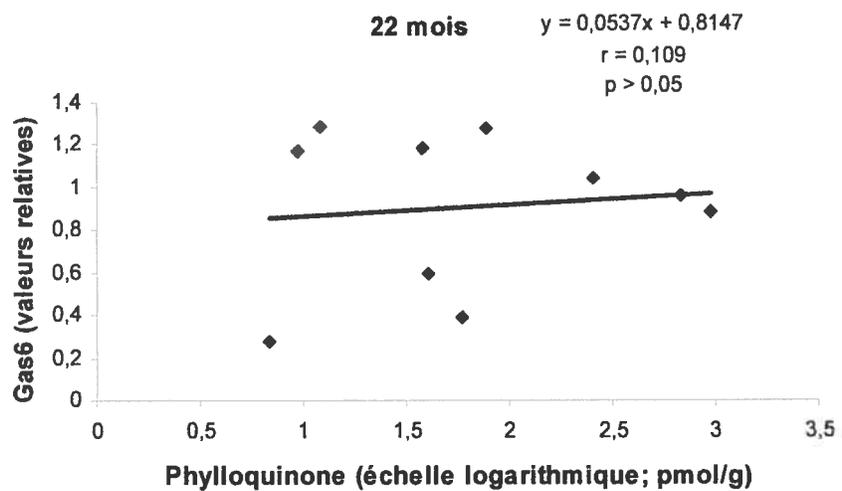
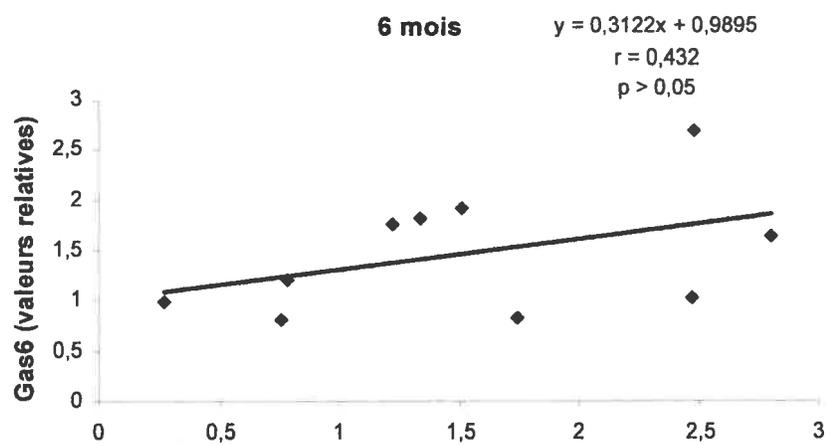
**A. Vitamine K totale (phylloquinone + ménaquinone-4)**



## B. Ménaquinone-4



## C. Phylloquinone



## V. DISCUSSION

Cette étude avait pour but de déterminer dans quelle mesure l'apport alimentaire de vitamine K influence les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 dans les tissus. Les résultats obtenus confirment l'hypothèse selon laquelle les niveaux d'expression de la protéine carboxylée varient en fonction de l'apport vitaminique K. En effet, les taux d'expression de la forme carboxylée de Gas6 sont corrélés aux concentrations tissulaires de vitamine K. Il s'agit de la première étude à notre connaissance à avoir démontré un effet de l'apport alimentaire de vitamine K sur les niveaux de la forme active de cette protéine. Notons toutefois que l'impact de la vitamine K a déjà été étudié en lien avec l'ostéocalcine (129-131). Il s'agit également de la première étude à avoir déterminé l'expression de la protéine Gas6 carboxylée dans les tissus chez le rat. Par ailleurs, les résultats de la présente étude montrent que l'âge n'influence pas les niveaux d'expression de Gas6 carboxylée en fonction de la concentration tissulaire de vitamine K.

### 1. CONCENTRATIONS TISSULAIRES DE VITAMINE K

La mesure de la vitamine K dans les tissus a été effectuée afin de vérifier l'effet de la diète sur l'enrichissement tissulaire en cette vitamine. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (18-20,23,132). En effet, des travaux menés par Ronden *et al.* (23), où des quantités variables de K<sub>1</sub> (0,6 à 3000 mg/kg de diète) étaient administrées à des animaux, ont démontré que les concentrations

tissulaires de  $K_1$  et de MK-4 augmentaient en fonction de l'apport alimentaire de  $K_1$ . D'autre part, les résultats d'une étude réalisée par Thijssen *et al.* (18) ont démontré que la MK-4 était présente en plus fortes concentrations dans l'ensemble des tissus en comparaison de la  $K_1$ , à l'exception du foie, où la  $K_1$  est le vitamère le plus abondant (18-20,132).

Par contre, l'effet de l'âge sur les concentrations tissulaires de vitamine K observé dans la présente étude va à l'encontre des résultats rapportés dans la littérature, bien que peu de travaux aient étudiés cet aspect du métabolisme de la vitamine K. Parmi ceux-ci, Huber *et al.* (19) n'ont observé aucun changement dans les teneurs tissulaires de MK - 4 avec l'âge dans le foie chez le rat. De plus, les concentrations de MK-4 étaient plus faibles dans le cœur et le rein chez les animaux âgés comparativement à ceux plus jeunes. Les concentrations tissulaires de  $K_1$  n'étaient par contre pas affectées par l'âge, à l'exception du foie où les concentrations augmentaient en fonction de l'âge. Ces divergences peuvent s'expliquer entre autres par le fait que la souche d'animaux utilisée par Huber *et al.* (rats Brown Norway) diffère de celle utilisée dans la présente étude (rats Sprague-Dawley).

Par ailleurs, il convient de préciser que les concentrations de  $K_1$  des trois diètes utilisées étaient d'ordre physiologique. Il a été démontré par Suttie *et al.* (133) qu'un apport aussi faible que  $50 \mu\text{g}$  de  $K_1$  / kg de diète n'est pas associé à l'apparition de troubles de la coagulation, bien que cette quantité ne soit pas optimale en regard

de la carboxylation de la prothrombine. Aussi, compte tenu de la durée de la présente étude et dans un but de prévenir des troubles de la coagulation, la concentration de 80 µg de K<sub>1</sub> / kg de diète a été retenue pour la teneur de la diète « faible ». De plus, cette concentration de K<sub>1</sub> a déjà été utilisée dans des travaux antérieurs réalisés au laboratoire (21,134) sans effet délétère. Par ailleurs, la concentration de 500 µg de K<sub>1</sub> de la diète « adéquate » correspond aux recommandations de l'*American Institute of Nutrition* (AIN) pour la vitamine K chez le rat (133,82). Enfin, la concentration de la diète « enrichie » représente quatre fois la teneur de la diète « adéquate ». Ce choix de la concentration des diètes était important car il a permis de déterminer l'influence de quantités physiologiques de K<sub>1</sub> sur les taux d'expression tissulaire de la protéine Gas6, comme il sera discuté plus loin.

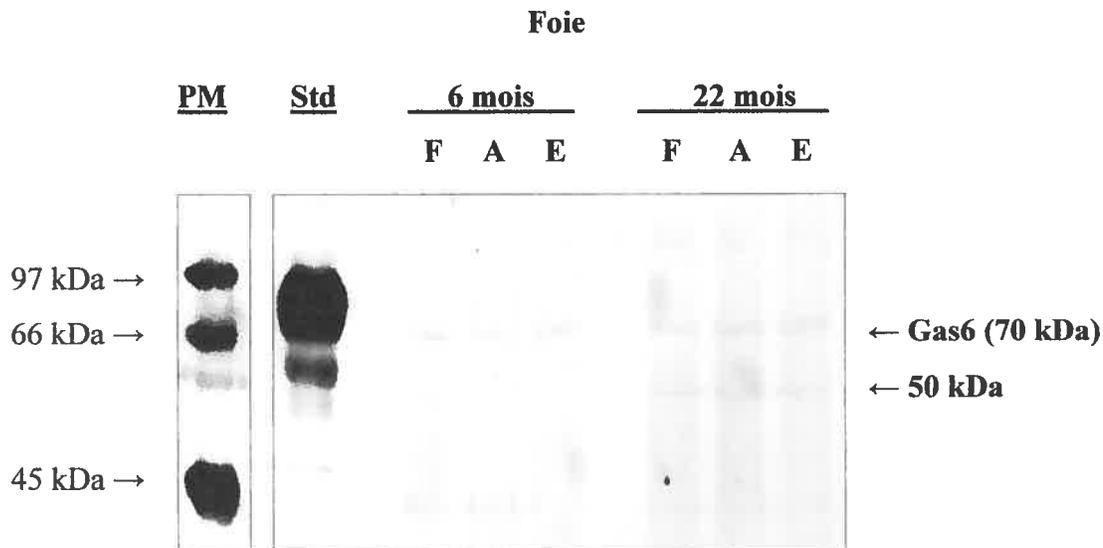
## **2. EXPRESSION TISSULAIRE DES FORMES CARBOXYLÉE ET TOTALE DE LA PROTÉINE GAS6**

**Expression tissulaire.** Bien que le but de ce travail n'était pas d'étudier de manière exhaustive la distribution tissulaire de la protéine Gas6 totale et de sa forme carboxylée, nous avons néanmoins déterminé la présence des deux formes de la protéine dans cinq organes différents. Précisons que peu de travaux ont étudié la présence de cette protéine dans les organes. Nous avons observé que la protéine Gas6 totale était présente dans tous les organes testés. Ces résultats concordent avec ceux rapportés dans une étude menée chez le rat par Ishimoto *et al.* (77) qui démontrait la présence de la protéine Gas6 dans le poumon, le rein, le foie et le cœur de même que

dans la rate, le thymus et la peau. De plus, une autre étude rapporte la présence de l'ARNm de Gas6 dans le poumon, le rein et le cœur chez le rat (75). Nous avons également déterminé la présence tissulaire de la protéine carboxylée et comme pour la forme totale, elle était présente dans tous les organes testés. Par ailleurs, compte tenu du fait que la protéine est impliquée dans la régulation cellulaire (prolifération, différenciation et mort cellulaire), il serait intéressant de déterminer l'influence de la vitamine K sur l'action de la protéine Gas6 dans des modèles impliquant des désordres du cycle cellulaire comme par exemple des modèles de néoplasie.

Les formes carboxylée et totale de la protéine Gas6 ont également été détectées aux deux âges étudiés, soit chez des animaux âgés de 6 et de 22 mois. Toutefois, le design expérimental retenu pour la présente étude n'a pas permis d'étudier de manière spécifique l'effet de l'âge sur les taux d'expression des formes carboxylée et totale de Gas6. Le choix de la disposition des échantillons lors des analyses par immunobuvardage n'a en effet pas permis pas de déterminer conjointement l'effet de l'apport alimentaire de vitamine K sur les taux d'expression de Gas6 et l'influence de l'âge sur ses taux d'expression. La variable âge en fonction de l'apport de vitamine K reste donc à être investiguée. Par ailleurs, la résolution des bandes observées par la technique d'immunobuvardage n'est pas optimale. Ceci résulte de la survenue, à plusieurs reprises, de pannes d'électricité au Département de Nutrition qui ont nuit à l'intégrité des tissus.

**Détection d'un fragment de 50 kDa.** En plus de la détection de la protéine Gas6, dont le poids moléculaire équivaut à 70 kDa, nous avons observé une autre bande correspondant à un poids moléculaire de 50 kDa (**figure 12**). Cette dernière était détectée tant par l'anticorps anti-Gas6, lequel reconnaît de manière spécifique la protéine Gas6 (70 kDa), que par l'anticorps anti-Gla. Bien que d'autres bandes de poids moléculaires inférieurs à 50 kDa aient été détectées, celle de 50 kDa est particulièrement intéressante car elle a également été observée dans le cerveau lors d'autres travaux réalisés au laboratoire. Or, à notre connaissance, aucune protéine de poids moléculaire comparable n'a été associée à Gas6. Manfioletti *et al.* (73) ont rapporté la présence d'une forme épissée de la protéine Gas6, laquelle se scindait en deux segments de poids moléculaire équivalent à 36 kDa (extrémité amine) et 50 kDa (extrémité carboxyle) respectivement. Toutefois, la bande de 50 kDa observée lors de notre étude ne correspond pas à celle rapportée par Manfioletti *et al.* (73). En effet, l'anticorps utilisé lors de nos expériences détectait l'extrémité amine de la protéine et non l'extrémité carboxyle. À ce stade-ci, nous supposons que le fragment de 50 kDa pourrait représenter une forme tronquée de la protéine complète (70 kDa). Des travaux en collaboration avec Dre Anne Prieto (Indiana University) sont actuellement en cours afin de préciser l'identité de cette bande et de confirmer cette hypothèse.



**Figure 12.** Expressions de la protéine Gas6 et de la bande de 50 kDa telles que révélées par l'anticorps anti-Gas6 dans le foie de rates âgées de 6 et 22 mois. Cette bande a également été détectée dans le cœur, le poumon et le rein. PM : échelle de poids moléculaire, Std : standard positif de la protéine Gas6 consistant en la protéine surexprimée dans une culture cellulaire, F : diète faible, A : diète adéquate, E : diète enrichie en phylloquinone.

### 3. RELATION ENTRE LES TAUX D'EXPRESSION DE LA PROTÉINE GAS6 CARBOXYLÉE ET LA CONCENTRATION TISSULAIRE DE VITAMINE K

Les résultats démontrent que les niveaux d'expression de la protéine carboxylée sont corrélés aux taux tissulaires de vitamine K, confirmant ainsi notre hypothèse de recherche. Rappelons que cette protéine, comme toutes les autres protéines qui dépendent de la vitamine K, acquiert son activité biologique suite à une modification de ses résidus Glu en résidus Gla lors d'une réaction de carboxylation,

dans laquelle la vitamine K agit comme cofacteur. Comme mentionné précédemment, il s'agit de la première étude à avoir démontré un effet modulateur de l'apport vitaminique K sur les taux d'expression de la forme active de la protéine. Plusieurs travaux réalisés *in vitro* ont en effet mis en évidence l'importance des résidus Gla en regard de l'action de la protéine (62,63,100). Par exemple, lors de travaux réalisés chez la souris, l'ajout de la protéine Gas6 carboxylée à une culture de fibroblastes cardiaques stimulait leur prolifération alors qu'aucun effet n'était observé en présence de la forme décarboxylée de la protéine (100). Les auteurs n'ont cependant pas étudié l'impact direct de la vitamine K sur le degré de carboxylation de la protéine et subséquemment sur la prolifération cellulaire des fibroblastes cardiaques. D'autre part, les résultats de la présente étude sont en accord avec ceux rapportés pour l'ostéocalcine (129-131). En effet, chez l'humain, il a été rapporté qu'une supplémentation en  $K_1$  de 1000  $\mu\text{g}/\text{jour}$  augmentait d'environ dix fois la concentration sérique de  $K_1$  et réduisait de 7,6% à 3,4% le taux d'ostéocalcine sous-carboxylée chez les sujets du groupe supplémenté (129). De même, chez l'humain, Sokoll *et al.* (131) ont observé une diminution de 41% du taux sanguin d'ostéocalcine sous-carboxylée lorsque la diète était supplémentée en  $K_1$  (420  $\mu\text{g}/\text{jour}$  vs diète contrôle : 100  $\mu\text{g}/\text{jour}$ ).

Bien que, dans la présente étude, les niveaux d'expression de la protéine Gas6 carboxylée soient corrélés aux concentrations tissulaires de vitamine K lorsque les organes sont confondus, les résultats relatifs à l'expression de Gas6 carboxylée et de son degré de carboxylation pour chacun des organes n'ont révélé que des tendances

statistiquement non significatives. Ceci peut s'expliquer par le fait que la taille de l'échantillon pour chacun d'eux était petite.

Par ailleurs, l'absence de corrélation entre les taux d'expression de la protéine totale et les niveaux tissulaires de vitamine K confirme que l'augmentation des taux d'expression de la forme carboxylée observée résulte de l'action spécifique de la vitamine et ne découle pas de taux plus importants de substrats (Gas6 totale). Ceci, sur la base du fait qu'aucun effet de la diète n'a été observé sur les taux d'expression de la protéine totale pour aucun des organes. Cette absence de corrélation suggère également que la vitamine n'intervient pas dans la synthèse de la protéine, appuyant ainsi les conclusions de travaux réalisés *in vitro*. Dans une étude réalisée par Nakano *et al.* (62) dans les cellules du muscle lisse vasculaire, les niveaux d'expression de la protéine Gas6 totale n'étaient pas modifiés suite à un traitement à la warfarine sodique, un antagoniste de la vitamine K. De plus, l'absence d'effet de la vitamine K sur les taux d'expression de Gas6 totale appuie ce qui a été observé pour d'autres protéines dépendantes de la vitamine K. Chez l'humain, des études réalisées sur l'ostéocalcine ont montré que les concentrations sériques de la protéine totale ne variaient pas en fonction de l'apport alimentaire de vitamine K (129,131).

D'autre part, dans la présente étude, les taux d'expression de Gas6 carboxylée étaient plus fortement corrélés aux concentrations tissulaires de MK-4 qu'à celles de K<sub>1</sub>. Cela peut s'expliquer entre autres par le fait que, sauf pour le foie, la MK-4 consiste en la forme prédominante dans l'ensemble des organes.

Finalement, les résultats de cette étude montrent que l'âge n'affecte pas les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 en fonction de la concentration tissulaire de vitamine K, indiquant que pour une même quantité de vitamine, le taux de carboxylation de la protéine ne diffère pas. Ceci est en accord avec les résultats rapportés pour l'ostéocalcine. En effet, il a été montré que les taux d'ostéocalcine sous-carboxylée diminuent de façon comparable chez des personnes jeunes et âgées suite à une supplémentation en vitamine K (129). L'absence d'effet de l'âge sur le taux de carboxylation de la protéine Gas6 n'exclut toutefois pas un rôle pour cette protéine au cours du vieillissement. Des études ultérieures portant sur l'efficacité de son action au grand âge pourrait nous renseigner à ce sujet.

## VI. CONCLUSION

En conclusion, les résultats de cette étude indiquent que l'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 est modulée par la vitamine K tissulaire. En revanche, l'expression de la protéine totale n'est pas affectée par la concentration tissulaire de la vitamine K, confirmant un effet modulateur spécifique de la vitamine en regard de la carboxylation de Gas6. D'autre part, l'expression de la forme carboxylée de Gas6 est plus fortement associée à la MK-4 tissulaire qu'à la K<sub>1</sub> ce qui peut s'expliquer par le fait que la MK-4 constitue le vitamère le plus abondant dans l'ensemble des organes, à l'exception du foie.

La taille des échantillons de chacun des organes étant petite, la présente étude ne peut pas statuer quant à l'effet modulateur de la vitamine K sur la carboxylation de la protéine Gas6. Toutefois, les résultats préliminaires présentés suggèrent des réponses différentes d'un organe à l'autre.

Enfin, l'âge n'affecte pas les taux d'expression de la forme carboxylée de la protéine Gas6 en fonction de la concentration tissulaire de vitamine K. Toutefois, cette absence d'effet d'âge reste intrigante, considérant l'implication de la protéine dans la régulation du cycle cellulaire, et mériterait d'être investigué dans des études ultérieures.

## VII. RÉFÉRENCES

- 1- Ferland G, *Vitamin K*, In Russell RM & Bowman BA, Present knowledge in nutrition, 8<sup>th</sup> edition, 2001, Washington DC : ILSI Press, p.164-172
- 2- Dam H, *The antihemorrhagic vitamin of the chick*, 1935, Nature, 135:652-653
- 3- Davidson RT, Foley AL, Engelke JA, Suttie JW, *Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria*, 1998, J Nutr, 128:220-223
- 4- Shearer MJ, Bach A, Kohlmeier M, *Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health*, 1996, J Nutr, 126:1181S-1186S
- 5- Shearer MJ, *Vitamin K metabolism and nutrition*, 1992, Blood Rev, 6:92-104
- 6- Booth SL, Pennington JAT, Sadowski JA, *Food sources and dietary intakes of vitamin K-1 (phylloquinone) in the American diet: Data from the FDA Total Diet Study*, 1996, J Am Diet Assoc, 96:149-154
- 7- Booth SL, Suttie JW, *Dietary intake and adequacy of vitamin K*, 1998, J Nutr, 128:785-788

- 8- Dismore ML, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Peterson JW, Booth SL, *Vitamin K content of nuts and fruits in the US diet*, 2003, J Am Diet Assoc, 103:1650-1652
- 9- Shearer MJ, *Vitamin K*, 1995, The Lancet, 345:229-234
- 10- Shearer MJ, McBurney A, Barkhan P, *Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man*, 1974, Vitam Horm, 32:513-542
- 11- Garber AK, Binkley NC, Krueger DC, Suttie JW, *Comparison of phylloquinone bioavailability from food sources or a supplement in human subjects*, 1999, J Nutr, 129:1201-1203
- 12- Gijsbers BLMG, Jie K-SG, Vermeer C, *Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers*, 1996, British J Nutr, 76:223-229
- 13- Newman P, Shearer MJ, *Vitamin K metabolism*, 1998, Subcell Biochem, 30:455-488
- 14- Booth SL, Lichtenstein AH, Dallal GE, *Phylloquinone absorption from phylloquinone-fortified oil is greater than from a vegetable in younger and older men and women*, 2002, J Nutr, 132:2609-2612

- 15- Lamon-Fava S, Sadowski JA, Davidson KW, O'Brien ME, McNamara JR, Schaefer EJ, *Plasma lipoproteins as carriers of phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>) in humans*, 1998, *Am J Clin Nutr*, 67:1226-1231
- 16- Erkkilä AT, Lichtenstein AH, Dolnikowski GG, Grusak MA, Jalbert SM, Aquino KA, Peterson JW, Booth SL, *Plasma transport of vitamin K in men using deuterium-labeled collard greens*, 2004, *Metabolism*, 53:215-221
- 17- Schurgers LJ, Vermeer C, *Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects*, 2002, *Biochim Biophys Acta*, 1570:27-32
- 18- Thijssen HHW, Drittij-Reijnders MJ, *Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4*, 1994, *British J Nutr*, 72:415-425
- 19- Huber AM, Davidson KW, O'Brien-Morse ME, Sadowski JA, *Tissue phylloquinone and menaquinones in rats are affected by age and gender*, 1999, *J Nutr*, 129:1039-1044
- 20- Thijssen HHW, Drittij-Reijnders MJ, Fischer MAJG, *Phylloquinone and menaquinone-4 distribution in rats: synthesis rather than uptake determines menaquinone-4 organ concentrations*, 1996, *J Nutr*, 126:537-543

- 21- Carrié I, Portoukalian J, Vicaretti R, Rochford J, Potvin S, Ferland G, *Menaquinone-4 concentration is correlated with sphingolipid concentrations in rat brain*, 2004, J Nutr, 134:167-172
- 22- Thijssen HHW, Driessens FJCM, *Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4*, 1996, British J Nutr, 75:121-127
- 23- Ronden JE, Thijssen HHW, Vermeer C, *Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat*, 1998, Biochim Biophys Acta, 1379:16-22
- 24- Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ, *Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration*, 1989, Am J Clin Nutr, 50:100-108
- 25- Shearer MJ, Mallinson CN, Webster GR, Barkhan P, *Clearance from plasma and excretion in urine, faeces and bile of an intravenous dose of tritiated vitamin K<sub>1</sub> in man*, 1972, Br J Haematol, 22:579-588
- 26- Shearer MJ, Barkhan P, Webster GR, *Absorption and excretion of an oral dose of tritiated vitamin K<sub>1</sub> in man*, 1970, Br J Haematol, 18:297-308

27- Suttie JW, *The importance of menaquinones in human nutrition*, 1995, *Annu Rev Nutr*, 15:399-417

28- Institute of Medicine and food and Nutrition Board, *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*, National Academy of Sciences, Washington D.C., 2001, pp163-196

29- Krasinski SD, Russell RM, Furie BC, Kruger SF, Jacques PF, Furie B, *The prevalence of vitamin K deficiency in chronic gastrointestinal disorders*, 1985, *Am J Clin Nutr*, 41:639-643

30- Blanchard RA, Furie BC, Jorgensen M, Kruger SF, Furie B, *Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease*, 1981, *N Engl J Med*, 305:242-248

31- Rashid M, Durie P, Andrew M, Kalnins D, Shin J, Corey M, Tullis E, Pencharz PB, *Prevalence of vitamin K deficiency in cystic fibrosis*, 1999, *Am J Clin Nutr*, 70:378-382

32- Collier S, Fulhan J, Duggan C, *Nutrition for the pediatric office: update on vitamins, infant feeding and food allergies*, 2004, *Curr Opin Pediatr*, 16:314-320

- 33- Suttie JW, *Synthesis of vitamin K-dependent proteins*, 1993, FASEB J, 7:445-452
- 34- Cain D, Hutson SM, Wallin R, *Assembly of the warfarin-sensitive vitamin 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane*, 1997, J Biol Chem, 272:29068-29075
- 35- Dowd P, Ham S-W, Naganathan S, Hershline R, *The mechanism of action of vitamin K*, 1995, Annu Rev Nutr, 15:419-440
- 36- Furie B, Bouchard BA, Furie BC, *Vitamin K-dependent biosynthesis of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid*, 1999, Blood, 93:1798-1808
- 37- Wallin R, Suttie JW, *Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K epoxidation; Evidence that the warfarin-sensitive microsomal NAD(P)H dehydrogenase reduces vitamin K<sub>1</sub> in these reactions*, 1981, Biochem J, 194:983-988
- 38- Wallin R, Martin LF, *Warfarin poisoning and vitamin K antagonism in rat and human liver; Design of a system in vitro that mimics the situation in vivo*, 1987, Biochem J, 241:389-396
- 39- Whitlon DS, Sadowski JA, Suttie JW, *Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition*, 1978, Biochem, 17:1371-1377

- 40- Wallin R, Martin LF, *Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver, Effects of Warfarin*, 1985, J Clin Invest, 76:1879-1884
- 41- Ferland G, *The vitamin K-dependent proteins: an update*, 1998, Nutr Rev, 56:223-230
- 42- Norris LA, *Blood coagulation*, 2003, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 17:369-383
- 43- Broze GJJr, *Protein Z-dependent regulation of coagulation*, 2001, Thromb Haemost, 86:8-13
- 44- Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P, *Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin*, 1974, Proc Nat Acad Sci USA, 71:2730-2733
- 45- Nelsestuen GL, Zytovicz TH, *The mode of action of vitamin K; Identification of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid as a component of prothrombin*, 1974, J Biol Chem, 249:6347-6350
- 46- Vermeer C, Braam L, *Role of K vitamins in the regulation of tissue calcification*, 2001, J Bone Miner Metab, 19:201-206

47- de Vries G, Coomans D, Wisse E, *Immunocytochemical localization of osteocalcin in human and bovine teeth*, 1988, *Calcif Tissue Int*, 43:128-130

48- Camarda AJ, Butler WT, Finkelman RD, Nanci A, *Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin*, 1987, *Calcif Tissue Int*, 40:349-355

49- Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N, *Charaterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone*, 1976, *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:1447-1451

50- Price PA, *Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism*, 1988, *Annu Rev Nutr*, 8:565-583

51- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G, *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice*, 1996, *Nature*, 382:448-452

52- Pan EY, Gomperts ED, Millen R, Gilsanz V, *Bone mineral density and its association with inherited protein S deficiency*, 1990, *Thromb Res*, 58:221-231

53- Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Dechavanne M, Delmas DP, *Protein-S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts*, 1992, *Endocrinology*, 130:1599-1604

54- Price PA, Urist MR, Otawara Y, *Matrix Gla protein, a new  $\gamma$ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone*, 1983, *Biochem Biophys Res Commun*, 117:765-771

55- Fraser JD, Price PA, *Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein; Implication for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the  $\gamma$ -carboxylase*, 1988, *J Biol Chem*, 263:11033-11036

56- Yagami K, Suh J-Y, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Abrams WR, Shapiro IM, Pacifici M, Iwamoto M, *Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb*, 1999, *J Cell Biol*, 147:1097-1108

57- Shanahan CM, Weissberg PL, *Smooth muscle cell heterogeneity; Patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo*, 1998, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:333-338

58- Luo G, Ducky, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G, *Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein*, 1997, *Nature*, 386:78-81

59- Shearer MJ, *Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification*, 2000, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 3:433-438

60- Price PA, Faus SA, Williamson MK, *Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves*, 1998, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:1400-1407

61- Li R-h, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX, Mather JP, *Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells*, 1996, *J Neurosci*, 16:2012-2019

62- Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K-I, Arita H, *Requirement of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells*, 1997, *Biochem J*, 323:387-392

- 63- Nakano T, Kawamoto K, Higashino K-I, Arita H, *Prevention of growth arrest-induced cell death of vascular smooth muscle cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6*, 1996, FEBS Letters, 387:78-80
- 64- Kulman JD, Harris JE, Haldeman BA, Davie EW, *Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich  $\gamma$ -carboxyglutamic acid proteins*, 1997, Proc Natl Acad Sci USA, 94:9058-9062
- 65- Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW, *Identification of two novel transmembrane  $\gamma$ -carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues*, 2001, PNAS, 98:1370-1375
- 66- Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C, *The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade*, 1993, Mol Cell Biol, 13:4976-4985
- 67- Nakano T, Higashino K-I, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, Ohara O, Arita H, *Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for  $Ca^{2+}$ -mobilizing growth factors*, 1995, J Biol Chem, 270:5702-5705

68- Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, Ohashi K, Mizuno K, Arita H, *Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6*, 1997, J Biol Chem, 272:29411-29414

69- McCloskey P, Fridell Y-W, Attar E, Villa J, Jin Y, Varnum B, Liu ET, *Gas6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl*, 1997, J Biol Chem, 272:23285-23291

70- Perera L, Li L, Darden T, Monroe DM, Pedersen LG, *Prediction of solution structures of the  $Ca^{2+}$ -bound  $\gamma$ -carboxyglutamic acid domains of protein S and homolog growth arrest specific protein 6: use of the particle Mesh Ewald Method*, 1997, Biophys J, 73:1847-1856

71- Tanabe K, Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Mizuno K, *Roles of  $\gamma$ -carboxylation and a sex hormone-binding globulin-like domain in receptor-binding and in biological activities of Gas6*, 1997, FEBS Letters, 408:306-310

72- Mark MR, Chen J, Hammonds RG, Sadick M, Godowski PJ, *Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain-containing proteins, as a ligand for Rse and Axl*, 1996, J Biol Chem, 271:9785-9789

73- Marcandalli P, Gostissa M, Varnum B, Goruppi S, Schneider C, *Identification and tissue expression of a splice variant for the growth arrest-specific gene gas6*, 1997, FEBS Letters, 415:56-58

74- Goruppi S, Yamane P, Marcandalli P, Garcia A, Clogston C, Gostissa M, Varnum B, Schneider C, *The product of a gas6 splice variant allows the release of the domain responsible for Axl tyrosine kinase receptor activation*, 1997, FEBS Letters, 415:59-63

75- Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, Nakamura T, *Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons*, 2002, J Neurosci Res, 68:150-160

76- Loeser RF, Varnum BC, Carlson CS, Goldring MB, Liu ET, Sadiev S, Kute TE, Wallin R, *Human chondrocyte expression of growth-arrest-specific gene 6 and the tyrosine kinase receptor Axl*, 1997, Arthritis & Rheumatism, 40:1455-1465

77- Ishimoto Y, Nakano T, *Release of a product of growth arrest-specific gene 6 from rat platelets*, 2000, FEBS Letters, 466:197-199

78- Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C, *Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system*, 1999, Brain Res, 816:646-661

- 79- Healy AM, Schwartz JJ, Zhu X, Herrick BE, Varnum B, Farber HW, *Gas 6 promotes Axl-mediated survival in pulmonary endothelial cells*, 2001, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280:L1273-L1281
- 80- Stenberg LM, Nilsson E, Ljungberg O, Stenflo J, Brown MA, *Synthesis of  $\gamma$ -carboxylated polypeptides by  $\alpha$ -cells of the pancreatic islets*, 2001, *Biochem Biophys Res Commun*, 283:454-459
- 81- Fiebeler A, Park J-K, Muller DN, Lindschau C, Mengel M, Merkel S, Banas B, Luft FC, Haller H, *Growth arrest specific protein 6/Axl signaling in human inflammatory renal diseases*, 2004, *Am J Kidney Dis*, 43:286-295
- 82- Rollin BE, Kesel ML, *The experimental animal in biomedical research, Volume II, Care, Husbandry, and well-being – an overview by species*, 1995, CRC Press, Florida, p. 256
- 83- Tsaïoun KI, Denisova NA, Obin M, Joseph J, *Novel growth factor Gas6, phosphatidylserine and their age-related changes in the rat brain*, 2000, *Neurosci Res Commun*, 26:113-122
- 84- Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K, *Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases*, 1996, *J Biol Chem*, 271:30022-30027

85- Chen J, Carey K, Godowski PJ, *Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation*, 1997, *Oncogene*, 14:2033-2039

86- Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C, *Signaling through the Ark tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation*, 1997, *Oncogene*, 15:2387-2397

87- Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, Suzuki K, Mizuno K, *Stimulation of Sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6*, 1995, *J Biol Chem*, 270:22681-22684

88- Kandel ES, Hay N, *The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB*, 1999, *Exp Cell Res*, 253:210-229

89- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M, *PI3K/Akt signaling pathway and cancer*, 2004, *Cancer Treatment Reviews*, 30:193-204

90- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA, *JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis*, 2004, *Leukemia*, 18:189-218

- 91- Minden A, Karin M, *Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases*, 1997, *Biochim Biophys Acta*, 1333:F85-F104
- 92- Angelillo-Scherrer A, Garcia de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts MF, Herbert J-M, Collen D, Dahlbäck B, Carmeliet P, *Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis*, 2001, *Nature Med*, 7:215-221
- 93- Chen C, Li Q, Darrow AL, Wang Y, Derian CK, Yang J, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Damiano BP, *Mer receptor tyrosine kinase signaling participates in platelet function*, 2004, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:1118-1123
- 94- Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, Herbert JM, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Vesin C, Hoylaerts MF, Plaisance S, Collen D, Conway EM, Wehrle-Haller B, Carmeliet P, *Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy*, 2005, *J Clin Invest*, 115:237-246
- 95- Nakamura YS, Hakeda Y, Takakura N, Kameda T, Hamaguchi I, Miyamoto T, Kakudo S, Nakano T, Kumegawa M, Suda T, *Tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts*, 1998, *Stem Cells*, 16:229-238

- 96- Katagiri M, Hakeda Y, Chikazu D, Ogasawara T, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K, Kawaguchi H, *Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts*, 2001, J Biol Chem, 276:7376-7382
- 97- Hall MO, Prieto AL, Obin MS, Abrams TA, Burgess BL, Heeb MJ, Agnew, BJ, *Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6*, 2001, Exp Eye Res, 73:509-520
- 98- Hall MO, Obin MS, Prieto AL, Burgess BL, Abrams TA, *Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) and  $Ca^{2+}$  and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro*, 2002, Exp Eye Res, 75:391-400
- 99- Hall MO, Agnew BJ, Abrams TA, Burgess BL, *The phagocytosis of os is mediated by the PI3-kinase linked tyrosine kinase receptor, mer, and is stimulated by GAS6*, 2003, Adv Exp Med Biol, 533:331-336
- 100- Stenhoff J, Dahlbäck B, Hafizi, S, *Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts*, 2004, Biochem Biophys Res Commun, 319:871-878

101- Nagai K, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Kanamori H, Nakano T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T, *Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy*, 2003, J Biol Chem, 278:18229-18234

102- Yanagita M, Arai H, Ishii K, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Varnum B, Fukatsu A, Doi T, Kita T, *Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis*, 2001, Am J Pathol, 158:1423-1432

103- Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell Y-W, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, Yanagihara D, Bennett L, Sylber M, Merewether LA, Tseng A, Escobar E, Liu ET, Yamane HK, *Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6*, 1995, Nature, 373:623-626

104- Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, Masiakowski P, Ryan TE, Tobkes NJ, Chen DH, DiStefano PS, Long GL, Basilico C, Goldfarb MP, Lemke G, Glass DJ, Yancopoulos GD, *The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases*, 1995, Cell, 80:661-670

- 105- Godowski RJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG, *Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3*, 1995, *Cell*, 82:355-358
- 106- Prieto AL, Weber JL, Lai C, *Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and Mer in the developing rat central nervous system*, 2000, *J Comp Neurol*, 425:295-314
- 107- Mark MR, Scadden DT, Wang Z, Gu Q, Goddard A, Godowski PJ, *rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain*, 1994, *J Biol Chem*, 269:10720-10728
- 108- Nakano T, Kishino J, Arita H, *Characterization of a high-affinity and specific binding site for Gas6*, 1996, *FEBS Letters*, 387:75-77
- 109- Saxena SP, Israels ED, Israels LG, *Novel vitamin K-dependent pathways regulating cell survival*, 2001, *Apoptosis*, 6:57-68
- 110- Crosier KE, Crosier PS, *New insights into the control of cell growth; the role of the Axl family*, 1997, *Pathology*, 29:131-135
- 111- Fridell Y-WC, Villa JJr, Attar EC, Liu ET, *Gas6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells*, 1998, *J Biol Chem*, 273:7123-7126

112- Goruppi S, Ruaro E, Schneider C, *Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts*, 1996, *Oncogene*, 12:471-480

113- Yanagita M, Arai H, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Fukatsu A, Doi T, Kita T, *Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3*, 2001, *J Biol Chem*, 276:42364-42369

114- Yanagita M, Ishimoto Y, Arai H, Nagai K, Ito T, Nakano T, Salant DJ, Fukatsu A, Doi T, Kita T, *Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis*, 2002, *J Clin Invest*, 110:239-246

115- Tanaka K, Nagayama Y, Nakano T, Takamura N, Namba H, Fukada S, Kuma K, Yamashita S, Niwa M, *Expression profile of receptor-type protein tyrosine kinase genes in the human thyroid*, 1998, *Endocrinology*, 139:852-858

116- van Ginkel PR, Gee RL, Shearer RL, Subramanian L, Walker TM, Albert DM, Meisner LF, Varnum BC, Polans AS, *Expression of the receptor tyrosine kinase Axl promotes ocular melanoma cell survival*, 2004, *Cancer Res*, 64:128-134

117- Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galetti M, Bellosta P, Avanzi GC, *Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor*, 2004, *J Cell Physiol*, 204:36-44

118- Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C, *Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts*, 1997, *Mol Cell Biol*, 17:4442-4453

119- Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, Ohanian J, Fridell Y-W, Canfield AE, *Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes*, 2003, *Circ Res*, 92:1123-1129

120- O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP, *Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis; Evidence for a novel endothelial cell survival pathway*, 1999, *Am J Pathol*, 154:1171-1180

121- Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C, *Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras*, 1999, *Oncogene*, 18:4224-4236

122- Allen MP, Zeng C, Schneider K, Xiong X, Meintzer MK, Bellosta P, Basilico C, Varnum B, Heidenreich KA, Wierman ME, *Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (Erk) and Akt*, 1999, *Mol Endocrinol*, 13:191-201

123- Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD, *Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells*, 2004, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287:H1207-H1213

124- Demarchi F, Verardo R, Varnum B, Brancolini C, Schneider C, *Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF- $\kappa$ B activation*, 2001, *J Biol Chem*, 276:31738-31744

125- Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, Tai L-K, Jin Z-G, Haendeler J, Berk BC, *Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt*, 2004, *J Mol Cell Cardio*, 37:881-887

126- Konishi A, Aizawa T, Mohan A, Korshunov VA, Berk BC, *Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells*, 2004, *J Biol Chem*, 279:28766-28770

127- Valverde P, Obin MS, Taylor A, *Role of Gas6/Axl signaling in lens epithelial cell proliferation and survival*, 2004, *Exp Eye Res*, 78:27-37

128- Shankar SL, O'Guin K, Cammer M, McMorris A, Stitt TN, Basch RS, Varnum B, Shafit-Zagardo B, *The growth arrest-specific gene product Gas6 promotes the survival of human oligodendrocytes via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway*, 2003, *J Neurosci*, 23:4208-4218

- 129- Binkley NC, Krueger DC, Engelke JA, Foley AL, Suttie JW, *Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of under- $\gamma$ -carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults*, 2000, *Am J Clin Nutr*, 72:1523-1528
- 130- Booth SL, O'Brien-Morse ME, Dallal GE, Davidson KW, Gundberg CM, *Response of vitamin K status to different intakes and sources of phylloquinone-rich foods: comparison of younger and older adults*, 1999, *Am J Clin Nutr*, 70:368-377
- 131- Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, Davidson KW, Tsaïoun KI, Sadowski JA, *Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary  $\gamma$ -carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects*, 1997, *Am J Clin Nutr*, 65:779-784
- 132- Huber AM, Davidson KW, O'Brien-Morse ME, Sadowski JA, *Gender differences in hepatic phylloquinone and menaquinones in the vitamin K-deficient and -supplemented rat*, 1999, *Biochim Biophys Acta*, 1426:43-52
- 133- Kindberg CG, Suttie JW, *Effect of various intakes of phylloquinone on signs of vitamin K deficiency and serum and liver phylloquinone concentrations in the rat*, 1989, *J Nutr*, 119:175-180
- 134- Carrié I, Ferland G, Obin MS, *Effects of long-term vitamin K (phylloquinone) intake on retina aging*, 2003, *Nutr Neurosci*, 6:351-359

135- Booth SL, Davidson KW, Sadowski JA, *Evaluation of an HPLC method for the determination of phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>) in various food matrices*, 1994, J Agric Food Chem, 42:295-300

136- Booth SL, Charette AM, *Vitamin K, oral anticoagulants, and bone health*, In Holick MF & Dawson Hughes B, *Nutrition and Bone Health*, 2004, Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 457-478

137- Binkley NC, Suttie JW, *Vitamin K nutrition and osteoporosis*, 1995, J Nutr, 125:1812-1821

138- Bügel S, *Vitamin K and bone health*, 2003, Proceed Nutr Soc, 62:839-843